(19) Евразийское патентное ведомство

(21) 202191139 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2021.08.09

(22) Дата подачи заявки
2019.10.23

(51) Int. Cl. ***A61K 39/00*** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К EpCAM, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА И ИММУНОКОНЪЮГАТЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **62/751,530; 62/824,539; 62/846,297**
(32) **2018.10.26; 2019.03.27; 2019.05.10**
(33) **US**
(86) **PCT/US2019/057569**
(87) **WO 2020/086665 2020.04.30**

(71) Заявитель:
ИММЬЮНОДЖЕН, ИНК.; ЦИТОМКС ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Лю Имао, Хикс Стюарт В., Гуиди Синтия Дж., Коли Неерадж, Читтенден Томас, Ламберт Джон, Пайдхунгат Мадан М., Сегерт Джейсон Гери, Типтон Кимберли Энн, Чан Чанти Мариатеге, Фокс Элейн Энн Мариано (US)

(74) Представитель:
Харин А.В., Стойко Г.В., Галухина Д.В., Буре Н.Н., Алексеев В.В. (RU)

(57) Изобретение в целом относится к антителам и фрагментам антител, которые специфически связывают EpCAM человека, активируемым антителам к EpCAM и их иммуноконъюгатам, а также к способам получения и применения указанных антител, фрагментов антител, активируемых антител и иммуноконъюгатов для диагностики и лечения таких заболеваний, как злокачественное новообразование.

202191139 A1

202191139 A1

АНТИТЕЛА К EPCAM, АКТИВИРУЕМЫЕ АНТИТЕЛА И ИММУНОКОНЪЮГАТЫ, И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0001] Изобретение в целом относится к антителам и фрагментам антител, которые специфически связывают EpCAM человека, активируемым антителам к EpCAM и их иммуноконъюгатам, а также к способам получения и применения указанных антител, фрагментов антител, активируемых антител и иммуноконъюгатов для диагностики и лечения таких заболеваний, как злокачественное новообразование.

[0002] Адгезивная молекула эпителиальных клеток (EpCAM) представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа, содержащий внеклеточный домен, трансмембранный домен и единственный внутриклеточный домен. Экспрессия EpCAM у человека специфична для эпителия. Большинство эпителиальных клеток экспрессируют EpCAM, за исключением плоского эпителия и некоторых специфических типов эпителиальных клеток, таких как эпидермальные кератиноциты, гепатоциты, париетальные клетки желудка и миоэпителиальные клетки (Balzar et al., J. Mol. Med. 77:699-712 (1999); Momburg et al., Cancer Res 47:2883-2891 (1987)).

[0003] EpCAM обильно и однородно экспрессируется на карциномах человека различного происхождения (Went et al., Br. J. Cancer 94:128-35 (2006); Herlyn et al., Proc Natl. Acad. Sci. USA 76:1438-1442 (1979); Went et al., Hum. Pathol. 35:122-128 (2004)). EpCAM сверхэкспрессируется при подавляющем большинстве случаев злокачественных эпителиальных новообразований, включая, например, злокачественные новообразования яичников, злокачественные новообразования толстой кишки, злокачественные новообразования желудка, злокачественные новообразования предстательной железы и злокачественные новообразования легкого. Кроме того, было показано, что EpCAM экспрессируется на большинстве первичных, метастатических и диссеминированных НМРЛ (клетки немелкоклеточного рака легкого) (Passlick, Int. J. Cancer 87:548-552 (2000)), на аденокарциномах желудка и пищеводно–желудочного соединения (Martin, J. Clin. Pathol. 52:701-704 (1999)) и в клеточных линиях, полученных из колоректальных карцином, карцином поджелудочной железы и карцином молочной железы (Szala, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3542-3546 (1990), Packeisen, Hybridoma 18:37-40 (1999)). В другом исследовании иммуногистохимический анализ 108 образцов вторичных опухолей показал, что только в 4% случаев отсутствовала экспрессия EpCAM. EpCAM сверхэкспрессируется также в инициирующих злокачественное новообразование или раковых стволовых

клетках, выделенных из карциномы толстой кишки, молочной железы, поджелудочной железы и предстательной железы (O'Brien et al., Nature 445:106-110 (2007); Marhaba et al., Curr. Mol. Med. 8:784-804 (2008)).

[0004] Нормальные клетки экспрессируют EpCAM на базолатеральной стороне эпителиальной мембраны, тогда как раковые клетки сильно экспрессируют EpCAM на апикальной поверхности. Терапевтические средства на основе антител были разработаны для применения этой характеристики экспрессии EpCAM, поскольку нормальные клеточные EpCAM менее заметны и менее подвержены воздействию, что означает, что здоровые клетки могут быть не столь чувствительны к связыванию терапевтических антител к EpCAM.

[0005] В клинической практике использовали ряд антител к EpCAM, но по разным причинам они не дали результатов. Тестируемые антитела к EpCAM имеют несколько форматов, включая голые антитела, иммунотоксины и би- или триспецифические антитела (Baeuerle, Br. J. Cancer, 96:417-423 (2007)). Например, адекатумумаб (MT201), голое антитело к EpCAM, было протестировано в клинических исследованиях по лечению колоректального рака, злокачественных новообразований предстательной железы и молочной железы. Проблемы безопасности, с которыми сталкиваются в современных подходах на основе антител к EpCAM, включают системную непереносимость и острый панкреатит. Таким образом, хотя было несколько попыток разработать терапевтические антитела к EpCAM, существует значительная потребность в разработке новых терапевтических антител к EpCAM, которые преодолевают недостатки и ограничения ранее разработанных антител.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0006] В изобретении предложены антитела и фрагменты антител, которые специфически связывают EpCAM человека, а также активируемые антитела к EpCAM и иммуноконъюгаты, содержащие антитела, фрагменты антител и активируемые антитела. Также предложены полинуклеотиды, содержащие последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела, а также векторы, содержащие полинуклеотиды, и клетки, содержащие полинуклеотиды и векторы. В изобретении также предложены композиции, такие как фармацевтические композиции, содержащие антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела. Дополнительно предложены способы получения и применения антител к EpCAM, связывающих EpCAM фрагментов антител, активируемых антител и композиций. Такие способы включают применение антител, фрагментов антител, активируемых антител, иммуноконъюгатов и других

композиций для ингибирования роста опухоли, а также способы получения и применения антител, фрагментов антител, активируемых антител, иммуноконъюгатов и композиций для диагностики и лечения таких заболеваний, как злокачественное новообразование.

[0007] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено:

[1] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую последовательность $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5);

(b) CDR2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую последовательность $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7);

(c) CDR3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую последовательность $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран D и E, X_3 выбран из P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8);

(d) CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую последовательность $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TY\ LX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10);

(e) CDR2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) CDR3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую последовательность $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L, и Q, X_3 выбран из S, G, Y, и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11);

[2] антитело или фрагмент антитела по п. [1], причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W (SEQ ID NO: 6);

(b) CDR2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую последовательность $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7);

(c) CDR3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9);

(d) CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую последовательность $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10);

(e) CDR2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) CDR3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую последовательность AQX$_3$LELPNT, где X$_3$ выбран из S, G, Y, и N (SEQ ID NO: 12);

[3] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по [1] или [2], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы:

(a) SEQ ID NO: 13-15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) SEQ ID NO: 13-15, и 39-41, соответственно;

(c) SEQ ID NO: 13, 26, 15, и 39-41, соответственно; и

(d) SEQ ID NO: 13, 24, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

[4] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[3], причем антитело или фрагмент антитела связывается с KD 3,0 нМ или менее как с EpCAM человека, так и с EpCAM яванского макака;

[5] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. [4], причем антитело или фрагмент антитела специфически связывается с эпитопом в пределах внеклеточного домена EpCAM человека, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;

[6] антитело или фрагмент антитела по п. [5], причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYYIH (SEQ ID NO: 13);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) VH-CDR3, содержащую последовательность DGPWFAY (SEQ ID NO: 15);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) и VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41);

[7] антитело или фрагмент антитела по п. [4], причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYYIH (SEQ ID NO: 13);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) а VH-CDR3, содержащую последовательность DGPWFAY (SEQ ID NO: 15);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41);

[8] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. [3], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH и VL, выбранные из следующего:

(a) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

(b) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 87;

(c) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 55, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 87;

(d) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 56, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 88;

(e) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 55, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89; и

(f) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 56, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

[9] антитело или фрагмент антитела по п. [8], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 89;

[10] антитело или фрагмент антитела по п. [8], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 87;

[11] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. [8], причем антитело или фрагмент антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, выбранные из следующего

(a) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140;

(b) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 138;

(c) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 105, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 139;

(d) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 106, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 139;

(e) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 105, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140; и

(f) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 106, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140;

[12] антитело или фрагмент антитела по п. [11], причем антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 103 и LC с SEQ ID NO: 140;

[13] антитело или фрагмент антитела по п. [11], причем антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 103 и LC с SEQ ID NO: 138;

[14] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по [1] или [2], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40, и 41, соответственно;

(c) SEQ ID NO: 23, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно; и

(d) SEQ ID NO: 25, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

[15] антитело или фрагмент антитела по п. [14], причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYHIH (SEQ ID NO: 22);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) VH-CDR3, содержащую последовательность DGPWFAY (SEQ ID NO: 15);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41);

[16] антитело или фрагмент антитела по п. [14], причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYYIH (SEQ ID NO: 13);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) VH-CDR3, содержащую последовательность DGYWFAY (SEQ ID NO: 33);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41);

[17] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. [14],

причем антитело или фрагмент антитела содержит VH и VL, выбранные из следующего:

(a) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

(b) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

(c) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 76; и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89; и

(d) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 84, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

[18] антитело или фрагмент антитела по п. [17], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 89;

[19] антитело или фрагмент антитела по п. [17], причем антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 89;

[20] антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. [17], причем антитело или фрагмент антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, выбранные из следующего

(a) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 125, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140;

(b) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 127, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140;

(c) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 126; и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140; и

(d) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 134, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140;

[21] антитело или фрагмент антитела по п. [20], причем антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 125 и LC с SEQ ID NO: 140;

[22] антитело или фрагмент антитела по п. [20], причем антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 127 и LC с SEQ ID NO: 140;

[23] антитело или фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[22], причем антитело или фрагмент антитела представляет собой мышиное антитело, антитело отличного от человека млекопитающего, химерное, гуманизированное или человеческое антитело;

[24] антитело или фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[23], причем антитело представляет собой полноразмерное антитело;

[25] полноразмерное антитело по п. [24], причем антитело представляет собой человеческий IgG1;

[26] антитело или фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[23], причем фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fd, одноцепочечный Fv или scFv, дисульфидсвязанный F_v, домен V-NAR, IgNar, интраантитело, $IgG\Delta CH_2$, миниантитело, $F(ab')_3$, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, $мкАт_2$, $(scFv)_2$ или scFv-Fc;

[27] активируемое антитело, содержащее антитело или фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[26], причем активируемое антитело дополнительно содержит

(a) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом или фрагментом антитела, при этом расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом или фрагментом антитела, при этом маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии,

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент);

[28] активируемое антитело к EpCAM, содержащее:

(a) антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности члена, выбранного из группы:

(i) SEQ ID NO: 13-15, 42, 40, и 41, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 13-15, и 39-41, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 13, 26, 15, и 39-41, соответственно; и

(iv) SEQ ID NO: 13, 24, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

(c) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы;

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент

антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент);

[29] активируемое антитело к EpCAM по п. [28], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно;

[30] активируемое антитело к EpCAM по п. [29], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89;

[31] активируемое антитело к EpCAM по п. [30], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140;

[32] активируемое антитело к EpCAM по любому из п. [29]-[31], причем активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151-157;

[33] активируемое антитело к EpCAM по п. [32], причем активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155;

[34] активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [29]-[33], причем активируемое антитело содержит расщепляемый фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168 или 169;

[35] активируемое антитело к EpCAM, содержащее:

(a) антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(i) SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40, и 41, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 23, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно, и;

(iv) SEQ ID NO: 25, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

(c) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или

связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы;

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент);

[36] активируемое антитело к EpCAM по п. [35], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

[37] активируемое антитело к EpCAM по п. [36], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89;

[38] активируемое антитело к EpCAM по п. [37], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 125, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140;

[39] активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [36]-[38], причем активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151-157 и 162-167;

[40] активируемое антитело к EpCAM по п. [39], причем активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 162-167;

[41] активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [36]-[40], причем активируемое антитело содержит расщепляемый фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168 или 169;

[42] активируемое антитело к EpCAM по п. [35], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40, и 41, соответственно;

[43] активируемое антитело к EpCAM по п. [42], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89;

[44] активируемое антитело к EpCAM по п. [43], причем активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 127, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140;

[45] активируемое антитело к EpCAM по любому из п. [42]-[44], причем активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151-161;

[46] активируемое антитело к EpCAM по п. [45], причем активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 158-161;

[47] активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [42]-[46], причем активируемое антитело содержит расщепляемый фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168 или 169;

[48] клетка, продуцирующая антитело или связывающий EpCAM фрагмент антитела по любому из [1]-[26] или активируемое антитело по любому из [27]-[47];

[49] способ получения антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM, включающий:

(a) культивирование клетки по п. [48]; и,

(b) выделение антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM из клетки или клеточной культуры;

[50] способ по п. [49], в котором клетка представляет собой эукариотическую клетку;

[51] способ по п. [50], в котором клетка представляет собой клетку CHO;

[52] диагностический реагент, содержащий антитело или фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[26] или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [27]-[47];

[53] диагностический реагент по п. [52], причем антитело, фрагмент антитела или активируемое антитело помечено;

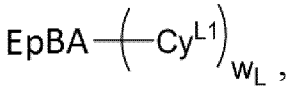
[54] диагностический реагент по п. [53], где метка выбрана из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего агента и иона металла;

[55] полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующих антитело или фрагмент антитела по любому из пп. [1]-[26] или активируемое антитело по любому из пп. [27]-[47];

[56] вектор или набор векторов, содержащие полинуклеотид по п. [55];

[57] клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. [55], или вектор по п. [56];

[58] иммуноконъюгат, представленный следующей формулой:

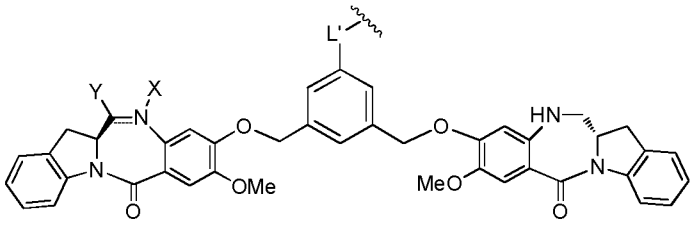


при этом:

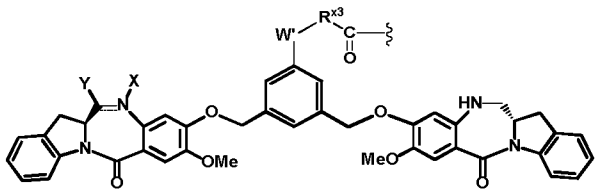
EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [1]-[47], которое ковалентно связано с Cy^{L1} через остаток лизина;

W_L равен целому числу от 1 до 20; и

Cy^{L1} представлен следующей формулой:



или



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что когда она представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H, или (C_1-C_4)алкил; и когда она представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H или защитный фрагмент на амин, и Y представляет собой -OH или $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль;

W’ представляет собой $-NR^{e'}$,

$R^{e'}$ представляет собой $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n равен целому числу от 2 до 6;

R^k представляет собой -H или -Me;

R^{x3} представляет собой (C_1-C_6)алкил;

L’ представлен следующей формулой:

$-NR_5$-P-C(=O)-$(CR_aR_b)_m$-C(=O)- (B1’); или

$-NR_5$-P-C(=O)-$(CR_aR_b)_m$-S-Z^{s1}- (B2’);

R_5 представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил;

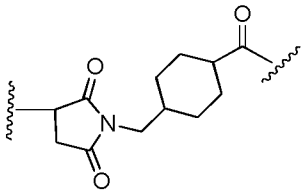
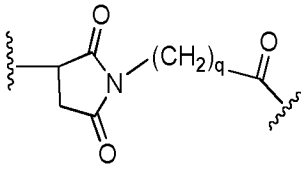
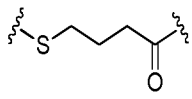
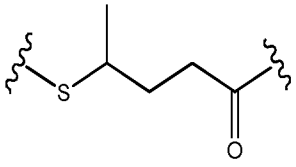
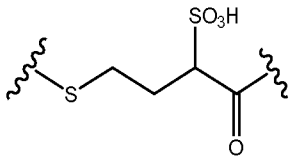
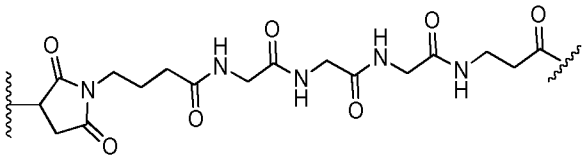
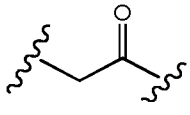
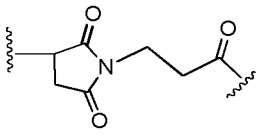
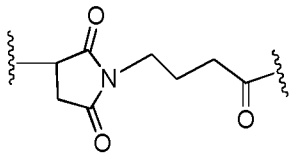
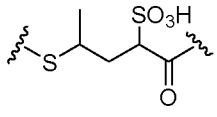
P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

каждый из R_a и R_b, в каждом случае независимо, представляет собой -H, (C_1-

C_3)алкил или заряженный заместитель или ионизируемую группу Q;

m равен целому числу от 1 до 6; и

Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:


(b1);

(b2);

(b3);

(b4);

(b5),

(b6),

(b7);

(b8);

(b9); и

(b10),

где q равен целому числу от 1 до 5;

[59] иммуноконъюгат по п. [58], где оба из R_a и R_b представляют собой H; и R_5 представляет собой H или Me;

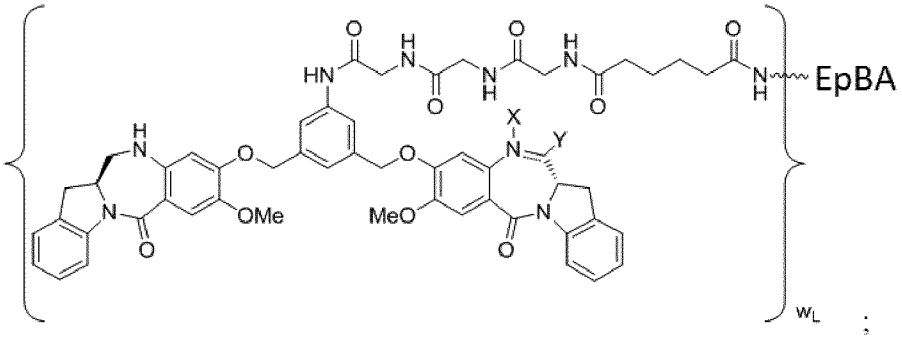
[60] иммуноконъюгат по п. [58] или п. [59], где P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков;

[61] иммуноконъюгат по любому из [58]-[60], где P выбран из Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 215), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 216), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 217), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe и Gln-Ala. Более конкретно, P представляет собой Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, или D-Ala-D-Ala;

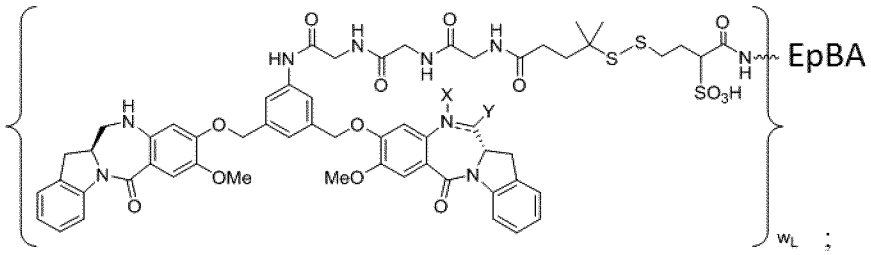
[62] иммуноконъюгат по п. [61], где P представляет собой Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala или D-Ala-D-Ala;

[63] иммуноконъюгат по любому из пп. [58]-[62], где Q представляет собой -SO3H, или его фармацевтически приемлемая соль;

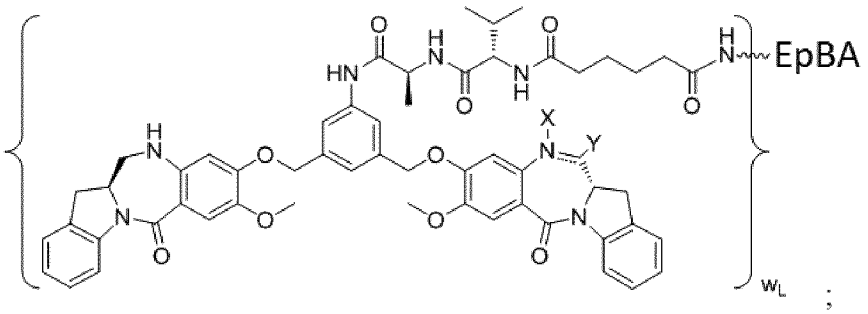
[64] иммуноконъюгат по п. [58], где иммуноконъюгат представлен следующей формулой:



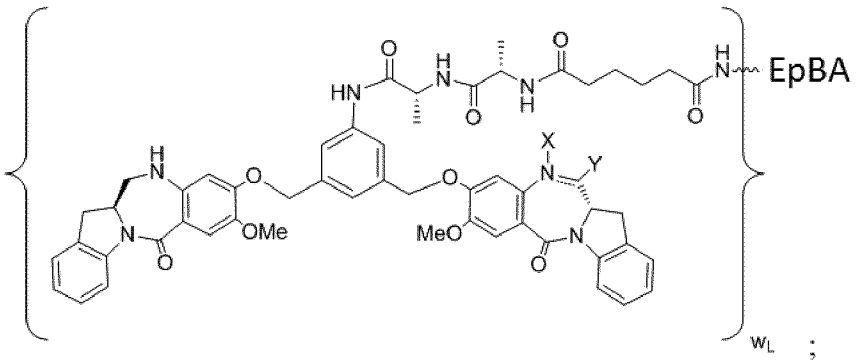
;



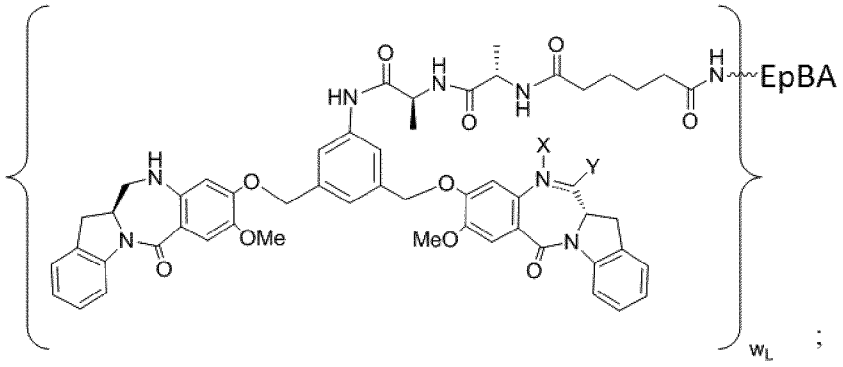
;

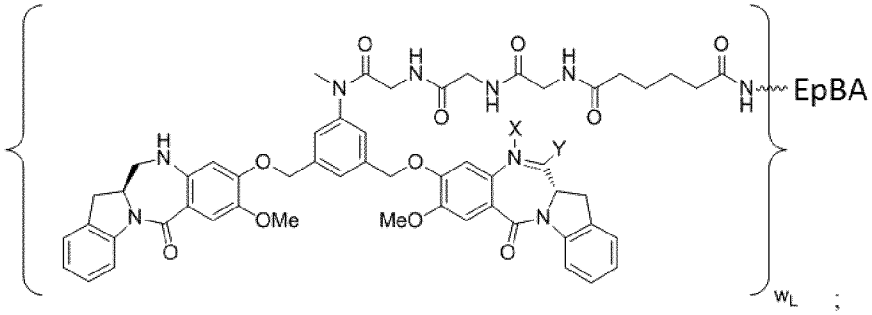


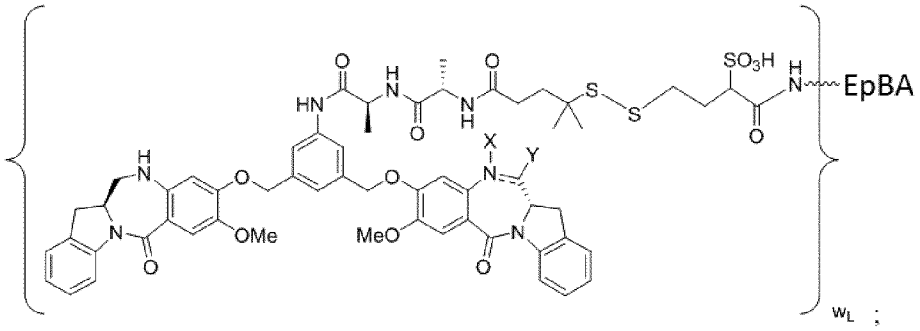
;

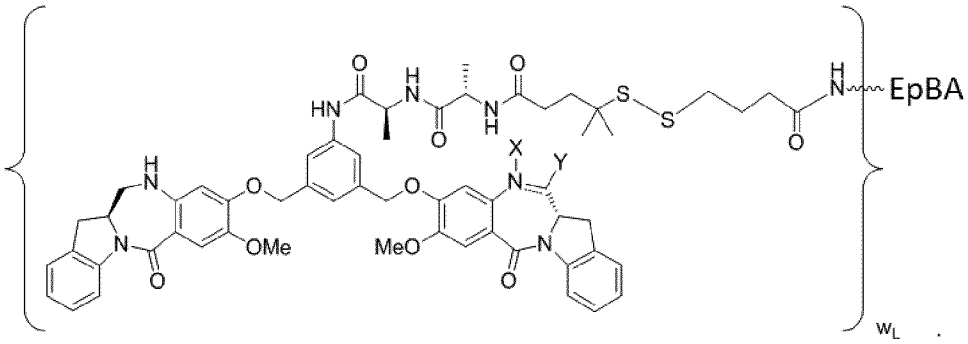


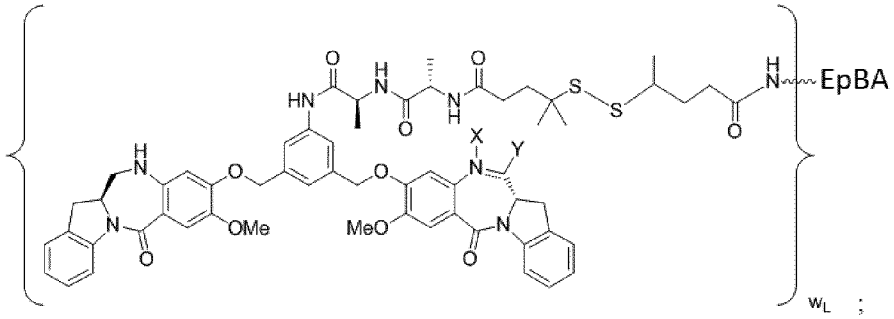
;

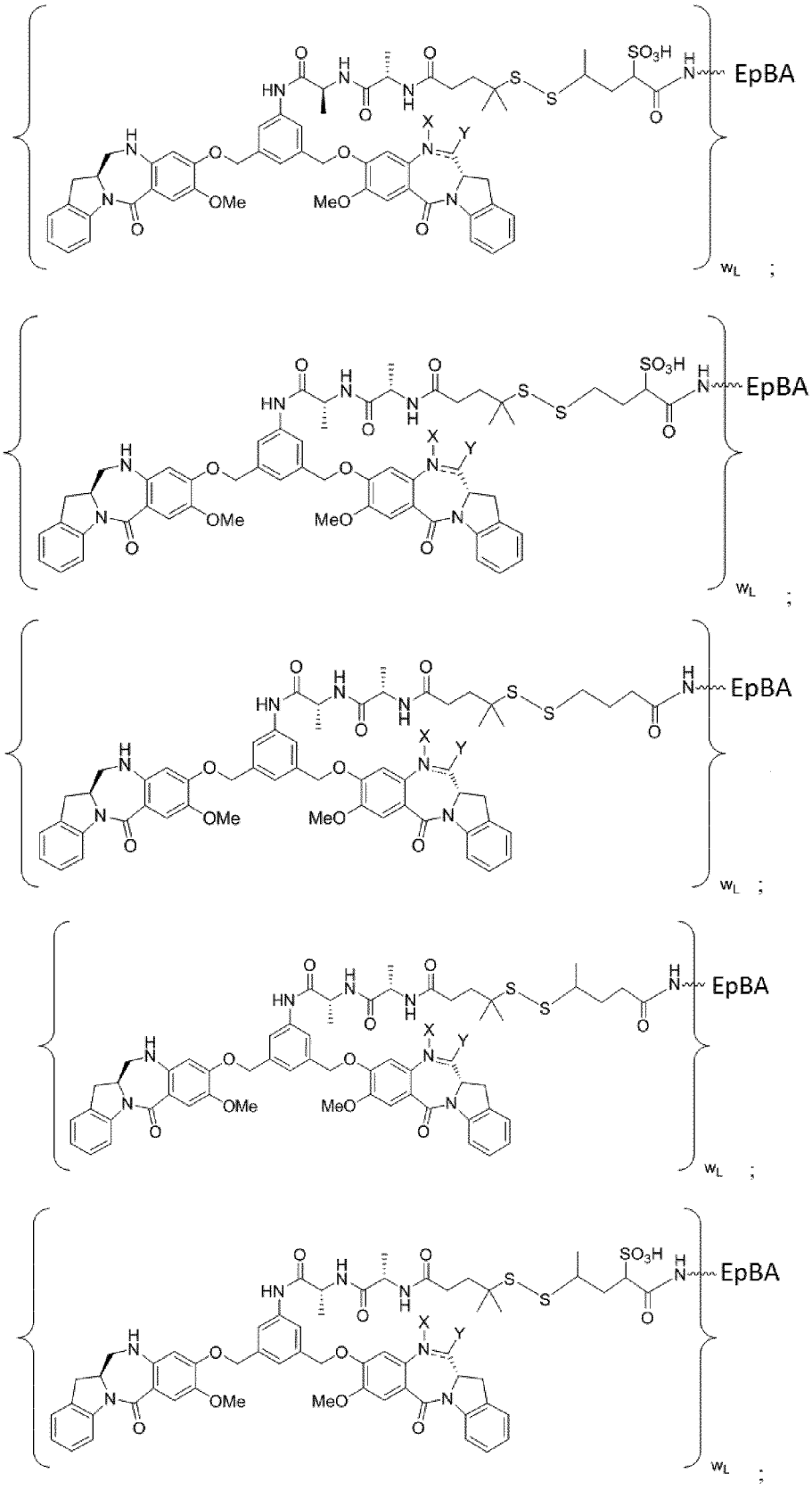

EpBA
w_L ;

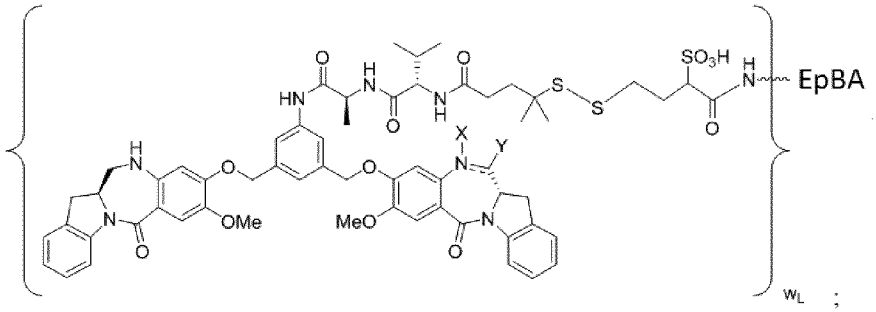

EpBA
w_L ;

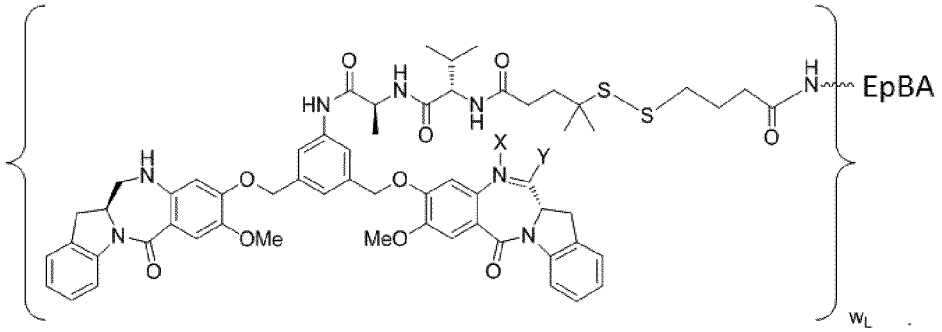

EpBA
w_L ;

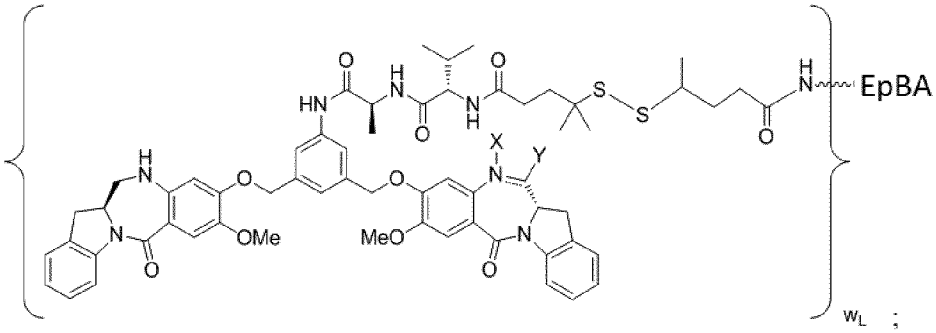

EpBA
w_L ;

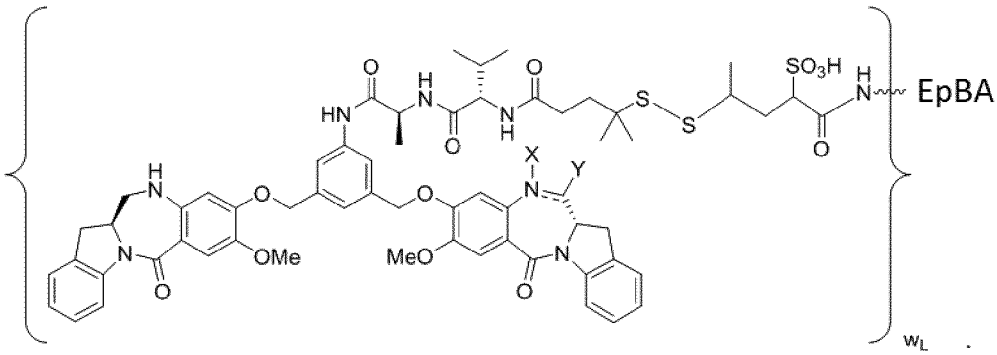

EpBA
w_L ;


EpBA
w_L ;
EpBA
w_L ;
EpBA
w_L ;
EpBA
w_L ;
EpBA
w_L ;

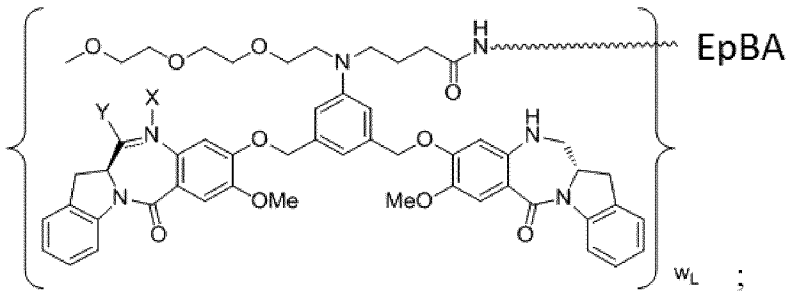








или



или его фармацевтически приемлемая соль, где

W_L равно целому числу от 1 до 10; двойная линия == между N и C представляет

собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что, когда это двойная связь, X отсутствует, а Y представляет собой -H; и когда это одинарная связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой -OH или $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль;

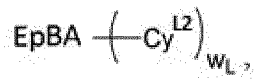
[65] иммуноконъюгат по любому из пп. [58]-[64], где двойная линия между N и C == представляет собой двойную связь, X отсутствует, а Y представляет собой -H;

[66] иммуноконъюгат по любому из пп. [58] - [64], где двойная линия между ==N и C представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой -SO3H, или его фармацевтически приемлемая соль;

[67] иммуноконъюгат по п. [66], где Y представляет собой -SO3H, -SO3Na или -SO3K;

[68] иммуноконъюгат по п. [66], где Y представляет собой –SO3Na;

[69] иммуноконъюгат, представленный следующей формулой:

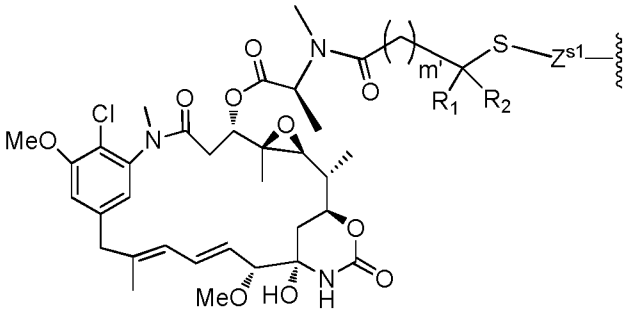


при этом:

EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. [1]-[47], которое ковалентно связано с Cy^{L2} через остаток лизина;

W_L равен целому числу от 1 до 20;

Cy^{L2} представлен следующей формулой:

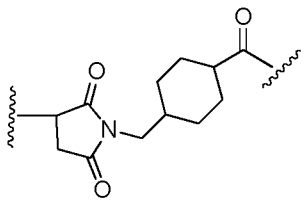


,

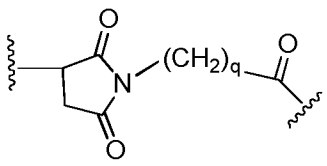
m’ равен 1 или 2;

Каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой H или (C_1-C_3)алкил; и

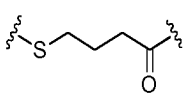
Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:



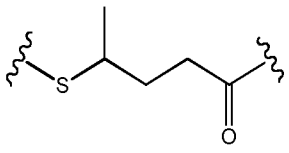
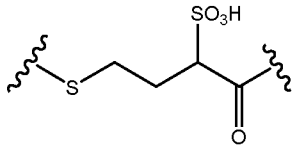
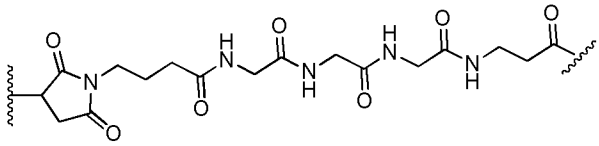
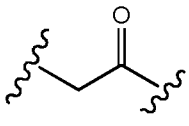
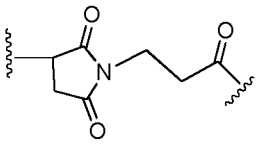
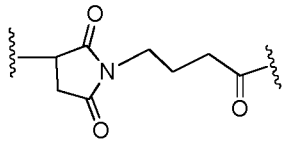
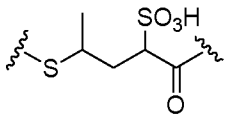
(b1);



(b2);



(b3);

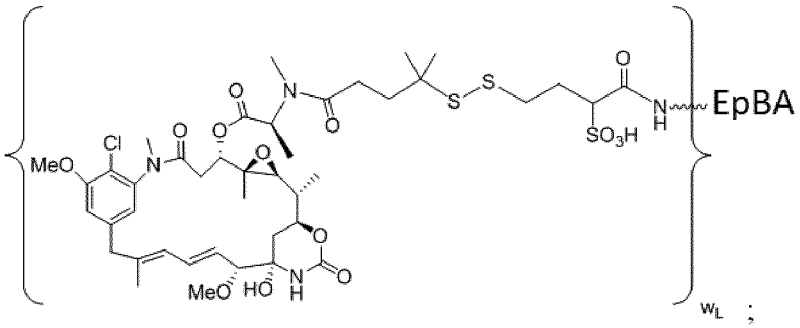

(b4);

(b5),

(b6),

(b7);

(b8);

(b9), и

(b10),

где q равен целому числу от 1 до 5;

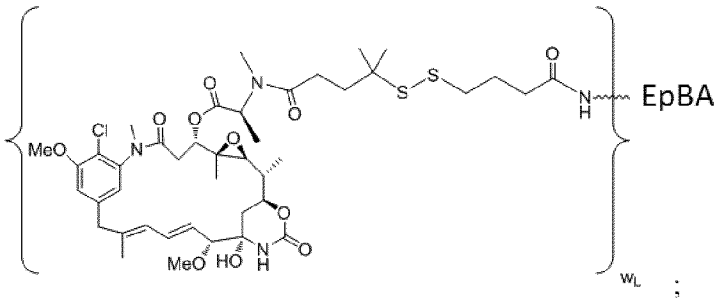
[70] иммуноконъюгат по п. [69], где m' равен 1, и оба из R_1 и R_2 представляют собой H;

[71] иммуноконъюгат по п. [69], где m' равен 2, и оба из R_1 и R_2 представляют собой Me;

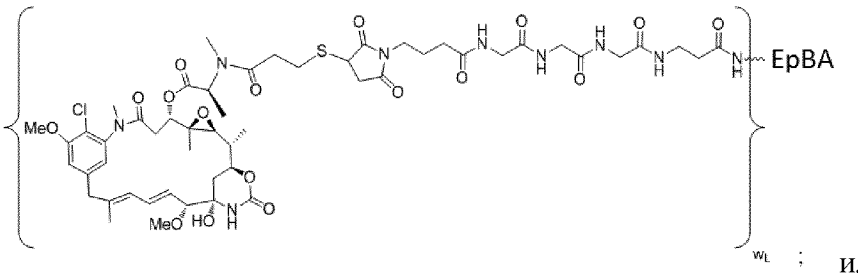
[72] иммуноконъюгат по п. [69], где иммуноконъюгат представлен следующей формулой:



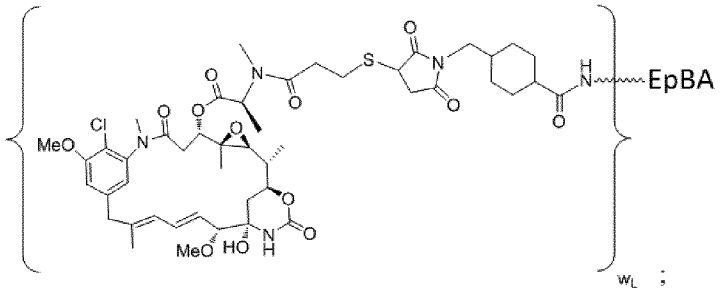
;



;



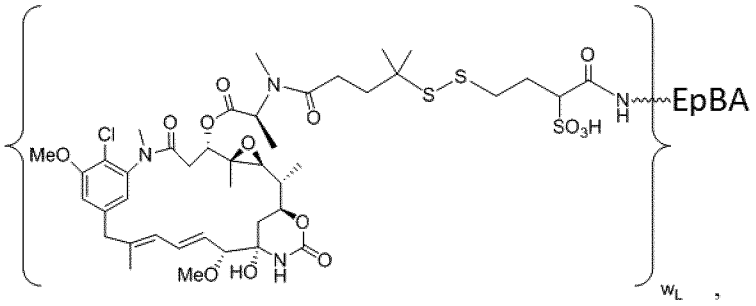
; или



;

или его фармацевтически приемлемая соль, где W_L равен целому числу от 1 до 10;

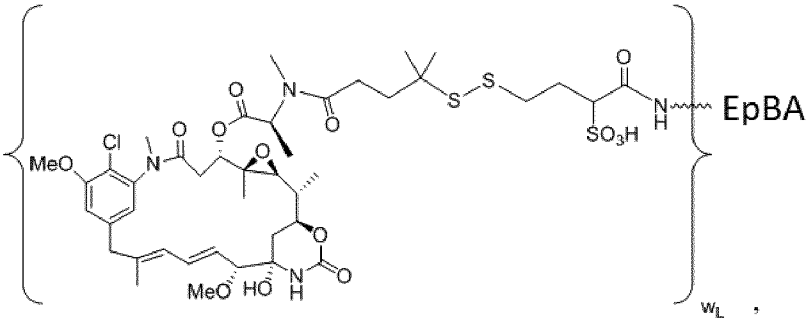
[73] иммуноконъюгат по п. [69], где иммуноконъюгат представлен следующей формулой:



,

или его фармацевтически приемлемая соль.

[74] иммуноконъюгат, представленный следующей формулой:



,

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

W_L равен целому числу от 1 до 10;

EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно;

[75] иммуноконъюгат по п. [74], где выделенное антитело или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), имеющие последовательности SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 89, соответственно;

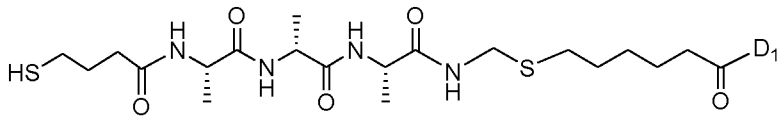
[76] иммуноконъюгат по п. [74], где выделенное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, имеющие последовательности SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 140, соответственно;

[77] иммуноконъюгат по любому из пп. [74]-[76], где иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, содержащее маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151-157;

[78] иммуноконъюгат по п. [77], где маскирующий фрагмент имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155;

[79] иммуноконъюгат по п. [77] или п. [78], где иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, дополнительно содержащее расщепляемый фрагмент с SEQ ID NO: 168 или SEQ ID NO: 169;

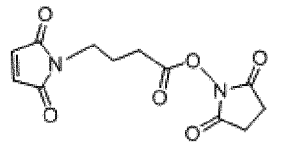
[80] иммуноконъюгат, содержащий EpBA, связанный с соединением майтанзиноидом DM21L (также называемым LDL-DM), представленный следующей структурной формулой:



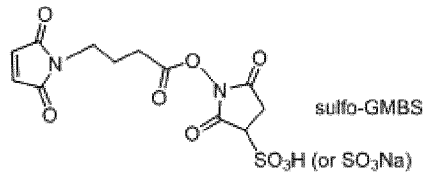
(D-2);

через линкер N-сукцинимидиловый эфир γ-малеимидомасляной кислоты (GMBS) или N-(γ-малеимидобутрилокси)сульфосукцинимидный эфир (сульфо-GMBS или sGMBS), где EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM в соответствии с любым из [1]-[47];

[81] иммуноконъюгат по п. [80], где линкеры GMBS и сульфо-GMBS (или sGMBS) представлены следующей формулой:

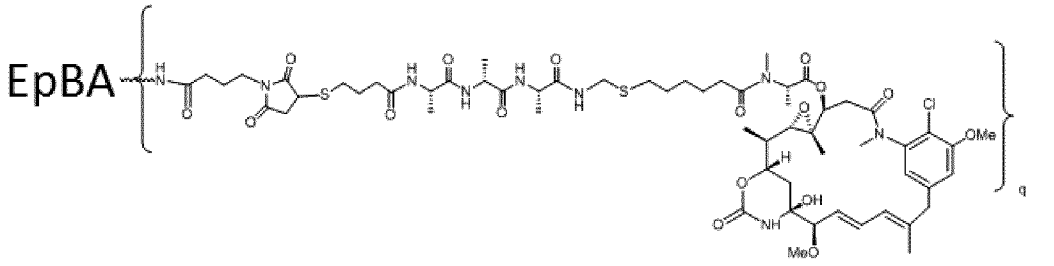


GMBS



sulfo-GMBS

[82] иммуноконъюгат п. [80] или п. [81], представленный следующей формулой:



,

при этом:

EpBA связан с соединением майтанзиноидом через аминогруппу Lys, где q равен целому числу от 1 до 10;

[83] иммуноконъюгат по любому из пп. [80]-[82], где EpBA содержит VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно;

[84] иммуноконъюгат по п. [83], где EpBA содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), имеющие последовательности SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 89, соответственно;

[85] иммуноконъюгат по [84], где EpBA содержит тяжелую цепь и легкую цепь, имеющую последовательности SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 140, соответственно;

[86] иммуноконъюгат по любому из пп. [83]-[85], где иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, содержащее маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151-157;

[87] иммуноконъюгат по п. [86], где маскирующий фрагмент имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155;

[88] иммуноконъюгат по п. [86] или п. [87], где иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, дополнительно содержащее расщепляемый фрагмент с SEQ ID NO: 168 или SEQ ID NO: 169;

[89] иммуноконъюгаты по любому из пп. [58]-[88], где фармацевтически приемлемая соль представляет собой соль натрия или калия;

[90] фармацевтическая композиция, содержащая антитело, антигенсвязывающий фрагмент или активируемое антитело по любому из пп. [1]-[47] и фармацевтически приемлемый носитель;

[91] фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из пп. [58]-[88] и фармацевтически приемлемый носитель;

[92] Способ уничтожения раковой клетки, который включает приведение в контакт раковой клетки с эффективным количеством антитела, антигенсвязывающего фрагмента или активируемого антитела по любому из пп. [1]-[47], иммуноконъюгата по любому из

пп. [58]-[88] или фармацевтической композиции по п. [90] или п. [91];

[93] способ по п. [92], где раковая клетка представляет собой клетку злокачественного эпителиального новообразования, клетку злокачественного новообразования молочной железы, клетку злокачественного новообразования легкого, клетку злокачественного новообразования желудка, клетку колоректального рака, клетку злокачественного новообразования предстательной железы, клетку злокачественного новообразования яичника, клетку злокачественного новообразования толстой кишки, клетку злокачественного новообразования прямой кишки или раковую стволовую клетку;

[94] способ по п. [92], где раковая клетка представляет собой клетку злокачественного новообразования яичника, клетку злокачественного новообразования матки, клетку злокачественного новообразования желудка, клетку злокачественного новообразования поджелудочной железы или клетку колоректального рака;

[95] способ лечения злокачественного новообразования, которое экспрессирует EpCAM, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. [1]-[47], иммуноконъюгата по любому из пп. [58]-[88] или фармацевтической композиции по п. [90] или п. [91] нуждающемуся в этом субъекту.

[96] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное эпителиальное новообразование;

[97] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование желудка, колоректальный рак, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование толстой кишки, злокачественное новообразование пищевода, злокачественное новообразование трахеи, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование мочевого пузыря, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование прямой кишки, злокачественное новообразование тонкой кишки или их метастазы;

[98] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование поджелудочной железы, колоректальный рак или их метастазы;

[99] способ лечения по п. [97], где злокачественное новообразоние представляет собой злокачественное новообразование легкого;

[100] способ лечения по п. [99], где злокачественного новообразования легкого

представляет собой немелкоклеточный рак легкого;

[101] способ лечения по п. [100], где немелкоклеточный рак легкого представляет собой неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого;

[102] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников;

[103] способ лечения по [95], где злокачественное новообразование представляет собой трижды негативный рак молочной железы;

[104] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак;

[105] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование пищевода;

[106] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование желудка;

[107] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование матки;

[108] способ лечения по п. [95], где злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование поджелудочной железы;

[109] Антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или его иммуноконъюгат, содержащие (i) тяжелую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125343 и (ii) легкую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125342;

[110] активируемое антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент активируемого антитела или его иммуноконъюгат, содержащий (i) тяжелую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125343, и (ii) легкую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125344; и/или

[111] активируемое антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент активируемого антитела или его иммуноконъюгат, содержащий (i) тяжелую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как

PTA-125343, и (ii) легкую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125345.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ/ФИГУР

[0008] На Фиг.1A и 1B показаны кривые связывания мышиного антитела к EpCAM mEpCAM23 с клетками HSC2 (Фиг. 1A) и эпителиальными клетками почки яванского макака (Фиг. 1B).

[0009] На Фиг. 2A и 2B показаны выравнивания последовательностей между вариабельными областями исходных последовательностей легкой и тяжелой цепи muEpCAM-23 и их наиболее близкие совпадения с последовательностями зародышевой линии человека. На основании результатов выравнивания последовательности зародышевой линии человека, выбранные в качестве акцепторных каркасных областей для доменов V_L и V_H антитела EpCAM-23, представляли собой IGKV2D-29*02 (Фиг. 2A) и IGHV1-3*01 (Фиг. 2B), соответственно.

[0010] На Фиг. 3A-3F показано кривые связывания различных гуманизированных антител mEpCAM23. В частности, на Фиг. 3A показано связывание mEpCAM23 с клетками HSC2, на Фиг. 3B показано связывание mEpCAM23 с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака, на Фиг. 3C показано связывание различных гуманизированных антител EpCAM23 с клетками HSC2, а на Фиг. 3D показано связывание различных гуманизированных антител EpCAM23 с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака. На Фиг. 3E показано связывание сайт-специфически модифицированного антитела huEpCAM23Gv4.2-C442 с клетками HSC2, а на Фиг.3F показано связывание того же антитела с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака.

[0011] На Фиг. 4A и 4B показано выравнивание последовательностей вариабельных областей исходного мышиного антитела EpCAM-23, привитой версии Gv2.2 и привитой версии Gv4.2. В частности, Фиг. 4A показано выравнивание вариабельных областей легких цепей антитела, а на Фиг. 4B показано выравнивание вариабельных областей тяжелых цепей антител.

[0012] На Фиг. 5A-5N показаны кривые связывания для различных аффинных вариантов huEpCAM23Gv4.2 на клетках HSC2 и первичных эпителиальных клетках почки яванского макака. В частности, на Фиг. 5A показано связывание Gv4a.2, Gv4b.2, и Gv4c.2 с huEpCAM-mFc; на Фиг. 5B показано связывание Gv4a.2, Gv4b.2, и Gv4c.2 с cynoEpCAM-mFc; на Фиг. 5C показано связывание Gv4.2a, Gv4.2b, Gv4.2c, и Gv4.2d с

huEpCAM-mFc; на Фиг. 5D показано связывание Gv4.2a, Gv4.2b, Gv4.2c, и Gv4.2d с cynoEpCAM-mFc; на Фиг. 5E показано связывание Gv4a.2a, Gv4b.2a, и Gv4c.2a с клетками HSC2; на Фиг. 5F показано связывание Gv4a.2a, Gv4b.2a, и Gv4c.2a с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака; на Фиг. 5G показано связывание Gv4a.2b, Gv4a.2d, Gv4b.2b, Gv4b.2d, Gv4c.2b, и Gv4c.2d с клетками HSC2; и на FIG. 5H показано связывание Gv4a.2b, Gv4a.2d, Gv4b.2b, Gv4b.2d, Gv4c.2b, и Gv4c.2d с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака. На Фиг. 5I показано связывание Gv4.2H, Gv4.2K, Gv4.2L, Gv4.2O, Gv4.2P, Gv4.2Q, Gv4.2R, и Gv4.2S на клетках HSC2; на Фиг. 5J показано связывание 1361-D, 1361-H, 1361-I, и 1361-L на клетках HSC2; и на Фиг. 5K показано связывание 1565-A, 1565-F, 1565-G, 1565-S, 1565-T, 1565-V, и 1565-Y на клетках HSC2. На Фиг. 5L показано Gv4.2H, Gv4.2K, Gv4.2L, Gv4.2O, Gv4.2P, Gv4.2Q, Gv4.2R, и Gv4.2S на первичных эпителиальных клетках почки яванского макака; на Фиг. 5M показано связывание 1361-D, 1361-H, 1361-I, и 1361-L на эпителиальных клетках почки яванского макака; и на Фиг. 5N показано связывание 1565-A, 1565-F, 1565-G, 1565-S, 1565-T, 1565-V, и 1565-Y на первичных эпителиальных клеток почки яванского макака.

[0013] На Фиг. 6A и 6B показаны кривые связывания интактных и uPA-активированных активируемых антител huEpCAM23Gv4.2 с различными маскирующими фрагментами на клетках HSC2 и первичных эпителиальных клетках почки яванского макака. В частности, на Фиг. 6A показано связывание интактного и активированного uPA huEpCAM23 с субстратом 3014 и с маскирующими фрагментами Ep01-2, Ep02, Ep03, Ep04, Ep05, Ep07 и Ep11 на клетках HSC2, а на Фиг. 6B показано связывание интактного и активированного uPA huEpCAM23 с субстратом 3014 и маскирующими фрагментами Ep02, Ep03, Ep04, Ep05 и Ep07 на первичных эпителиальных клетках почки яванского макака.

[0014] На Фиг. 7A и 7B показаны кривые связывания различных конъюгатов обработанное uPA активируемое антитело-лекарственное средство huEpCAM23 на клетках HSC2. В частности, на Фиг. 7A показано связывание обработанного uPA huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 с субстратом 3014 и с маскирующими фрагментами Ep01-2, Ep02, Ep03, Ep04, Ep05, Ep07 и Ep11 на клетках HSC2, а на Фиг. 7B показано связывание активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-lys-DGN549 с субстратом 3014 и с маскирующими фрагментами Ep01-2, Ep02, Ep03, Ep04, Ep05, Ep07 и Ep11 на клетках HSC2.

[0015] На Фиг. 8A-8D показаны кривые связывания различных конъюгатов активируемое антитело-лекарственное средство с субстратом 2014 или 3014 на клетках

HSC2. В частности, на Фиг. 8A показано связывание интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4 на клетках HSC2, на Фиг. 8B показано связывание интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-sSPDB-DM4 на клетках HSC2, на Фиг. 8C показано связывание интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-lys-DGN549 на клетках HSC2, и на Фиг. 8D интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-GMBS-DM21L и интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-GMBS-DM21L на клетках HSC2.

[0016] На Фиг. 9 показано выравнивание внеклеточного домена EpCAM человека (SEQ ID NO: 1) и EpCAM мыши (SEQ ID NO: 210) после расщепления сигнального пептида.

[0017] На Фиг. 10A и 10B показано выравнивание внеклеточной области EpCAM человека (SEQ ID NO: 1), EpCAM мыши (SEQ ID NO: 210) и различных химеризованных вариантов EpCAM (SEQ ID NO: 211-214). На Фиг. 10A показано выравнивание между аминокислотными остатками 1-160, а на Фиг. 10B показано выравнивание аминокислотных остатков 161-243.

[0018] На Фиг. 11 показаны кривые связывания huEpCAM23Gv4.2 с внеклеточными доменами EpCAM человека и EpCAM мыши.

[0019] На Фиг. 12A-12K показаны кривые доза-ответ конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) huEpCAM23Gv4.2 на различных линиях клеток. В частности, на Фиг. 12A-12E показаны кривые доза-ответ huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 на клетках H1568 (Фиг. 12A), клетках H292 (FIG. 12B), на клетках H2110 (Фиг. 12C), клетках LoVo (Фиг. 12D), и на клетках Detroit562 (Фиг. 12E). На Фиг. 12F показаны кривые дозы-ответ huEpCAM23Gv4.2-lys-DGN549 и huEpCAM23Gv4.2-C442-DGN549 на клетках H2110. На Фиг. 12G-12K показаны кривые доза-ответ huEpCAM23Gv4.2-GMBS-DM21L на клетках Calu3 (Фиг. 12G), клетках Detroit562 (Фиг. 12H), клетках EBC-1 (Фиг. 12I), клетках H2110 (Фиг. 12J), и клетках H441 (Фиг. 12K).

[0020] На Фиг. 13A-13D показаны кривые доза-ответ интактных и активированных uPA конъюгатов активируемое антитело-лекарственное средство (AADC) huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 в различных линиях клеток. В частности, кривые доза-ответ интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4 и интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-sSPDB-DM4 показаны на клетках Calu3 (Фиг. 13A), клетках OV90 (Фиг. 13B), клетках EBC-1 (Фиг. 13C) и клетках H2110 (Фиг. 13D).

[0021] На Фиг. 14A-14D показаны кривые доза-ответ интактных и активированных uPA AADC huEpCAM23Gv4.2-GMBS-DM21L на различных линиях клеток. В частности,

кривые доза-ответ интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-GMBS-DM21L и интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-GMBS-DM21L показаны на клетках Calu3 (Фиг. 14A), клетках Detroit562 (Фиг. 14B), клетках EBC-1 (Фиг. 14C) и клетках H2110 (Фиг. 14D).

[0022] На Фиг. 15A-15D показаны кривые доза-ответ интактных и активированных uPA huEpCAM23- lys-DGN549 на различных линиях клеток. В частности, кривые доза-ответ интактного и активированного uPA huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-lys-DGN549 показаны на клетках H2110 (Фиг. 15A), клетках EBC-1 (Фиг. 15B), клетках Calu3 (Фиг. 15C), и клетках OV90 (Фиг. 15D).

[0023] На Фиг. 16 показана противоопухолевая активность huEpCAM23Gv4.2-lys-DGN549 в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого H2110.

[0024] На Фиг. 17A-17F показана противоопухолевая активность различных AADC huEpCAM23Gv4.2 в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого H2110. В частности, на Фиг. 17A показана противоопухолевая активность huEpCAM23-lys-DGN549 с маскирующими фрагментами Ep02, Ep01, Ep11, и Ep04, на Фиг. 17B показана противоопухолевую активность huEpCAM23-lys-DGN549 с маскирующими фрагментами Ep03, Ep05, Ep07, и Ep04, и на Фиг. 17Споказана противоопухолевая активность huEpCAM23-Ep05-3014-lys-DGN549 и huEpCAM23-Ep07-3014-lys-DGN549 по сравнению с нерасщепляемыми конъюгатами. На Фиг. 17D показана противоопухолевая активность huEpCAM23Gv4.2-Ep01-02-2014-sSPDB-DM4 по сравнению с нерасщепляемым конъюгатом и с ADC huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4, на Фиг. 17E показана противоопухолевая активность huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4 и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-sSPDB-DM4 по сравнению с нерасщепляемым конъюгатом, и на Фиг. 17F показана противоопухолевая активность huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-lys-DGN549 и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-lys-DGN549 по сравнению с нерасщепляемым конъюгатом.

[0025] На Фиг. 18 показана противоопухолевая активность различных AADC huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого Calu3.

[0026] На Фиг. 19 показана противоопухолевая активность различных AADC huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 в модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого H292.

[0027] На Фиг. 20 показана противоопухолевая активность Ep05-3014-DM4, Ep05-2014-DM4, Ep05-3014-DM21 и Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат ПКРГШ Detroit 562.

[0028] На Фиг. 21 показана противоопухолевая активность Ep05-3014-DM21 и Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат НМРЛ NCI-H441.

[0029] На Фиг. 22 показана противоопухолевая активность Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат EOC OV-90.

[0030] На Фиг. 23 показана противоопухолевая активность Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат НМРЛ Calu-3.

[0031] На Фиг. 24 показана переносимость нацеленного на EpCAM ADC (huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 (анти-EpCAM-DM4)) и нацеленного на EpCAM AADC (huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4 (M05-2014-DM4)) и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-sSPDB-DM4 (M05-3014-DM4)) у яванских макак.

[0032] На Фиг. 25A-25E показан химический состав сыворотки яванских макак, которым вводили нацеленный на EpCAM ADC (huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4), или нацеленный на EpCAM AADC (huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4). В частности, на Фиг. 25A показаны соотношения A/G, на Фиг. 25B показаны концентрации азота мочевины, на Фиг. 25C показаны концентрации креатинина, на Фиг. 25D показаны концентрации липазы, а на Фиг. 25E показаны концентрации амилазы.

[0033] На Фиг. 26 показан фармакокинетический профиль яванских макак, получающих 8 мг/кг нацеленного на EpCAM ADC (huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 (Anti-EpCAM-DM4 ADC)) или 8 мг/кг нацеленного на EpCAM AADC (huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4 (M05-2014-DM4 AADC)) или huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-sSPDB-DM4 (M05-3014-DM4 AADC)).

[0034] На Фиг. 27 показана переносимость huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L (Ep05-2014-DM21L) и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L (Ep05-3014-DM21L) у яванских макак.

[0035] На Фиг. 28A-28E показан химический состав сыворотки яванских макак, которым вводили 12 мг/кг huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L (Ep05-2014-DM21L) и huEpCAM 23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L (Ep05-3014-DM21L). В частности, на Фиг. 28A показаны соотношения A/G, на Фиг. 28B показаны концентрации азота мочевины, на Фиг. 28C показаны концентрации креатинина, на Фиг. 28D показаны концентрации липазы, а на Фиг. 28E показаны концентрации амилазы.

[0036] На Фиг. 29 показан фармакокинетический профиль яванского макак, получавших 12 мг/кг huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L (Ep05-2014-DM21).

[0037] На Фиг. 30 показан расширенный анализ экспрессии EpCAM в тканевых микроматрицах, специфичных для признаков.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ СУЩНОСТИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0038] В изобретении предложены антитела и фрагменты антигенсвязывающих антител, которые специфически связывают EpCAM человека, включая активируемые антитела (активируемые формы антител к EpCAM или фрагменты связывающих EpCAM антител) и иммуноконъюгаты, содержащие антитела, фрагменты антител и активируемые антитела. Известно, что EpCAM связан с межклеточной адгезией в эпителии и участвует в сигналинге, дифференцировке, пролиферации и миграции клеток. Сверхэкспрессия EpCAM участвует в патогенезе заболеваний и нарушений, таких как злокачественное новообразование. Например, EpCAM высоко экспрессируется при различных типах злокачественных новообразований, таких как, например, злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование печени, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование головы и шеи, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное новообразование поджелудочной железы, злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование толстой кишки и злокачественное новообразование почки, и большинство злокачественных новообразований (и метастазов) эпителиального происхождения. EpCAM также высоко экспрессируется в инициирующих опухоль / раковых стволовых клетках. Предложенные антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител, активируемые антитела к EpCAM и иммуноконъюгаты имеют применение, которое включает лечение таких заболеваний и злокачественных новообразований.

Определения

[0039] Для облегчения понимания ниже приводится определение ряда терминов и фраз.

[0040] Используемые в данном документе термины «адгезивная молекула эпителиальных клеток» или «EpCAM» относятся к любой природной EpCAM человека, если не указано иное. Термин также включает встречающиеся в природе варианты EpCAM, например, сплайс-варианты, аллельные варианты и изоформы. Полипептиды EpCAM могут быть выделены из множества источников, таких как ткань человека или яванского макака, или других биологических образцов, или получены известными рекомбинантными или синтетическими методами. EpCAM также известен как CD326, антиген 17-1A, HEA125, MK-1, EGP-2, EGP314, EGP40, GA733-2, KSA, TACSTD1, TROP1, KS1/4, M4S1, DIAR5, MIC18, HNPCC8 и ESA. Примеры последовательностей EpCAM включают, но не ограничиваются, идентификационный номер NCBI NP_002345.2 (аминокислотные остатки 24-314 соответствуют зрелой EpCAM, аминокислоты 24-265 соответствуют внеклеточной области зрелой EpCAM (SEQ ID NO: 1)). Внеклеточную

область зрелой EpCAM можно дополнительно разделить на три домена: D1 (аминокислоты 1-36 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 2)), D2 (аминокислоты 43-112 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 3)) и D3 (аминокислоты 113-243 из SEQ ID NO: 1 (SEQ ID NO: 4)).

[0041] Термины «антитело» и «антигенсвязывающий фрагмент антитела» и подобные, используемые в данном документе, включают любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, такую как, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере одну определяющая комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее антигенсвязывающую часть. Такое антитело необязательно дополнительно влияет по меньшей мере на одну активность EpCAM, например, но не ограничиваясь этим, когда такое антитело модулирует, снижает, увеличивает, противодействует, агонизирует, частично агонизирует, частично противодействует, смягчает, облегчает, блокирует, ингибирует, отменяет и/или препятствует по меньшей мере одной активности или связыванию EpCAM in vitro, in situ, in vivo и/или ex vivo. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела влияет по меньшей мере на одну опосредованную EpCAM активность или функцию, выбранную из: связывания лиганда, сигналинга рецептора, ассоциации с мембраной, миграции клеток, пролиферации клеток, активности связывания рецептора, продукции и/или синтеза РНК, ДНК или белка.

[0042] Антитела представляют собой гетеротетрамерные гликопротеины, состоящие из двух идентичных легких цепей (LC) и двух идентичных тяжелых цепей (HC). Как правило, каждая легкая цепь связана с тяжелой цепью одной ковалентной дисульфидной связью, в то время как количество дисульфидных связей варьируется между тяжелыми цепями разных изотипов иммуноглобулинов. Каждая тяжелая и легкая цепь также имеет разнесенные внутрицепочечные дисульфидные мостики. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце вариабельную область (VH), за которой следует ряд константных доменов. Каждая легкая цепь имеет вариабельную область на одном конце (VL) и константный домен на другом конце; константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи, а вариабельная область легкой цепи выровнена с вариабельной областью тяжелой цепи. Легкие цепи антител любых видов позвоночных можно относить в зависимости от аминокислотных последовательностей их константных доменов к одному из двух четко отличающихся типов, а именно к каппа и лямбда. Иммуноглобулины можно отнести к пяти основным классам, а именно IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG дополнительно подразделяются на изотипы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4.

[0043] Термин «антитело» также включает фрагменты, определенные части и их варианты, включая миметики антител или содержащие части антител, которые имитируют структуру и/или функцию антитела или его определенного фрагмента или части, включая одноцепочечные антитела и связывающие антиген (например, EpCAM) фрагменты антител. Функциональные фрагменты включают антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с антигеном млекопитающего, таким как EpCAM, отдельно или в комбинации с другими антигенами. Например, фрагменты антител, способные связываться с антигеном или его частями, включая, но не ограничиваясь ими, фрагменты Fab (например, путем расщепления папаином), Fab' (например, путем расщепления пепсином и частичного восстановления) и F(ab')2 (например, путем расщепления пепсином), facb (например, путем расщепления плазмином), pFc' (например, путем расщепления пепсином или плазмином), Fd (например, путем расщепления пепсином, частичного восстановления и реагрегации), Fv или scFv (например, при помощи молекулярной биологии), охватываются настоящим описанием (см., например, Colligan, Immunology).

[0044] Такие фрагменты могут быть получены ферментативным расщеплением, синтетическими или рекомбинантными методами, как известно в данной области техники и/или как описано в данном документе. Антитела также могут быть получены в различных усеченных формах с применением генов антитела, в которых один или более стоп-кодонов были введены перед природным стоп-сайтом. Например, комбинированный ген, кодирующий часть тяжелой цепи F(ab')2, может быть сконструирован таким образом, чтобы содержать последовательности ДНК, кодирующие домен CH1 и/или шарнирную область тяжелой цепи. Различные части антител могут быть химически соединены вместе общепринятыми методами или могут быть получены в виде непрерывного белка с использованием методов генной инженерии.

[0045] Термин «фрагмент антитела» относится к части интактного антитела, как правило, к связывающей антиген или вариабельной области интактного антитела. Примеры фрагментов антител включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')2, одноцепочечные фрагменты (scFv) и Fv, диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител; «одноплечевые» антитела с одним Fab-плечом и полиспецифические антитела, образованные, среди прочего, из фрагментов антител.

[0046] Фрагменты антител включают любую молекулу, содержащую белок или пептид, которая содержит по меньшей мере часть молекулы иммуноглобулина, например, но не ограничиваясь этим, по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR) тяжелой или легкой цепи или ее лиганд-связывающую часть,

вариабельную область тяжелой цепи или легкой цепи, константную область тяжелой цепи или легкой цепи, каркасную область или любую ее часть, или по меньшей мере одну часть антигена или антигенного рецептора или связывающего белка, которые могут быть включены в предложенное в данном документе антитело к EpCAM.

[0047] Термин «вариабельный» относится к тому факту, что определенные части вариабельных областей антител сильно различаются у разных антител и вносят вклад в связывание и специфичность каждого конкретного антитела по отношению к его конкретному антигену. В то же время вариабельность не является равномерно распределенной по вариабельным областям антител. Вариабельность сосредоточена в трех сегментах, называемых определяющими комплементарность областями (CDR) или гипервариабельными областями, в вариабельных областях как легкой цепи,так и тяжелой цепи. Более высококонсервативные части вариабельных областей называются каркасными областями (FR). Каждая из вариабельных областей нативных тяжелых и легких цепей состоит из четырех областей FR, в значительной степени принимающих конфигурацию бета-листов, связанных тремя CDR, которые образуют петли, соединяющие и в некоторых случаях образующие часть бета-складчатой структуры. CDR, в каждой цепи удерживаются вместе в непосредственной близости посредством областей FR, и, с CDR, из другой цепи способствуют образованию антигенсвязывающего участка антител. Константные домены не принимают непосредственного участия в связывании антитела с антигеном, однако проявляют различные эффекторные функции, например, участие антитела в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности. Существует по меньшей мере две методики для определения CDR: (1) подход, основанный на межвидовой вариабельности последовательностей (т. е. Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, (5th ed., 1991, National Institutes of Health, Bethesda Md.)), и (2) подход, основанный на кристаллографических исследованиях комплексов антиген-антитело (Al-lazikani et al., J. Molec. Biol. 273:927-948 (1997)). Кроме того, иногда в данной области техники для определения CDR используются комбинации этих двух подходов.

[0048] Система нумерации по Kabat, как правило, используется для обозначения остатка в вариабельной области (приблизительно остатки 1-107 легкой цепи и остатки 1-113 тяжелой цепи) (например,Kabat et al., Sequences of Immunological Interest. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)).

[0049] Фразы «нумерация аминокислотных положений, как в Kabat», «положение по Kabat» и их грамматические варианты относятся к системе нумерации, используемой для вариабельных доменов тяжелой цепи или вариабельных доменов легкой цепи при составлении антител в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.

Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991). При использовании этой системы нумерации фактическая линейная аминокислотная последовательность может содержать меньшее количество или дополнительное количество аминокислот, что соответствует укорочению FR или CDR вариабельной области или вставке в них. Например, вариабельная область тяжелой цепи может содержать вставку одной аминокислоты (остаток 52a в соответствии с Kabat) после остатка 52 H2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, 82c и т. д. в соответствии с Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может быть определена для данного антитела путем выравнивания областей гомологии в последовательности антитела со «стандартной» пронумерованной по Kabat последовательностью. Нумерация по Chothia, напротив, относится к расположению структурных петель (Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Конец петли CDR-H1 по Chothia при нумерации согласно системе нумерации по Kabat варьируется между H32 и H34 в зависимости от длины петли (это связано с тем, что в схеме нумерации по Kabat в H35A и H35B размещаются вставки; если ни 35A ни 35B не присутствуют, петля заканчивается в 32; если присутствует только 35A, петля заканчивается в 33; если присутствуют оба 35A и 35B, петля заканчивается в 34). Гипервариабельные области по AbM представляют собой компромиссный вариант между CDR по Kabat, и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител Oxford Molecular's AbM.

[0050] Термины «антитело к EpCAM», «антитело против EpCAM», «антитело, которое специфически связывается с EpCAM», «связывающий EpCAM фрагмент антитела», «фрагмент антитела, который специфически связывает EpCAM» относятся к антителу, которое способно связывать EpCAM с достаточной аффинностью, что антитело можно использовать в качестве диагностического и/или терапевтического агента для нацеливания на EpCAM. Степень связывания антитела EpCAM с неродственным белком, не относящимся к EpCAM, составляет менее около 10% связывания антитела с EpCAM, как измерено, например, с помощью радиоиммуноанализа (РИА).

Таблица 1.

Петля	Kabat	AbM	Chothia
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97
H1	H31-H35B	H26-H35B (нумерация по Kabat)	H26-H32..34
H1	H31-H35	H26-H35 (нумерация по Chothia)	H26-H32
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102

[0051] Термин «эпитоп» относится к детерминанте белка, способной специфически связываться с антителом. Эпитопы обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахара и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Когда антиген является полипептидом, «эпитопы» могут образовываться как смежными аминокислотами, так и несмежными аминокислотами, сформированными укладкой третичной структуры белка. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, как правило, сохраняются при денатурации белка, тогда как эпитопы, образованные третичной структурой, как правило, теряются при денатурации белка. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3 и более, обычно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации.

[0052] «Блокирующее» антитело представляет собой антитело, которое ингибирует или снижает биологическую активность антигена, который оно связывает, такого как EpCAM. Предпочтительные блокирующие антитела в значительной степени или полностью ингибируют биологическую активность антигена. Желательно, чтобы биологическая активность снижалась на 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или даже 100%. В одном варианте осуществления блокирующее антитело снижает активность тирозинкиназы, связанной с EpCAM, на 10%, 20%, 30%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или даже 100%.

[0053] «Выделенное» антитело представляет собой одно отделенное и/или извлеченное из его естественного окружения антитело. Загрязняющий компонент естественного окружения представляет собой вещества, которые влияют на диагностическое или терапевтическое применение антитела, и могут включать ферменты, гормоны и другие белковые или небелковые растворенные вещества. В предпочтительных аспектах антитело будет очищено (1) до более чем 95% по массе антитела, как определено, например, методом Лоури, и наиболее предпочтительно до более чем 99% по массе, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-

концевой или внутренней аминокислотной последовательности с помощью секвенатора с вращающимся стаканом или (3) до гомогенности с помощью ДСН-ПААГ-электрофореза (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с использованием Кумасси синего или, желательно, красителя на основе серебра. Выделенное антитело к EpCAM включает антитело in situ в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент естественной среды антитела будет отсутствовать. Обычно, однако, выделенное антитело будет получено с помощью по меньшей мере одного этапа очистки.

[0054] «Человеческое антитело» относится к антителу, продуцируемому человеком, или антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области техники. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, активируемые антитела, антигенсвязывающие фрагменты антител (например, EpCAM человека или яванского макака) и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид тяжелой и/или легкой цепи человека, такой как, например, антитело, содержащее полипептиды легкой цепи мыши и тяжелой цепи человека.

[0055] Используемый в данном документе термин «химерные антитела» относится к антителам, в которых последовательность молекулы иммуноглобулина получена от двух или более видов. Как правило, вариабельная область как легкой, так и тяжелой цепей соответствует вариабельной области антител, происходящих от одного вида млекопитающих (например, мыши, крысы, кролика и т. ж.) с желаемой специфичностью, аффинностью и характеристиками, в то время как константные области гомологичны последовательностям антител, полученных из другого источника (как правило, человека), чтобы избежать иммунного ответа у этого вида.

[0056] Используемый в данном документе термин «гуманизированное антитело» относится к формам нечеловеческих (например, мышиных) антител, которые представляют собой специфические цепи иммуноглобулина, химерные иммуноглобулины или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые содержат минимальное количество не являющихся человеческими (например, мышиных) последовательностей. Как правило, гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека, в которых остатки из определяющей комплементарность области (CDR), заменены остатками из CDR отличного от человека вида (например, мыши, крысы, кролика, хомяка), которые имеют желаемую специфичность, аффинность, и характеристики (Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science

239:1534-1536 (1988)). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) Fv иммуноглобулина человека заменены соответствующими остатками антитела из отличных от человека видов, которое обладает желаемой специфичностью, аффинностью и характеристиками. Гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано путем замены дополнительных остатков или в каркасной области Fv и/или в пределах замененных нечеловеческих остатков для улучшения и оптимизации специфичности, аффинности, и/или характеристик антитела. В общем, антитело будет содержать практически все из, по меньшей мере, одной, а обычно двух или трех вариабельных областей, содержащих все или практически все области CDR, которые соответствуют нечеловеческому иммуноглобулину, а все или по существу все области FR представляют собой области консенсусной последовательности человеческого иммуноглобулина. Антитело также может содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, человеческого иммуноглобулина. Примеры способов, используемых для создания гуманизированных антител описаны в патенте США 5225539.

[0057] «Эффекторные функции» антитела относятся к той биологической активности, которая относится к области Fc (например, нативной последовательности области Fc или аминокислотной последовательности вариантной области Fc) антитела, и варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание с Fc-рецептором; антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); и антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз (АЗКФ).

[0058] «Эффекторные клетки человека» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. В определенных аспектах клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и выполняют эффекторную функцию (и) АЗКЦ или АЗКФ. Примеры лейкоцитов человека, которые опосредуют АЗКЦ и АЗКФ, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), натуральные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы. Эффекторные клетки могут быть выделены из нативного источника, например, из крови.

[0059] Используемый в данном документе термин «область Fc» включает полипептиды, содержащие константную область антитела, за исключением первого домена константной области иммуноглобулина. Таким образом, Fc относится к двум последним доменам константной области иммуноглобулина IgA, IgD и IgG и к трем

последним доменам константной области иммуноглобулина IgE и IgM, а также к гибкому шарнирному N-концу этих доменов. В случае IgA и IgM Fc может содержать J-цепь. Для IgG Fc содержит домены иммуноглобулина Cγ2 и Cγ3 (Cγ2 и Cγ3) и шарнир между Cγ1 (Cγ1) и Cγ2 (Cγ2). Хотя границы области Fc могут варьироваться, область Fc тяжелой цепи IgG человека по определению, как правило, содержит остатки C226 или P230 до ее карбоксильного конца, причем нумерация соответствует индексу EU, как у Kabat et al., (1991, NIH Publication 91-3242, National Technical Information Service, Springfield, Va.). «Индекс EU, как указано в Kabat» относится к нумерации остатков антитела IgG1 человека по EU, как описано у Kabat et al., выше. Fc может относиться к этой области в отдельности или к этой области в контексте антитела, фрагмента антитела или Fc-слитого белка. Вариант белка Fc может быть антителом, Fc-слитым белком или любым белком или доменом белка, который содержит область Fc. Особенно предпочтительными являются белки, содержащие вариантные области Fc, которые являются неприродными вариантами Fc. Полиморфизмы наблюдались в ряде положений Fc, включая, но не ограничиваясь ими, 270, 272, 312, 315, 356 и 358 по Kabat, и, таким образом, небольшие различия между представленной последовательностью и последовательностями в предшествующем уровне техники могут существовать и будут должны быть поняты специалистом в данной области техники на основе представленных в данном документе идей.

[0060] Термин «конъюгат», «иммуноконъюгат», «ADC» или «AADC» в контексте данного документа относится к соединению или его производному, которое связано со связывающим клетки агентом (например, антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM) и определяется общей формулой: CLA, где C = соединение, L = линкер и A = связывающий EpCAM агент (EpBA) (например, антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, как раскрыто в данном документе). В некоторых вариантах осуществления общая формула: DLA, где D = лекарственное средство, L = линкер и A = связывающий клетки агент (например, антитело EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM), также может использоваться таким же образом.

[0061] «Линкер» представляет собой любой химический фрагмент, который способен связывать соединение, как правило, лекарственное средство, такое как майтанзиноид или индолинобензодиазепиновые соединения, со связывающим клетки агентом, таким как антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, стабильным, ковалентным способом. Линкеры могут быть восприимчивыми или по существу устойчивыми к индуцированному кислотой расщеплению, индуцированному

светом расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, индуцированному эстеразой расщеплению и расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых соединение или антитело остаются активными. Подходящие линкеры хорошо известны в данной области техники и включают, например, дисульфидные группы, тиоэфирные группы, кислотные группы, фотолабильные группы, пептидазо-лабильные группы и эстеразо-лабильные группы. Линкеры также включают пептидные линкеры и заряженные линкеры и их гидрофильные формы, как раскрыто в данном документе и известно в данной области техники.

[0062] В контексте данного документа термин «аберрантная пролиферация клеток», если не указано иное, относится к росту клеток, который не зависит от нормальных регуляторных механизмов (например, потери контактного ингибирования). Он включает в себя, например, аномальный рост: (1) опухолевых клеток (опухолей), которые распространяются путем экспрессии мутированной тирозинкиназы или сверхэкспрессии рецепторной тирозинкиназы; (2) доброкачественных и злокачественных клеток других пролиферативных заболеваний, при которых происходит аберрантная активация тирозинкиназы; (3) любых опухолей, которые распространяются с помощью рецепторных тирозинкиназ; (4) любых опухолей, которые распространяются за счет аберрантной активации серина/треонин-киназы; (5) доброкачественных и злокачественных клеток других пролиферативных заболеваний, при которых происходит аберрантная активация серина/треонин-киназы, и (6) доброкачественных и злокачественных клеток других пролиферативных заболеваний.

[0063] Термины «злокачественное новообразование» и «раковый» относятся или описывают физиологическое состояние у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Термин «опухоль» включает в себя одну или более раковых клеток. Примеры злокачественных новообразований включают в себя без ограничения карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Термин «злокачественное новообразование» или «раковый», как определено в данном документе, включает «предраковые» состояния, которые, если их не лечить, могут перерасти в раковые состояния. В конкретных вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное эпителиальное новообразование. Примеры злокачественные эпителиальные новообразования включают злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование печени, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование головы и шеи, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное

новообразование поджелудочной железы, злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование толстой кишки и злокачественное новообразование почек. Дополнительные виды злокачественных новообразований, которые можно диагностировать или лечить с помощью предложенных антител к EpCAM, связывающих EpCAM фрагментов антител, активируемых антител к EpCAM или иммуноконъюгатов, включают злокачественное новообразование пищевода, злокачественное новообразование трахеи, злокачественное новообразование мозга, карциному, холангиоцеллюлярный рак, злокачественное новообразование эндометрия, злокачественное новообразование шейки матки, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование мочевого пузыря, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование яичек, злокачественное новообразование прямой кишки, злокачественное новообразование кожи (меланому), злокачественное новообразование тонкой кишки, злокачественное новообразование желчного пузыря, злокачественное новообразование желчного протока, злокачественное новообразование слюнной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование поджелудочной железы или колоректальный рак.

[0064] Термины «раковая клетка», «опухолевая клетка» и их грамматические эквиваленты относятся к общей популяции клеток, полученных из опухоли или предраковых поражений, в том числе как неонкогенных клеток, которые составляют большую часть популяции опухолевых клеток, так и онкогенных стволовых клеток (раковых стволовых клеток).

[0065] Используемый в данном документе термин «цитотоксический агент» относится к веществу, которое ингибирует или предотвращает одну или более клеточных функций и/или вызывает гибель клеток.

[0066] В контексте данного документа термин «лечение» относится к клиническому вмешательству при попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума или клетки, которые подвергаются лечению, и может осуществляться для профилактики или в процессе клинического проявления патологии. Желательные эффекты лечения включают предотвращение возникновения или рецидива заболевания, ослабление симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, уменьшение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или смягчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления

способы и композиции, предложенные в данном документе, полезны в попытках отсрочить развитие заболевания или нарушения.

[0067] Термины, такие как «лечение» или «лечить», или «ослабление» или «ослаблять», относятся как к 1) терапевтическим мерам, которые приводят к излечению, замедлению, снижению симптомов и/или приостановке прогрессирования диагностированного патологического состояния или расстройства, так и к 2) профилактическим или превентивным мерам, которые предотвращают и/или замедляют развитие целевого патологического состояния или нарушения. Таким образом, нуждающиеся в лечении включают тех, у кого уже есть нарушение; тех, кто предрасположен в нарушению; и тех, у кого необходимо предотвратить нарушение. В определенных вариантах осуществления у субъекта успешно «лечат» злокачественное новообразование в соответствии со способами, предложенными в данном документе, если у пациента наблюдается одно или более из следующего: уменьшение количества или полное отсутствие раковых клеток; уменьшение размера опухоли; ингибирование или отсутствие инфильтрации раковых клеток в периферические органы, включая, например, распространение злокачественного новообразования в мягкие ткани и кости; ингибирование или отсутствие метастазирования опухоли; ингибирование или отсутствие роста опухоли; облегчение одного или более симптомов, связанных с конкретным злокачественным новообразованием; снижение заболеваемости и смертности; улучшение качества жизни; уменьшение туморогенности, частоты развития опухолей или туморогенного потенциала опухоли; уменьшение количества или частоты раковых стволовых клеток в опухоли; дифференцировка туморогенных клеток в нетуморогенное состояние; или какая-нибудь комбинация эффектов.

[0068] «Эффективное количество» антитела, как описано в данном документе, представляет собой количество, достаточное для выполнения конкретно заявленной цели. «Терапевтически эффективное количество» относится к количеству, эффективному в дозировках и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического результата. «Терапевтически эффективное количество» терапевтического агента (например, конъюгата или иммуноконъюгата) может варьироваться в зависимости от таких факторов, как болезненное состояние, возраст, пол и масса человека, а также способность антитела вызывать желаемый ответ у индивидуума. Терапевтически эффективным количеством также является такое количество, при котором любые токсические или вредные эффекты терапевтического агента перевешиваются терапевтически полезными эффектами.

[0069] «Терапевтический агент» включает как биологический агент, такой как

антитело, пептид, белок, фермент, химиотерапевтический агент, так и конъюгат или иммуноконъюгат.

[0070] Термины «субъект», «индивидуум», «животное», «пациент» и «млекопитающее» относятся к любому субъекту, в частности, к млекопитающему, для которого требуется диагноз, прогноз или терапия. Субъекты-млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, людей, приматов, не относящихся к человеку, домашних животных, сельскохозяйственных животных, грызунов и т.п., которые должны быть реципиентами определенного лечения.

[0071] Термины «полинуклеотид» или «нуклеиновая кислота», используемые в данном документе взаимозаменяемо, относятся к полимерам нуклеотидов любой длины и включают ДНК и РНК. Нуклеотиды могут представлять собой дезоксирибонуклеотиды, рибонуклеотиды, модифицированные нуклеотиды или основания, и/или их аналоги, или любой субстрат, который может быть включен в полимер ДНК- или РНК-полимеразы. Полинуклеотид может содержать модифицированные нуклеотиды, такие как метилированные нуклеотиды и их аналоги. Если присутствует, модификация нуклеотидной структуры может быть внесена до или после сборки полимера. Последовательность нуклеотидов может прерываться ненуклеотидными компонентами. Кроме того, полинуклеотид может быть модифицирован после полимеризации, например, путем конъюгации с компонентом для мечения. Другие типы модификаций включают, например, «кэп», замену одного или более встречающихся в природе нуклеотидов аналогом, межнуклеотидные модификации, такие как, например, модификации с незаряженными связями (например, метилфосфонаты, фосфотриэфиры, фосфоамидаты, карбаматы и т. д.) и с заряженными связями (например, фосфоротиоаты, фосфородитиоаты и т. д.), содержащие боковые фрагменты, такие как, например, белки (например, нуклеазы, токсины, антитела, сигнальные пептиды, ply-L-лизин и т. д.), с интеркаляторами (например, акридином, псораленом и т. д.), с хелаторами (например, металлы, радиоактивные металлы, бор, окислительные металлы и т. д.), с алкиляторами, с модифицированными связями (например, альфа-аномерные нуклеиновые кислоты и т. д.), а также немодифицированные формы полинуклеотида (ов). Кроме того, любые гидроксильные группы, обычно присутствующие в сахарах, могут быть заменены, например, фосфонатными группами, фосфатными группами, защищены стандартными защитными группами или активированы для получения дополнительных связей с дополнительными нуклеотидами, или могут быть конъюгированы с твердыми подложками. 5’- и 3’-концевые группы ОН могут быть фосфорилированы или замещены аминами или фрагментами органической блокирующей группы, содержащей от 1 до 20

атомов углерода. Другие гидроксилы также могут быть преобразованы в стандартные защитные группы. Полинуклеотиды также могут содержать аналогичные формы сахаров рибозы или дезоксирибозы, которые обычно известны в данной области техники, включая, например, 2'-O-метил-, 2'-O-аллил-, 2'-фтор- или 2'-азидо-рибозу, карбоциклические аналоги сахаров, альфа-аномерные сахара, эпимерные сахара, такие как арабиноза, ксилозы или ликсозы, сахара пиранозы, сахара фуранозы, седогептулозы, ациклические аналоги и абазические нуклеозидные аналоги, такие как метил рибозид. Одна или более фосфодиэфирных связей могут быть заменены альтернативными связывающими группами. Эти альтернативные связывающие группы включают, но не ограничиваются ими, варианты осуществления, в которых фосфат заменен на P(O)S («тиоат»), P(S)S («дитиоат»), "(O)NR2 («амидат»), P(O)R, P(O)OR', CO или CH2 («формацеталь»), в котором каждый R или R' независимо представляет собой H или замещенный или незамещенный алкил (1-20 C), необязательно содержащий простую эфирную связь (-O-), арил, алкенил, циклоалкил, циклоалкенил или аралдил. Не все связи в полинуклеотиде должны быть идентичными. Предыдущее описание применимо ко всем полинуклеотидам, упомянутым в данном документе, включая РНК и ДНК.

[0072] Термин «вектор» означает конструкцию, которая способна доставлять и необязательно экспрессировать один или более представляющих интерес генов или последовательностей в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, но не ограничиваются ими, вирусные векторы, векторы экспрессии голой ДНК или РНК, векторы плазмид, космид или фагов, векторы экспрессии ДНК или РНК, связанные с катионными конденсирующими агентами, векторы экспрессии ДНК или РНК, инкапсулированные в липосомы, и некоторые эукариотические клетки, такие как клетки-продуценты.

[0073] Термины «полипептид», «пептид» и «белок» используются в данном документе взаимозаменяемо для обозначения полимеров аминокислот любой длины. Полимер может быть линейным или разветвленным, он может содержать модифицированные аминокислоты, и он может быть разделен не аминокислотами. Кроме того, указанные термины включают аминокислотный полимер, который был модифицирован природным путем или путем вмешательства; например, образованием дисульфидных связей, гликозилированием, липидацией, ацетилированием, фосфорилированием или любыми другими манипуляциями или модификациями, такие как конъюгация с меченым компонентом. Также термин включает, например, полипептиды, содержащие один или более аналогов аминокислоты (включающие, например, неприродные аминокислоты и т. д.), а также другие модификации известные в

данной области техники.

[0074] Термин «идентичный» или процент «идентичности», известный в данной области техники, представляет собой меру взаимосвязи между двумя полинуклеотидами или двумя полипептидами, определяемую путем сравнения их последовательностей. Идентичность или сходство в отношении последовательности определяется в данном документе как процент аминокислотных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны (т. е. один и тот же остаток) или аналогичны (т. е. аминокислотный остаток из той же группы на основе общих свойств боковой цепи, см. ниже) остаткам антител к EpCAM после выравнивания последовательностей и введения гэпов в случае необходимости для достижения максимального процента идентичности последовательностей. Ни одно из N-концевых, C-концевых или внутренних удлинений, делеций или вставок в последовательность антитела за пределами вариабельной области не должно толковаться как влияющее на идентичность или сходство последовательностей. Как правило, две сравниваемые последовательности выравниваются с целью обеспечения максимальной корреляции между последовательностями. Выравнивание двух последовательностей оценивают и определяют количество положений, дающих точное соответствие аминокислот или нуклеотидов между двумя последовательностями, делят на общую длину выравнивания и умножают на 100, чтобы получить показатель % идентичности. Этот показатель % идентичности может быть определен по всей длине сравниваемых последовательностей, что особенно подходит для последовательностей одинаковой или очень похожей длины и которые являются высокогомологичными, или для более коротких определенных длин, что больше подходит для последовательностей неравной длины или имеющих более низкий уровень гомологии. Подобным образом процент сходства может быть определен аналогичным образом на основании присутствия как идентичных, так и аналогичных остатков.

[0075] Процент идентичности можно определять, используя программное обеспечение или алгоритм для сравнения последовательностей, или путем визуальной оценки. Различные алгоритмы и программное обеспечение, известные в данной области техники, могут использоваться для получения выравнивания аминокислотных или нуклеотидных последовательностей. Одним из таких неограничивающих примеров алгоритма выравнивания последовательностей является алгоритм, описанный в Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 87:2264-2268 (1990), как модифицировано в Karlin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 90:5873-5877 (1993), и включены в программы NBLAST и XBLAST (Altschul et al., Nucleic Acids Res., 25:3389-3402 (1991)). В определенных вариантах осуществления может использоваться Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic

Acids Res. 25:3389-3402 (1997). BLAST-2, WU-BLAST-2 (Altschul et al., Meth. Enzym. 266:460-480 (1996)), ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, Южный Сан-Франциско, штат Калифорния) или Megalign (DNASTAR®) представляют собой дополнительные общедоступные программы, которые можно использовать для выравнивания последовательностей. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности между двумя нуклеотидными последовательностями определяется с использованием программы GAP в программном обеспечении GCG (например, с использованием матрицы NWSgapdna.CMP и штрафа за открытие гэпа 40, 50, 60, 70 или 90 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5 или 6). В некоторых альтернативных вариантах осуществления программа GAP в пакете программного обеспечения GCG, которая включает алгоритм Нидлмана — Вунша (J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970)), может использоваться для определения процентной идентичности между двумя аминокислотные последовательности (например, с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250 и штрафа за открытие гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и штрафа за продолжение гэпа 1, 2, 3, 4, 5). Альтернативно, в некоторых вариантах осуществления процент идентичности между нуклеотидными или аминокислотными последовательностями определяется с использованием алгоритма Майерса и Миллера (CABIOS 4:11-17 (1989)). Например, процент идентичности можно определить с помощью программы ALIGN (версия 2.0) и использования PAM120 с таблицей остатков, штрафом за продолжение гэпа 12 и штрафом за гэп 4. Можно определить соответствующие параметры для максимального выравнивания с помощью конкретного программного обеспечения для выравнивания специалистом в данной области техники. В определенных вариантах осуществления используются параметры по умолчанию программного обеспечения для выравнивания. В определенных вариантах осуществления процент идентичности «X» первой аминокислотной последовательности со второй аминокислотной последовательностью рассчитывается как 100 x (Y/Z), где Y представляет собой количество аминокислотных остатков, оцениваемых как идентичные совпадения при выравнивании первой и второй последовательностей (выровненных визуальным осмотром или специальной программой для выравнивания последовательностей), а Z представляет собой общее количество остатков во второй последовательности. Если длина первой последовательности больше, чем длина второй последовательности, процент идентичности первой последовательности и второй последовательности будет больше, чем процент идентичности второй последовательности и первой последовательности.

[0076] В качестве неограничивающего примера, имеет ли какой-либо конкретный полинуклеотид определенную процентную идентичность последовательности (например,

по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85% идентичности, по меньшей мере 90% идентичности, а в некоторых вариантах осуществления по меньшей мере 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности) с эталонной последовательностью в некоторых вариантах осуществления можно определить с помощью программы Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, версия 8 для Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive, Мэдисон, штат Висконсин 53711). Bestfit использует алгоритм локальной гомологии Смита и Уотермана, Advances in Applied Mathematics 2: 482-489 (1981), чтобы найти лучший сегмент гомологии между двумя последовательностями. При использовании Bestfit или любой другой программы для выравнивания последовательностей для определения того, является ли конкретная последовательность, например, на 95% идентичной эталонной последовательности, как указано в данном документе, параметры устанавливаются таким образом, что процент идентичности рассчитывается по всей длине эталонной нуклеотидной последовательности, и таким образом, что допускаются гэпы в гомологии до 5% от общего числа нуклеотидов в эталонной последовательности.

[0077] «Консервативная аминокислотная замена» представляет собой консервативную аминокислотную замену, в которой аминокислотный остаток заменен аминокислотным остатком, имеющим сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков, имеющих аналогичные боковые цепи, были определены в данной области техники, включая, например, основные боковые цепи (например, лизин, аргинин, гистидин), кислые боковые цепи (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженные полярные боковые цепи (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин), неполярные боковые цепи (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан), бета-разветвленные боковые цепи (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматические боковые цепи (например, тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Например, замещение фенилаланина на тирозин представляет собой консервативную замену. В некоторых вариантах осуществления консервативные замены в последовательностях полипептидов и антител, предложенных в данном документе, не отменяют связывания полипептида или антитела, содержащего аминокислотную последовательность, с антигеном(-ами), с которым связывается полипептид или антитело. Способы идентификации консервативных замен нуклеотидов и аминокислот, которые не устраняют способность связывания антигена, хорошо известны в данной области техники (см., например, Brummell et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10):879-884 (1999); and Burks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)).

[0078] В контексте данного документа «алкил» относится к насыщенному одновалентному углеводородному радикалу с линейной или разветвленной цепью, содержащему от одного до двадцати атомов углерода. Примеры алкила включают, но не ограничиваются этим, метил, этил, 1-пропил, 2-пропил, 1-бутил, 2-метил-1-пропил, -CH2CH(CH3)2), 2-бутил, 2-метил-2-пропил, 1-пентил, 2-пентил 3-пентил, 2-метил-2-бутил, 3-метил-2-бутил, 3-метил-1-бутил, 2-метил-1-бутил, 1-гексил), 2-гексил, 3-гексил, 2-метил-2-пентил, 3-метил-2-пентил, 4-метил-2-пентил, 3-метил-3-пентил, 2-метил-3-пентил, 2,3-диметил-2-бутил, 3,3-диметил-2-бутил, 1-гептил, 1-октил и тому подобное. Предпочтительно алкил имеет от одного до десяти атомов углерода. Более предпочтительно, чтобы алкил имел от одного до четырех атомов углерода.

[0079] Число атомов углерода в группе может быть указано в данном документе префиксом «Cx-xx», где x и xx являются целыми числами. Например, «C1-4алкил» представляет собой алкильную группу, имеющую от 1 до 4 атомов углерода.

[0080] Термин «соединение», или «цитотоксическое соединение», или «цитотоксический агент» используются взаимозаменяемо. Они предназначены для включения соединений, для которых структура или формула или любое их производное были раскрыты в данном документе, или их структура, формула или любое производное, которое включено посредством ссылки. Термин также включает стереоизомеры, геометрические изомеры, таутомеры, сольваты, метаболиты и соли (например, фармацевтически приемлемые соли) соединения всех формул, описанных в данном документе. Термин также включает любые сольваты, гидраты и полиморфы любого из вышеперечисленного. Конкретное перечисление «стереоизомеров», «геометрических изомеров», «таутомеров», «сольватов», «метаболитов», «соли», «конъюгатов», «конъюгатов соли», «сольвата», «гидрата» или «полиморфа». в определенных вариантах осуществления, предложенных в данном документе, не следует интерпретировать как намеренное упущение этих форм в других описанных вариантах осуществления, где термин «соединение» используется без перечисления этих других форм.

[0081] Термин «реакционноспособный к имину реагент» относится к реагенту, который способен реагировать с иминной группой. Примеры реакционноспособного к имину реагента, включают, но не ограничиваются ими, сульфиты (H2SO3, H2SO2 или соль HSO3-, SO32- или HSO2-, образованную с катионом), метабисульфит (H2S2O5 или соль S2O52-, образованную с катионом), моно-, ди-, три- и тетратиофосфаты (PO3SH3, PO2S2H3, POS3H3, PS4H3 или соли PO3S3-, PO2S23-, POS33- или PS43-, образованные с катионом), сложные эфиры тиофосфата ((RiO)2PS(ORi), RiSH, RiSOH, RiSO2H, RiSO3H), различные амины (гидроксиламин (например, NH2OH), гидразин (например, NH2NH2),

NH2O-Ri, Ri'NH-Ri, NH2-Ri), NH2-CO-NH2, NH2-C(=S)-NH2, тиосульфат (H2S2O3 или соль S2O32-, образованную с катионом), дитионит (H2S2O4- или соль S2O42-, образованную с катионом), фосфородитиоат (P(=S)(ORk)(SH)(OH) или его соль, образованную с катионом), гидроксамовую кислоту (RkC(=O)NHOH или соль, образованную с катионом), гидразид (RkCONHNH2), формальдегидсульфоксилат (HOCH2SO2H или соль HOCH2SO2-, образованную с катионом, таким как HOCH2SO2-Na +), гликированный нуклеотид (например, GDP-манноза), флударабин или их смесь, где каждый из Ri и Ri' независимо представляет собой линейный или разветвленный алкил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, и замещены по меньшей мере одним заместителем, выбранным из N(Rj)2, -CO2H, SO3H и PO3H; Ri и Ri' могут быть дополнительно необязательно замещены заместителем для описанного в данном документе алкила; Rj представляет собой линейный или разветвленный алкил, содержащий от 1 до 6 атомов углерода; и Rk представляет собой линейный, разветвленный или циклический алкил, алкенил или алкинил, содержащий от 1 до 10 атомов углерода, арил, гетероциклил или гетероарил (предпочтительно, Rk представляет собой линейный или разветвленный алкил, содержащий от 1 до 4 атомов углерода; более предпочтительно, Rk представляет собой метил, этил или пропил). Предпочтительно катион представляет собой одновалентный катион, такой как Na+ или K+. Предпочтительно реакционноспособный к имину реагент выбран из сульфитов, гидроксиламина, мочевины и гидразина. Более предпочтительно, реакционноспособный к имину реагент представляет собой NaHSO3 или KHSO3.

[0082] Термин «катион» относится к иону с положительным зарядом. Катион может быть одновалентным (например, Na+, K+, NH4 + и т. д.), двухвалентным (например, Ca2+, Mg2+ и т. д.) или многовалентным (например, Al3+ и т. д.). Предпочтительно катион является моновалентным.

[0083] Используемая в данном документе фраза «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения, предложенного в данном документе. Типичные соли включают, но не ограничиваются ими, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат «мезилат», этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, соли памоата (например, 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтаноат)), соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония.

Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть любым органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. В случаях, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, может присутствовать несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

[0084] Если соединение, предложенное в данном документе, представляет собой основание, желаемая фармацевтически приемлемая соль может быть получена любым подходящим способом, доступным в данной области техники, например обработкой свободного основания неорганической кислотой, такой как соляная кислота, бромистоводородная кислота, серная кислота, азотная кислота, метансульфоновая кислота, фосфорная кислота и тому подобное, или органической кислотой, такой как уксусная кислота, малеиновая кислота, янтарная кислота, миндальная кислота, фумаровая кислота, малоновая кислота, пировиноградная кислота, щавелевая кислота, гликолевая кислота, салициловая кислота, пиранозидиловая кислота, такая как глюкуроновая кислота или галактуроновая кислота, альфа-гидрокси кислота, такая как лимонная кислота или винная кислота, аминокислота, такая как аспарагиновая кислота или глутаминовая кислота, ароматическая кислота, такая как бензойная кислота или коричная кислота, сульфоновая кислота, такая как п-толуолсульфоновая кислота или этансульфоновая кислота, или тому подобное.

[0085] Если соединение, предложенное в данном документе, представляет собой кислоту, желаемую фармацевтически приемлемую соль можно получить любым подходящим способом, например обработкой свободной кислоты неорганическим или органическим основанием, таким как амин (первичный, вторичный или третичный), гидроксидом щелочного металла или гидроксидом щелочноземельного металла или тому подобное. Иллюстративные примеры подходящих солей включают, но не ограничиваются ими, органические соли, полученные из аминокислот, таких как глицин и аргинин, аммиак, первичные, вторичные и третичные амины, и циклические амины, такие как пиперидин, морфолин и пиперазин, и неорганические соли, полученные из натрия, кальция, калия, магния, марганца, железа, меди, цинка, алюминия и лития.

[0086] Используемый в данном документе термин «сольват» означает соединение, которое дополнительно включает стехиометрическое или нестехиометрическое количество растворителя, такого как вода, изопропанол, ацетон, этанол, метанол, ДМСО,

этилацетат, уксусная кислота и дихлорметан этаноламин, 2-пропанол или тому подобное, связанное нековалентными межмолекулярными силами. Сольваты или гидраты соединений легко получают добавлением к соединению по меньшей мере одного молярного эквивалента гидроксильного растворителя, такого как метанол, этанол, 1-пропанол, 2-пропанол или вода, чтобы привести к сольватации или гидратации иминного фрагмента.

[0087] «Метаболит» или «катаболит» представляет собой продукт, продуцируемый в результате метаболизма или катаболизма в организме определенного соединения, его производного или его конъюгата, или его соли. Метаболиты соединения, его производного или его конъюгата могут быть идентифицированы с использованием обычных методик, известных в данной области техники, а их активность определяется с использованием тестов, таких как описанные в данном документе. Такие продукты могут быть результатом, например, окисления, гидроксилирования, восстановления, гидролиза, амидирования, деамидирования, эстерификации, деэстерификации, ферментативного расщепления и т.п. вводимого соединения. Соответственно, описание включает метаболиты соединений, их производные или их конъюгаты, описанных композиций EpCAM, описанных в данном документе, включая соединения, их производные или их конъюгаты, полученные способом, включающим приведение в контакт описанного соединения EpCAM, его производного, или его конъюгата с млекопитающим в течение периода времени, достаточного для получения продукта его метаболизма.

[0088] Фраза «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что субстанция или композиция должны быть химически и/или токсикологически совместимыми с другими ингредиентами, составляющими препарат, и/или млекопитающим, которое ими лечат.

[0089] Термин «защитная группа» или «защитный фрагмент» относится к заместителю, который обычно используется для блокирования или защиты конкретной функциональности при взаимодействии других функциональных групп в соединении, его производном или его конъюгате. Например, «защитная группа на аминогруппу» или «защитный фрагмент на амин» представляет собой заместитель, присоединенный к аминогруппе, который блокирует или защищает амино функциональную группу в соединении. Такие группы хорошо известны в данной области техники (см., например, P. Wuts and T. Greene, 2007, Protective Groups in Organic Synthesis, Chapter 7, J. Wiley & Sons, NJ) и в качестве примера можно привести карбаматы, такие как метил и этилкарбамат, FMOC, замещенные этилкарбаматы, карбаматы, расщепленные 1,6-β-элиминированием (также называемые «саморасщепляющимися»), мочевины, амиды, пептиды, алкильные и арильные производные. Подходящие защитные группы на аминогруппу включают

ацетил, трифторацетил, трет-бутоксикарбонил (BOC), бензилоксикарбонил (CBZ) и 9-флуоренилметиленоксикарбонил (Fmoc). Для общего описания защитных групп и их использования см. P. G.M. Wuts & T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 2007.

[0090] Термин «аминокислота» относится к встречающимся в природе аминокислотам или не встречающимся в природе аминокислотам. В одном варианте осуществления аминокислота представлена NH2-C(Raa'Raa)-C(=O)OH, где каждый из Raa и Raa' независимо представляет собой H, необязательно замещенный линейный, разветвленный или циклический алкил, алкенил или алкинил, имеющий от 1 до 10 атомов углерода, арил, гетероарил или гетероциклил, или же Raa и N-концевой атом азота могут вместе образовывать гетероциклическое кольцо (например, как в пролине). Термин «аминокислотный остаток» относится к соответствующему остатку, когда один атом водорода удален из амино- и/или карбокси-конца аминокислоты, например, как -NH-C(Raa'Raa)-C(=O)O-.

[0091] Термин «пептид» относится к коротким цепочкам мономеров аминокислот, связанных бипептидными (амидными) связями. В некоторых вариантах осуществления пептиды содержат от 2 до 20 аминокислотных остатков. В других вариантах осуществления пептиды содержат от 2 до 10 аминокислотных остатков. В еще других вариантах осуществления пептиды содержат от 2 до 5 аминокислотных остатков. В контексте данного документа, когда пептид представляет собой часть цитотоксического агента или линкера, описанного в данном документе, представленного конкретной последовательностью аминокислот, пептид может быть связан с остальной частью цитотоксического агента или линкера в обоих направлениях. Например, дипептид X1-X2 включает X1-X2 и X2-X1. Точно так же трипептид X1-X2-X3 включает X1-X2-X3 и X3-X2-X1, а тетрапептид X1-X2-X3-X4 включает X1-X2-X3-X4 и X4-X2-X3-X1. X1, X2, X3 и X4 представляют собой аминокислотный остаток.

[0092] Термин «реакционноспособная сложноэфирная группа» относится к группе сложноэфирной группы, которая может легко реагировать с аминогруппой с образованием амидной связи. Примеры реакционноспособных сложноэфирных групп включают, но не ограничиваются ими, N-гидроксисукцинимидные эфиры, N-гидроксифталимидные эфиры, N-гидроксисульфосукцинимидные, пара-нитрофениловые эфиры, сложные динитрофениловые эфиры, пентафторфениловые эфиры и их производные, в которых производные облегчают образование амидной связи. В определенных вариантах осуществления реакционноспособная сложноэфирная группа представляет собой N-гидроксисукцинимидный эфир или N-

гидроксисульфосукцинимидный эфир.

[0093] Термин «реакционноспособная к амину группа» относится к группе, которая может реагировать с аминогруппой с образованием ковалентной связи. Примеры реакционноспособных к амину групп, включают, но не ограничиваются ими, реакционноспособные сложноэфирные группы, ацилгалогениды, сульфонилгалогенид, имидоэфир или реакционноспособные тиоэфирные группы. В определенных вариантах осуществления реакционноспособная к амину группа представляет собой реакционноспособную сложноэфирную группу. В одном варианте осуществления реакционноспособная к амину группа представляет собой N-гидроксисукцинимидный эфир или N-гидроксисульфосукцинимидный эфир.

[0094] Термин «реакционноспособная к тиолу группа» относится к группе, которая может реагировать с тиоловой (-SH) группой с образованием ковалентной связи. Примеры реакционноспособных к тиолу групп включают, но не ограничиваются ими, малеимид, галогенацетил, алоацетамид, винилсульфон, винилсульфонамид или винилпиридин. В одном варианте осуществления реакционноспособная к тиолу группа представляет собой малеимид.

[0095] Как используется в настоящем описании и формуле изобретения, формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[0096] Термин «и/или», используемый в данном документе, следует понимать как конкретное описание каждой из двух или более указанных характеристик или компонентов с другим или без него. Таким образом, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «A и/или B», предназначен для включения «A и B», «A или B»; «A» (отдельно) и «B» (отдельно). Аналогично, термин «и/или», используемый в такой фразе, как «A, B и/или C», предназначен для охвата каждого из следующих аспектов: A, B и C; A, B или C; A или C; A или B; B или C; A и C; A и B; B и C; A (отдельно); B (отдельно); и C (отдельно).

[0097] Во всех случаях, когда варианты осуществления описаны в данном документе с формулировкой «содержащий», в противном случае аналогичные варианты осуществления, описанные в терминах «состоящий из» и/или «состоящий в основном из», также обеспечены.

Антитела к EpCAM и связывающие EpCAM фрагменты антител

[0098] Предложены белки, которые специфически связывают EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления белки упоминаются в данном документе как «связывающие EpCAM агенты» или EpBA».

[0099] В дополнительных вариантах осуществления связывающий EpCAM агент представляет собой антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM. В некоторых вариантах осуществления EpBA представляет собой полноразмерное антитело к EpCAM (т.е. полноразмерное антитело, которое специфически связывается с EpCAM). В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM представляет собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM представляет собой рекомбинантное антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, полиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело) или его связывающий EpCAM фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM специфически связывается с EpCAM человека. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM специфически связывает EpCAM человека и EpCAM яванского макака. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела представляет собой моноклональное антитело мыши, другого грызуна, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

[00100] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM представляет собой связывающий EpCAM фрагмент антитела. В дополнительных вариантах осуществления связывающий EpCAM фрагмент антитела представляет собой: фрагмент Fab, Fab', $F(ab')_2$, Fv, диатело или молекулу одноцепочечного антитела. В дополнительных аспектах антитело к EpCAM представляет собой связывающий EpCAM фрагмент антитела, представляющий собой Fd, одноцепочечный Fv (scFv), дисульфидсвязанный Fv, домен V-NAR, IgNar, интраантитело, IgG□CH2, миниантитело, $F(ab')_3$, scAb, dAb, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело тяжелой цепи, однодоменное антитело с легкими цепями, DVD-Ig, Fcab, мкАт^2, $(scFv)_2$, scFv-Fc или бис-scFv.

[00101] Антитела к EpCAM и связывающие EpCAM фрагменты антител, предложенные в данном документе, необязательно связывают EpCAM (например, EpCAM человека и/или EpCAM мыши) с широким диапазоном аффинностей (K_D). В предпочтительном варианте осуществления антитело связывает EpCAM человека с высокой аффинностью. Например, человеческое или человеческое сконструированное или гуманизированное или измененное на поверхность мкАт может связывать человеческий антиген с K_D, равным или менее примерно 10^{-7} М, например, но не ограничиваясь этим, 0,1-9,9 (или любым диапазоном или значением между ними) x 10^{-7}, 10^{-8}, 10^{-9}, 10^{-10}, 10^{-11}, или 10^{-12}, или любой диапазон или значение в нем, как определено при помощи анализов

на основе проточной цитометрии, иммуноферментного анализа (ИФА), поверхностного плазмонного резонанса (ППР) или метода KinExA® с использованием стандартных рабочих процедур. В некоторых вариантах осуществления антитела к EpCAM связываются с Kd около 10^{-9} М или менее, более конкретно от около 10^{-9} до 10^{-10} М.

[00102] Аффинность или авидность антитела или фрагмента антитела в отношении EpCAM можно определить экспериментально с использованием любого подходящего способа, известного в данной области техники, например, при помощи проточной цитометрии, иммуноферментного анализа (ИФА) или радиоиммуноанализа (РИА) или кинетики (например, анализа BIACORE™) с использованием стандартных рабочих процедур. Как правило, можно использовать анализы на основе прямого связывания, а также форматы анализов на основе конкурентного связывания. (см., например, Berzofsky, et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N.Y. (1984); Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N.Y. (1992); и способы, раскрытые в данном документе. Измеренная аффинность конкретного взаимодействия антитело-EpCAM может варьироваться, если измеряется в различных условиях (например, концентрация соли, pH, температура). Таким образом, измерения аффинности и других параметров связывания EpCAM (например, KD или Kd, Kon, Koff) предпочтительно проводят с использованием стандартизованных растворов антитела и EpCAM и стандартизованного буфера, известного в данной области техники, такого как описанный в данном документе буфер.

[00103] В одном варианте осуществления анализы связывания проводят с использованием проточной цитометрии на клетках, экспрессирующих антиген EpCAM на поверхности. Например, такие EpCAM-положительные клетки инкубируют с различными концентрациями антител к EpCAM с использованием 1 x10^5 клеток на образец в 100 мкл буфера для FACS (среда RPMI-1640 с добавлением 2% нормальной козьей сыворотки). Затем клетки осаждают, промывают и инкубируют в течение 1 ч со 100 мкл FITC-конъюгированных козьих антител к IgG мыши (например, получаемых от Jackson ImmunoResearch) в буфере для FACS. Клетки снова осаждают, промывают буфером для FACS и ресуспендируют в 200 мкл PBS, содержащего 1% формальдегида. Образцы собирают, например, с помощью проточного цитометра FACSCalibur™ с многолуночным пробоотборником HTS и анализируют с помощью CellQuest® Pro (все от BD Biosciences, Сан-Диего, США). Для каждого образца экспортируется средняя интенсивность флуоресценции для FL1 (СИФ) и наносится на график зависимости от концентрации антитела на полулогарифмическом графике для построения кривой связывания. Для кривых связывания подбирается сигмоидальная кривая доза-ответ, и значения EC_{50}

рассчитываются с использованием таких программ, как GraphPad Prism v4 с параметрами по умолчанию (программное обеспечение GraphPad, Сан-Диего, Калифорния). Значения EC_{50} можно использовать в качестве меры кажущейся константы диссоциации «Kd» или «KD» для каждого антитела.

[00104] В определенных вариантах осуществления антитела к EpCAM модифицированы для изменения их аффинности связывания с антигенными фрагментами EpCAM и/или EpCAM. Связывающие свойства могут быть определены различными методами анализа in vitro и с использованием стандартных операционных процедур, известных в данной области техники, включая, например, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА), радиоиммуноанализ (РИА)) или кинетику (например, анализ BIACORE™).

[00105] В одном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела специфически связывает EpCAM человека или яванского макака и/или антигенные фрагменты EpCAM с константой диссоциации или KD или Kd (koff/kon) менее 10^{-5} M, или менее 10^{-6} M, или менее 10^{-7} M, или менее 10^{-8} M, или менее 10^{-9} M, или менее 10^{-10} M, или менее 10^{-11} M, или менее 10^{-12} M, или менее 10^{-13} M. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела специфически связывает EpCAM человека или яванского макака и/или антигенные фрагменты EpCAM с KD 1,0 x 10^{-9} M или менее, 2,0 x 10^{-9} M или менее, 3,0 x 10^{-9} M или менее, 4,0 x 10^{-9} M или менее, 5,0 x 10^{-9} M или менее, 6,0 x 10^{-9} M или менее, 7,0 x 10^{-9} M или менее, 8,0 x 10^{-9} M или менее, или 9,0 x 10^{-9} M или менее. В определенных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела связывается с EpCAM человека и яванского макака и/или антигенными фрагментами EpCAM с KD 3,0 × 10^{-9} M или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела связывается с EpCAM человека с KD около 0,4 × 10^{-9}. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела связывается с EpCAM человека с KD около 0,8 × 10^{-9}. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела связывается с EpCAM яванского макака с KD около 0,8 × 10^{-9}. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела связывается с EpCAM яванского макака с KD около 2,2 × 10^{-9}. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела связывается с EpCAM яванского макака с KD около 2,8 × 10^{-9}.

[00106] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела специфически связывается с эпитопом во

внеклеточной области EpCAM человека (SEQ ID NO: 1). Внеклеточная область человеческого EpCAM может быть дополнительно разделена на три отдельных домена: D1 (SEQ ID NO: 2), D2 (SEQ ID NO: 3) и D3 (SEQ ID NO: 4). В определенных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела специфически связывается с эпитопом в первом внеклеточном домене (D1) EpCAM человека.

[00107] В одном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH-CDR1, содержащую $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5); VH-CDR2, содержащую $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7); и VH-CDR3, содержащую $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран из D и E, X_3 выбран из P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8).

[00108] В дополнительных вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10); и VL-CDR2 легкой цепи, содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и VL-CDR3, содержащую $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L, и Q, X_3 выбран из S, G, Y, и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие CDR1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую последовательность SEQ ID NO: 14; CDR3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую последовательность SEQ ID NO: 15; CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

[00109] В некоторых вариантах осуществления VH-CDR1 содержит последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I и W (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления VH-CDR3 содержит последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления VL-CDR3 содержит последовательность $AQX_3LELPNT$, где X_3 выбран из S, G, Y и N (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или

связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие CDR1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую последовательность SEQ ID NO: 13; CDR2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую последовательность SEQ ID NO: 14; CDR3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую последовательность SEQ ID NO: 15; CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую последовательность SEQ ID NO: 42; CDR2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую последовательность SEQ ID NO: 40; и CDR3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

[00110] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR): CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), VH-CDR2, VH-CDR3, CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), VL-CDR2 и VL-CDR3, где CDR тяжелой цепи описаны в таблице 2.

Таблица 2. Иллюстративные последовательности CDR тяжелой цепи антител к EpCAM.

	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
Мышиные и химерные			
muEpcam23	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
chEpcam23	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
Гуманизированные варианты			
huEpCAM23_VHGv1	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYSQKFQG (SEQ ID NO: 26)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23_VHGv2	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23_VHGv3	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23_VHGv4	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYSQKFQG (SEQ ID NO: 26)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
Аффинные варианты			
huEpCAM23HCGv2a	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2b	SYYIH (SEQ ID	WIYPGNVYIQYNEKFKG	DGPWFAY (SEQ

	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
	NO: 16)	(SEQ ID NO: 14)	ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2c	NYNIH (SEQ ID NO: 17)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2d	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGDVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 27)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2e	NYFIH (SEQ ID NO: 18)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2f	NYSIH (SEQ ID NO: 19)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2g	NYWIH (SEQ ID NO: 20)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2h	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WFYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 28)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2i/2o	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2j	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WINPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 29)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2k	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	EGPWFAY (SEQ ID NO: 30)
huEpCAM23HCGv2l	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPYFAY (SEQ ID NO: 31)
Тяжелая цепь huEpCAM23HCGv2m/ huEpCam23 HG2-1565-A	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGAWFAY (SEQ ID NO: 32)
huEpCAM23HCGv2n	NYYMH (SEQ ID NO: 21)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2p	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2q	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
huEpCAM23HCGv2r	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)

	VH-CDR1	VH-CDR2	VH-CDR3
huEpCAM23HCGv2s	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-H	NYHIH (SEQ ID NO: 22)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-D	NYDIH (SEQ ID NO: 23)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-Y	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGYWFAY (SEQ ID NO: 33)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-S	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGSWFAY (SEQ ID NO: 34)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-F	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGFWFAY (SEQ ID NO: 35)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-G	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGGWFAY (SEQ ID NO: 36)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-T	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGTWFAY (SEQ ID NO: 37)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-V	NYYIH (SEQ ID NO: 13)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGVWFAY (SEQ ID NO: 38)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-I	NYIIH (SEQ ID NO: 24)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-L	NYLIH (SEQ ID NO: 25)	WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14)	DGPWFAY (SEQ ID NO: 15)

[00111] В некоторых вариантах осуществление изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие CDR тяжелой цепи, в одном ряду в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления

изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 13 и 16-25; VH-CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 14 и 26-29; и VH-CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 15 и 30-38. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1 с SEQ ID NO: 13; VH-CDR2 с SEQ ID NO: 14; и VH-CDR3 с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1 с SEQ ID NO: 13; VH-CDR2 с SEQ ID NO: 26; и VH-CDR3 с SEQ ID NO: 15.

[00112] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, содержащую NYYIH (SEQ ID NO: 13), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; VH-CDR2, содержащую WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14), или ее вариант, содержащую 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; и CDR3 тяжелой цепи, содержащую DGPWFAY (SEQ ID NO: 15), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот.

[00113] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1 с SEQ ID NO: 22; VH-CDR2 с SEQ ID NO: 14; и VH-CDR3 с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1 с SEQ ID NO: 13; VH-CDR2 с SEQ ID NO: 14; и VH-CDR3 с SEQ ID NO: 33. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1 с SEQ ID NO: 23; VH-CDR2 с SEQ ID NO: 14; и VH-CDR3 с SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1 с SEQ ID NO: 25; VH-CDR2 с SEQ ID NO: 14; и VH-CDR3 с SEQ ID NO: 15.

[00114] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, содержащую NYHIH (SEQ ID NO: 22), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; VH-CDR2, содержащую WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; и CDR3 тяжелой цепи, содержащую DGPWFAY

(SEQ ID NO: 15), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело EpCAM, содержащие VH-CDR1, содержащую NYYIH (SEQ ID NO: 13), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; VH-CDR2, содержащую WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; и CDR3 тяжелой цепи, содержащую DGYWFAY (SEQ ID NO: 33), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот.

[00115] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит набор определяющих комплементарность областей (CDR): CDR1 вариабельной области тяжелой цепи (VH), VH-CDR2, VH-CDR3, CDR1 вариабельной области легкой цепи (VL), VL-CDR2 и VL-CDR3, где CDR легкой цепи описаны в таблице 3.

Таблица 3. Иллюстративные последовательности CDR легкой цепи антител к EpCAM.

Антитело	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
Мышиные и химерные			
muEpcam23	RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
chEpcam23	RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
Гуманизированные варианты			
huEpCAM23_VLG v1	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
huEpCAM23_VLG v2	RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
huEpCAM23_VLG v3	RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
huEpCAM23_VLG v4	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
Аффинные варианты			
huEpCAM23LCGv4a	RSSRSLLHSNGFTYLY (SEQ ID NO: 43)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)

Антитело	VL-CDR1	VL-CDR2	VL-CDR3
huEpCAM23LCG v4b	RSSRSLLHSDGITYLY (SEQ ID NO:44)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
huEpCAM23LCG v4c	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPWT (SEQ ID NO: 46)
huEpCAM23LCG v4e	RSSRSLLHSDGFTYLS (SEQ ID NO:45)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
huEpCAM23LCG v4 f	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)
huEpCAM23LCG v4g	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	QQNLELPNT (SEQ ID NO: 47)
huEpCAM23LCG v4h	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	LQNLELPNT (SEQ ID NO: 48)
huEpCAM23LCG v4 i	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQYLELPNT (SEQ ID NO: 49)
huEpCAM23LCG v4 j	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQGLELPNT (SEQ ID NO: 50)
huEpCAM23LCG v4k	RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42)	QTSNLAS (SEQ ID NO: 40)	AQSLELPNT (SEQ ID NO: 51)

[00116] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие CDR легкой цепи, в одном ряду в таблице 3.В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VL-CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42-45; VL-CDR2 с SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3, выбранный из SEQ ID NO: 41 и 46-51. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VL-CDR1 с SEQ ID NO: 42; VL-CDR2 с SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3 с SEQ ID NO: 41. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VL-CDR1 с SEQ ID NO: 39; VL-CDR2 с SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3 с SEQ ID NO: 41.

[00117] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие: VL-CDR1, содержащую RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; VL-CDR2,

содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; и VL-CDR3, содержащую AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот. В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие: VL-CDR1, содержащую RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; VL-CDR2, содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот; и VL-CDR3, содержащую AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41), или ее вариант, содержащий 1, 2, 3 или 4 замены консервативных аминокислот.

[00118] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащее VH-CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 13 и 16-25; VH-CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 14 и 26-29; VH-CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 15 и 30-38; VL-CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42-45; VL-CDR2 из SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 41 и 46-51.В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащее VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложено антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15 и 39-41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащее VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13, 26, 15 и 39-41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13, 26, 15, 42, 40 и 41, соответственно.

[00119] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3,

имеющие последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 23, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 25, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно.

[00120] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи (VH), описанную в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности VH, описанной в таблице 4.

Таблица 4. Иллюстративные последовательности вариабельных областей тяжелых цепей антител к EpCAM.

Название антитела	Последовательность
Мышиные и химерные	
muEpCAM23	EVKLEESGPALVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGL DYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGKATLTADKSSSTAFMQLSSLTSED SAVYFCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)
chEpCAm23	EVKLEESGPALVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGL DYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGKATLTADKSSSTAFMQLSSLTSED SAVYFCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 52)
Гуманизированные варианты	
huEpCAM23_VHGv1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEWMGWIYPGNVYIQYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 53)
huEpCAM23_VHGv2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 54)
huEpCAM23_VHGv3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEWMGWIYPGNVYIQYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLR

	SEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 55)
huEpCAM23_VHGv4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYSQKFQGRVTITADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 56)
Аффинные варианты	
huEpCAM23HCGv2a	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 57)
huEpCAM23HCGv2b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 58)
huEpCAM23HCGv2c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 59)
huEpCAM23HCGv2d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGDVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 60)
huEpCAM23HCGv2e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYFIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 61)
huEpCAM23HCGv2f	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYSIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 62)
huEpCAM23HCGv2g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 63)
huEpCAM23HCGv2h	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWFYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)
huEpCAM23HCGv2i	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEWIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65)
huEpCAM23HCGv2j	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWINPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS

	EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66)
huEpCAM23HCG v2k	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCAREGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 67)
huEpCAM23HCG v2l	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPYFAYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO: 68)
Тяжелая цепь huEpCAM23HCG v2m/ huEpCam 23HG2-1565-A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGAWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 69)
huEpCAM23HCG v2n	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPG QRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLR SEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 70)
huEpCAM23HCG v2p	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWVYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLR SEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 71)
huEpCAM23HCG v2q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATITADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 72)
huEpCAM23HCG v2r	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTRDKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 73)
huEpCAM23HCG v2s	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRVTLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 74)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYHIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 75)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYDIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 76)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRS

1565-Y	EDTAVYYCARDGYWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 77)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGSWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 78)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-F	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGFWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 79
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-G	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGGWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 80)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-T	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGTWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 81)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1565-V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGVWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 82)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-I	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYIIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 83)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYLIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 84)

[00121] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, содержащую в общей сложности одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, менее пятнадцати или ноль замен, делеций и/или вставок аминокислот из эталонной последовательности VH, выбранной из SEQ ID NO: 53-84. В некоторых вариантах осуществления вставки, замены, делеции и/или вставки находятся в каркасных областях(-и) эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления замены являются консервативными. В других вариантах осуществления замены являются неконсервативными.

[00122] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53-84. В некоторых вариантах осуществления антитело к

EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53-56. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которую на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 53-56. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 54.

[00123] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 75-77 и 84. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 77. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которую на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 75-77, и 84. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 75. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 77.

[00124] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность вариабельной области легкой цепи (VL), описанную в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VL, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности VL, описанной в таблице 5.

Таблица 5. Иллюстративные последовательности вариабельных областей легких

цепей антител к EpCAM.

Название антитела	Последовательность
Мышиные и химерные	
muEpcam23	DIVLTQTPFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PHLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 85)
chEpcam23	DIVLTQTPFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PHLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 85)
Гуманизированные варианты	
huEpCAM23_VLGv1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWYLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCA QNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 86)
huEpCAM23_VLGv2	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 87)
huEpCAM23_VLGv3	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCA QNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 88)
huEpCAM23_VLGv4	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 89)
Аффинные варианты	
huEpCAM23LCGv4a	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSNGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 90)
huEpCAM23LCGv4b	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGITYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 91)
huEpCAM23LCGv4c	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPWTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 92)
huEpCAM23LC	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLSWFLQKPGQS

Название антитела	Последовательность
Gv4e	PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 93)
huEpCAM23LC Gv4f	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWYLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCA QNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 94)
huEpCAM23LC Gv4g	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 95)
huEpCAM23LC Gv4h	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCLQ NLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 96)
huEpCAM23LC Gv4i	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ YLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 97)
huEpCAM23LC Gv4j	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ GLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 98)
huEpCAM23LC Gv4k	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQS PQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ SLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 99)

[00125] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VL, содержащую в общей сложности одну, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять, десять, менее пятнадцати или ноль замен, делеций и/или вставок аминокислот из эталонной последовательности VH, выбранной из SEQ ID NO: 86-99. В некоторых вариантах осуществления вставки, замены, делеции и/или вставки находятся в каркасных областях(-и) эталонной последовательности. В некоторых вариантах осуществления замены являются консервативными. В других вариантах осуществления замены являются неконсервативными.

[00126] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VL, имеющую последовательность,

выбранную из SEQ ID NO: 86-99. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VL, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 86-89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VH, которую на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, выбранной из SEQ ID NO: 86-89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VL, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность VL, которая на по меньшей мере 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% и 99% идентична последовательности SEQ ID NO: 87.

[00127] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 53-84, и VL, содержащую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 86-89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 55, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 87. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 56, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 88. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 55, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент

антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 56, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89.

[00128] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 76, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 84, и VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 89.

[00129] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела конкурирует за связывание с EpCAM человека с антителом, содержащим последовательности VH и VL, описанные в таблицах 4 и 5, соответственно.

[00130] В одном варианте осуществления изобретение обеспечивает антитело EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, которое конкурирует за связывание с EpCAM человека с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), выбранные из:

(a) вариабельной области тяжелой цепи (VH) с SEQ ID NO: 54 и вариабельной области легкой цепи (VL) с SEQ ID NO: 89;

(b) VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 87;

(c) VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 89; и

(d) VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 89.

[00131] Считается, что антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела «конкурирует» с эталонной молекулой за связывание с EpCAM, если они связываются с EpCAM человека до такой степени, что блокирует до некоторой степени связывание эталонной молекулы с EpCAM человека. Способность белков конкурировать за связывание с EpCAM и, таким образом, препятствовать, блокировать или «перекрестно блокировать» связывание друг друга с EpCAM, может быть определена любым стандартным анализом конкурентного связывания, известным в данной области техники, включая, например, анализ на основе конкурентного ИФА, поверхностный плазмонный резонанс (ППР; BIACORE®, Biosensor, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) или в

соответствии со способами, описанными Scatchard et al. (Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660-672 (1949)). Можно сказать, что антитело конкурентно ингибирует связывание эталонного антитела к EpCAM с EpCAM человека, например, на по меньшей мере 90%, по меньшей мере 80%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 60% или на по меньшей мере 50%.

[00132] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела дополнительно содержит константную область тяжелой цепи или ее фрагмент. В некоторых аспектах антитело или фрагмент антитела содержат константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, выбранную из группы, состоящей из: (a) константной области человеческого IgA или ее фрагмента; (b) константной области человеческого IgD или ее фрагмента; (c) константного домена человеческого IgE или его фрагмента; (d) константной области человеческого IgG1 или ее фрагмента; (e) константной области человеческого IgG2 или ее фрагмента; (f) константной области человеческого IgG3 или ее фрагмента; (g) константной области человеческого IgG4 или ее фрагмента; и (h) константной области человеческого IgM или ее фрагмента. В определенных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константную область тяжелой цепи или ее фрагмент, например, константную область человеческого IgG или ее фрагмент. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который имеет или был мутирован для изменения эффекторной функции и/или периода полужизни.

[00133] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи, описанную в таблице 6.

Таблица 6. Иллюстративные полноразмерные последовательности тяжелых цепей антител к EpCAM.

Название антитела	Последовательность
Мышиные и химерные	
muEpCAM-23HC	EVKLEESGPALVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGL DYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGKATLTADKSSSTAFMQLSSLTSEDS AVYFCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTT GSSVTLGCLVKGYFPESVTVTWNSGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMS SSVTVPSSTWPSQTVTCSVAHPASSTTVDKKLEPSGPISTINPCPPC KECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMISLTPKVTCVVVDVSED DPDVRISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQDW

Название антитела	Последовательность
	MSGKEFKCKVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSR KDVSLTCLVVGFNPGDISVEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSDGSYF IYSKLDIKTSKWEKTDSFSCNVRHEGLKNYYLKKTISRSPGK (SEQ ID NO: 100)
chEpcam23HC	EVKLEESGPALVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGL DYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGKATLTADKSSSTAFMQLSSLTSEDS AVYFCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSL SSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 101)
Гуманизированные варианты	
huEpCAM23_VHGv1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEWMGWIYPGNVYIQYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 102)
huEpCAM23_VHGv2 (связанный с лизином)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

Название антитела	Последовательность
	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 103)
huEpCAM23_ VHGv2-C442 (специфический для сайта)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLCLSPG SLSPG (SEQ ID NO: 104)
huEpCAM23_ VHGv3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEWMGWIYPGNVYIQYNEKFKGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 105)
huEpCAM23_ VHGv4	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYSQKFQGRVTITADKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV

Название антитела	Последовательность
	KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 106)
Аффинные варианты	
huEpCAM23 HCGv2a	QVQLVESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 107)
huEpCAM23 HCGv2b	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 108)
huEpCAM23 HCGv2c	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYNIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 109)
huEpCAM23 HCGv2d	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGDVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 110)
huEpCAM23 HCGv2e	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYFIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 111)
huEpCAM23 HCGv2f	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYSIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 112)
huEpCAM23 HCGv2g	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWIHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 113)
huEpCAM23 HCGv2h	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWFYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 114)
huEpCAM23 HCGv2i /2o	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEWIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 115)
huEpCAM23 HCGv2j	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWINPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 116)
huEpCAM23 HCGv2k	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCAREGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 117)
huEpCAM23 HCGv2L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPYFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 118)
Тяжелая цепь huEpCAM23 HCGv2m/ huEpCam23H G2-1565-A	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGAWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 119)
huEpCAM23 HCGv2n	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMHWVRQAPGQ RLEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 120)
huEpCAM23 HCGv2p	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWVYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 121)
huEpCAM23 HCGv2q	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATITADKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 122)
huEpCAM23 HCGv2r	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTRDKSASTAYMELSSLRSED TAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 123)
huEpCAM23 HCGv2s	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRVTLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 124)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1361-H	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYHIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 125)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1361-D	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYDIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 126)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1565-Y	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGYWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

Название антитела	Последовательность
	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 127)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1565-S	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGSWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 128)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1565-F	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGFWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 129)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1565-G	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGGWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT

Название антитела	Последовательность
	CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 130)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1565-T	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGTWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 131)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1565-V	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGVWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 132)
Тяжелая цепь huEpCam23H G2-1361-I	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYIIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC

Название антитела	Последовательность
	PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 133)
Тяжелая цепь huEpCam23HG2-1361-L	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYLIHWVRQAPGQR LEYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSE DTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 134)

[00134] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи (HC), выбранную из SEQ ID NO: 102-134. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность тяжелой цепи (HC), выбранную из SEQ ID NO: 102-106. В конкретном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность HC SEQ ID NO: 103. В альтернативных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность HC, выбранную из SEQ ID NO: 125-127 и 134. В конкретном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность HC SEQ ID NO: 125. В конкретном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность HC SEQ ID NO: 127.

[00135] В дополнительных аспектах антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константную область легкой цепи

иммуноглобулина. В дополнительном аспекте антитело содержат константную область цепи каппа человеческого Ig или константную область цепи лямбда человеческого Ig.

[00136] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи, описанную в таблице 7.

Таблица 7. Иллюстративные полноразмерные последовательности легкой цепей антител к EpCAM.

Название антитела	Последовательность
Мышиные и химерные	
muEpcam23LC	DIVLTQTPFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPHLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG VYYCAQNLELPNTFGGGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSG GASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKD STYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 135)
chEpCam23LC	DIVLTQTPFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPHLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVG VYYCAQNLELPNTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 136)
Гуманизированные варианты	
huEpCAM23_VLGv1	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWYLQK PGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDV GVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG EC (SEQ ID NO: 137)
huEpCAM23_VLGv2	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 138)

Название антитела	Последовательность
huEpCAM23_VLGv3	DIVMTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 139)
huEpCAM23_VLGv4	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 140)
Аффинные варианты	
huEpCAM23LCGv4a	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSNGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 141)
huEpCAM23LCGv4b	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGITYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 142)
huEpCAM23LCGv4c	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPWTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 143)
huEpCAMGvLC4	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLSWFLQKP

Название антитела	Последовательность
e	GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 144)
huEpCAMGvLC4f	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWYLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 145)
huEpCAMGvLC4g	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCQQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 146)
huEpCAMGvLC4h	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCLQNLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 147)
huEpCAMGvLC4i	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQYLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 148)
huEpCAMGvLC4j	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQGLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD

Название антитела	Последовательность
	STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 149)
huEpCAMGvLC4k	DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKP GQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVG VYYCAQSLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C (SEQ ID NO: 150)

[00137] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи (LC), выбранную из SEQ ID NO: 137-150. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность легкой цепи (LC), выбранную из SEQ ID NO: 137-140. В конкретном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность LC SEQ ID NO: 140. В еще одном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит последовательность LC SEQ ID NO: 138.

[00138] В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 102-134, и LC, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 137-150. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 138. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 105, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 138. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 106, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 139. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент

антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 105, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 106, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 125, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 127, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 126, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 134, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

[00139] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM содержит измененную (например, мутированную или модифицированную) область Fc. Например, в некоторых аспектах область Fc была изменена для уменьшения или усиления эффекторных функций антитела, изменения периода полужизни в сыворотке или других функциональных свойств антитела. В некоторых случаях желательно снижение или устранение эффекторной функции, например, в случае антител, механизм действия которых включает блокирование или антагонизм, но не уничтожение клеток, несущих антиген-мишень. Повышенная эффекторная функция, как правило, желательна, когда направлена на нежелательные клетки, такие как опухолевые и чужеродные клетки, где FcγR экспрессируются на низких уровнях, например, опухолеспецифические B-клетки с низкими уровнями FcγRIIB (например, неходжкинская лимфома, ХЛЛ, и лимфома Беркитта). Иммуноконъюгаты по изобретению, обладающие такой приданной или измененной активностью эффекторной функции, полезны для лечения и/или предотвращения заболевания, расстройства или инфекции, при которых желательна повышенная эффективность активности эффекторной функции. В некоторых аспектах область Fc представляет собой изотип, выбранный из IgM, IgA, IgG, IgE или другого изотипа.

[00140] Хотя область Fc антител к EpCAM и связывающих EpCAM фрагментов антител может обладать способностью связываться с одним или более рецепторами Fc (например, FcγR), в некоторых вариантах осуществления антитело или

фрагмент антитела, которые содержат вариантную область Fc, имеющий измененное связывание с FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) или FcγRIIIB (CD16b) (относительно связывания, проявляемого областью Fc дикого типа), например, будет усиливать связывание с активирующим рецептором и/или будет иметь существенно сниженную способность связываться с ингибирующим рецептором(-ами) или не связываться с ней. Таким образом, область Fc антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела может содержать часть или весь домен CH2 и/или часть или весь домен CH3 полной области Fc, или может содержать вариант CH2 и/или вариант последовательности CH3 (которая может содержать, например, одну или более вставок и/или одну или более делеций по отношению к доменам CH2 или CH3 полной области Fc). Такие области Fc могут содержать части полипептида, которые не являются Fc, или могут содержать части неприродных полных областей Fc, или могут содержать неприродные ориентации доменов CH2 и/или CH3 (таких как, например, два домена CH2 или два домена CH3, или в направлении от N-конца к C-концу домен CH3, связанный с доменом CH2, и т. д.).

[00141] Модификации области Fc, идентифицированные как изменяющие эффекторную функцию, известны в данной области техники, включая модификации, которые увеличивают связывание с активирующими рецепторами (например, FcγRIIA (CD16A) и уменьшают связывание с ингибирующими рецепторами (например, FcγRIIB (CD32B) (см., например, Stavenhagen, et al., Cancer Res. 57(18):8882-8890 (2007)). В таблице 8 перечислены иллюстративные одиночные, двойные, тройные, четырехкратные и пятикратные замены (нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat, а замены относятся к аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 304) иллюстративной модификации, которая увеличивает связывание с активирующими рецепторами и/или уменьшает связывание с ингибирующими рецепторами.

Таблица 8

Варианты предпочтительных активирующих областей Fc

Односайтовые варианты			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
Двухсайтовые варианты			
F243L и R292P	F243L и Y300L	F243L и P396L	R292P и Y300L
D270E и P396L	R292P и V305I	P396L и Q419H	P247L и N421K
R292P и P396L	Y300L и P396L	R255L и P396L	R292P и P305I

Таблица 8 Варианты предпочтительных активирующих областей Fc			
K392T и P396L			
Трехсайтовые варианты			
F243L, P247L и N421K		P247L, D270E и N421K	
F243L, R292P и Y300L		R255L, D270E и P396L	
F243L, R292P и V305I		D270E, G316D и R416G	
F243L, R292P и P396L		D270E, K392T и P396L	
F243L, Y300L и P396L		D270E, P396L и Q419H	
V284M, R292L и K370N		R292P, Y300L и P396L	
Четырехсайтовые варианты			
L234F, F243L, R292P и Y300L		F243L, P247L, D270E и N421K	
L234F, F243L, R292P и Y300L		F243L, R255L, D270E и P396L	
L235I, F243L, R292P и Y300L		F243L, D270E, G316D и R416G	
L235Q, F243L, R292P и Y300L		F243L, D270E, K392T и P396L	
P247L, D270E, Y300L и N421K		F243L, R292P, Y300L и P396L	
R255L, D270E, R292G и P396L		F243L, R292P, V305I и P396L	
R255L, D270E, Y300L и P396L		F243L, D270E, P396L и Q419H	
D270E, G316D, P396L и R416G			
Пятисайтовые варианты			
L235V, F243L, R292P, Y300L и P396L		F243L, R292P, V305I, Y300L и P396L	
L235P, F243L, R292P, Y300L и P396L			

[00142] Иллюстративные варианты областей Fc IgG1 человека с пониженным связыванием с CD32B и/или повышенным связыванием с CD16A содержат замены F243L, R292P, Y300L, V305I или P396L, при этом нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat. Эти аминокислотные замены могут присутствовать в области Fc IgG1 человека в любой комбинации. В одном варианте осуществления вариантная область Fc IgG1 человека содержит замену F243L, R292P и Y300L. В еще одном варианте осуществления вариантная область Fc IgG1 человека содержит замену F243L, R292P, Y300L, V305I и P396L.

[00143] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константную область тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащую модификацию, которая снижает эффекторную функцию

(см., например, Idusogie et al., J. Immunol. 166:2571-2575 (2001); Sazinsky et al., PNAS USA 105:20167-20172 (2008); Davis et al., J. Rheumatol. 34:2204-2210 (2007); Bolt et al., Eur. J. Immunol. 23:403-411 (1993); Alegre et al., Transplantation 57:1537-1543 (1994); Xu et al., Cell Immunol. 200:16-26 (2000); Cole et al., Transplantation 68:563-571 (1999); Hutchins et al., PNAS USA 92:11980-11984 (1995); Reddy et al., J. Immunol. 164:1925-1933 (2000); WO97/11971, и WO07/106585; публикацию заявки США 2007/0148167A1; McEarchern et al., Blood 109:1185-1192 (2007); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); and Kumagai et al., J. Clin. Pharmacol. 47:1489-1497 (2007), содержание каждого из которых включено в данный документе в качестве ссылки в полном объеме).

[00144] В некоторых вариантах осуществления предпочтительно, чтобы область Fc антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела демонстрировала пониженное (или практически полное отсутствие) связывание с эффекторным рецептором, выбранным из группы, состоящей из: FcγRIA (CD64), FcγRIIA (CD32A) (аллотипы R131 и H131), FcγRIIB (CD32B), FcγRIIIA (CD16a) (аллотип V158 и F158) и FcγRIIIB (CD16b) (аллотип FcγIIIb-NA1 и FcγIIIb-NA2); относительно связывания, проявляемого областью Fc IgG дикого типа (SEQ ID NO: 304). В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания эффекторного рецептора варианта области Fc антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела снижена до 1/10 или менее, 1/50 или менее или 1/100 или менее по сравнению с аффинностью связывания соответствующего антитела или связывающего фрагмента антитела, содержащих область Fc дикого типа соответствующего иммуноглобулина.

[00145] В конкретном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит область Fc IgG, которая проявляет пониженную эффекторную функцию (например, пониженную АЗКЦ), и содержит модификацию в одном или более положениях аминокислот, выбранных из группы, состоящей из 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 265, 266, 267, 269, 270, 271, 295, 296, 297, 298, 300, 324, 325, 327, 328, 329, 331 и 332, при этом нумерация аминокислотных положений соответствует индексу EU, описанному в Kabat. В одном варианте осуществления домен CH2-CH3 антитела EpCAM содержит любые 1, 2, 3 или 4 замены: L234A, L235A, D265A, N297Q, N297A и N297G, при этом нумерация соответствует индексу EU как в Kabat. В еще одном варианте осуществления домены CH2-CH3 содержат замену N297Q, замену N297A или замены L234A и L235A, поскольку эти мутации отменяют связывание FcR. Альтернативно, антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит домен CH2-CH3 природной области Fc, который по своей природе демонстрирует пониженное (или практически полное

отсутствие) связывание с FcγRIIIA (CD16a) и/или пониженную эффекторную функцию (относительно связывания и эффекторной функции, проявляемой областью Fc IgG1 дикого типа (SEQ ID NO: 304). В конкретном варианте осуществления константная область Fc антитела EpCAM содержит область Fc IgG2 (SEQ ID NO: 305) или область Fc IgG4 (SEQ ID: NO: 306). Поскольку замены N297A, N297G, N297Q, L234A, L235A и D265A отменяют эффекторную функцию, в обстоятельствах, при которых желательна эффекторная функция, эти замены предпочтительно не использовать.

[00146] Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 содержащего области Fc антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела, которые имеют сниженную или отмененную эффекторную функцию, содержит замены L234A/L235A (показаны подчеркнутыми) (SEQ ID NO: 307):

APE<u>AA</u>GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG

[00147] Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 содержащего область Fc антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела, у которых снижена или отменена эффекторная функция, содержит замену N297A (показана подчеркнутой) (SEQ ID NO: 308):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQY<u>A</u>STY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG

[00148] Предпочтительная последовательность IgG1 для доменов CH2 и CH3 содержащего область Fc антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела, у которых снижена или отменена эффекторная функция, содержит замену N297Q (показана подчеркнутой) (SEQ ID NO: 309):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQY<u>Q</u>STY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTPPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNHYTQKS LSLSPG

[00149] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или

связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит одну или более модификаций, соответствующих: IgG1-C220S, C226S, C229S, P238S; IgG1-C226S, C229S; IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; IgG1-L234A, L235A; IgG1-L234F, L235E, P331S; IgG1-L234F, L235E, P331S; IgG1-H268Q, A330S, P331S; IgG1-G236R, L328R; IgG1-L235G, G236R, IgG1-N297A; IgG1-N325A, L328R; IgG1-N325L, L328R; IgG1-K326W, E333S; IgG2-V234A, G237A; IgG2-E333S; IgG2 H268Q, V309L, A330S, A331S; IgG4-S228P, L236E; IgG4-F234A, L235A; IgG4-F234A, G237A, E318A; IgG4-L235A, G237A, E318A; IgG4-L236E; последовательности IgG2-EU 118-260; и последовательности IgG4-EU 261-447; при этом нумерация положений соответствует индексу EU, как в Kabat.

[00150] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который имеет пониженную активность КЗЦ. В конкретных аспектах, антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую мутацию, которая снижает активность КЗЦ (см., например, WO 1997/11971 и WO 2007/106585; публикацию заявки США 2007/0148167A1; McEarchern et al., Blood 109:1185-1192 (2007); Hayden-Ledbetter et al., Clin. Cancer 15:2739-2746 (2009); Lazar et al., PNAS USA 103:4005-4010 (2006); Bruckheimer et al., Neoplasia 11:509-517 (2009); Strohl, Curr. Op. Biotechnol. 20:685-691 (2009); and Sazinsky et al., PNAS USA 105:20167-20172 (2008); каждая из которых включена в данный документ в полном объеме посредством ссылки). Примеры модификаций последовательности константного домена тяжелой цепи, которые снижают КЗЦ, включают одну или более модификаций, соответствующих: IgG1-C226S, C229S, E233P, L234V, L235A; IgG1-C226S, P230S; IgG1-L234F, L235E, P331S; IgG1-S239D, A330L, I332E; последовательности IgG2 118-260 по EU; последовательности IgG4 261-447 по EU; и IgG2-H268Q, V309L, A330S, A331S, согласно индексу EU

[00151] В некоторых вариантах осуществления предложенное антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина, который содержит одну или более аминокислотных модификаций аминокислоты, увеличивающих период полужизни (например, замен). Многочисленные мутации, способные увеличивать период полужизни молекулы, содержащей область Fc, известны в данной области техники и охватываются как компоненты антител к EpCAM и связывающих EpCAM фрагментов антител, предложенных в данном документе. См., например, патенты США № 6277375; 7083784; 7217797 и 8088376; публикации США №№ 2002/0147311; и 2007/0148164; и публикации PCT №№ WO 1998/23289; WO 2009/058492; и WO 2010/033279, содержание каждого из

которых включено в данный документе посредством ссылки в полном объеме.

[00152] Период полужизни в сыворотке белков, содержащих области Fc, может быть увеличен за счет увеличения аффинности связывания области Fc с FcRn. Термин «период полужизни», используемый в данном документе, означает фармакокинетическое свойство молекулы, которое является мерой средней продолжительности сохранения молекул после их введения. Период полужизни может быть выражен в виде времени, необходимого для элиминации пятидесяти процентов (50%) известного количества молекулы из тела субъекта (например, пациента-человека или другого млекопитающего) или его конкретного компартмента, например, при измерении в сыворотке, то есть с периодом полужизни в кровотоке, или в других тканях. Как правило, увеличение периода полужизни приводит к увеличению среднего времени удержания (MRT) в кровотоке для введенной молекулы.

[00153] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит замену, увеличивающую период полужизни, в одном или более положениях, выбранных из группы, состоящей из: 238, 250, 252, 254, 256, 257, 256, 265, 272, 286, 288, 303, 305, 307, 308, 309, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424, 428, 433, 434, 435, и 436, где нумерация аминокислотных положений соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела к EpCAM содержит одну или более аминокислотных замен аминокислотных остатков в положениях 251-257, 285-290, 308-314, 385-389 и 428-436, где нумерация аминокислотных положений соответствует индексу EU. В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит одну или более из аминокислотной замены в положении 252 по Kabat на Tyr, Phe, Trp или Thr; аминокислотной замены в положении 254 по Kabat на Thr; аминокислотной замены в положении 256 по Kabat на Ser, Arg, Gln, Glu, Asp или Thr; аминокислотной замены в положении 257 по Kabat на Leu; аминокислотной замены в положении 309 по Kabat на Pro; аминокислотной замены в положении 311 по Kabat на Ser; аминокислотной замены в положении 428 по Kabat на Thr, Leu, Phe или Ser; аминокислотной замены в положении 433 по Kabat на Arg, Ser, Iso, Pro или Gln; или аминокислотной замены в положении 434 по Kabat на Trp, Met, Ser, His, Phe или Tyr. Более конкретно, домен антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела может содержать аминокислотные замены относительно константного домена человеческого IgG дикого типа, включая замену аминокислоты в положении 252 по Kabat на Tyr, замену аминокислоты в положении 254 по Kabat на Thr и замену аминокислоты в положении 256 по Kabat на Glu.

[00154] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит по меньшей мере одну замену, выбранную из: T250Q, M252Y, S254T, T256E, K288D, T307Q, V308P, A378V, M428L, N434A, N434S, N434H, N434Y, H435K, и Y436I, в котором нумерация соответствует индексу EU, как в Kabat. В дополнительных вариантах осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит замены, выбранные из: (a) M252Y, S254T и T256E; (b) M252Y и S254T; (c) M252Y и T256E; (d) T250Q и M428L; (e) T307Q и N434A; (f) A378V и N434A; (g) N434A и Y436I; (h) V308P и N434A; и (i) K288D и H435K.

[00155] В предпочтительном варианте осуществления антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит вариантную область Fc IgG, содержащую любые 1, 2 или 3 из замен M252Y, S254T и T256E. В изобретении также предложены антитела к EpCAM или связывающие EpCAM фрагменты антител, содержащие вариантные области Fc, содержащие: (a) одну или более мутаций, которые изменяют эффекторную функцию и/или FcγR; и (b) одну или более мутаций, которые увеличивают период полужизни в сыворотке.

Активируемые антитела к EpCAM

[00156] В дополнительных вариантах осуществления в изобретении предложены активируемые антитела к EpCAM (например, активируемые антитела к EpCAM и фрагменты связывающих EpCAM активируемых антител). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, который специфически связывает EpCAM (например, EpCAM человека), связанное с маскирующим фрагментом (MM), так что связывание MM снижает способность антитела к EpCAM. или связывающего EpCAM фрагмента антитела связывать EpCAM. В некоторых вариантах осуществления MM соединяется через последовательность, которая включает субстрат для протеазы, например, протеазу, которая активна в пораженной ткани, и/или протеазу, которая локализована совместно с EpCAM в подвергаемой лечению области у субъекта. Активируемые антитела к EpCAM предпочтительно стабильны в кровотоке, активируются в намеченных участках терапии и/или диагностики, но не в норме, например, в здоровой ткани или другой ткани, которая не является целью лечения и/или диагностики, и при активации проявляют связывание с EpCAM, которое по меньшей мере сопоставимо с соответствующим немодифицированным антителом. Также предложены иммуноконъюгаты, содержащие активируемое антитело к EpCAM, а также нуклеиновые кислоты или наборы нуклеиновых кислот, кодирующие активируемые антитела к EpCAM,

а также векторы и клетки-хозяева, содержащие нуклеиновые кислоты. Также предложены фармацевтические композиции, содержащие активируемые антитела, иммуноконъюгаты, нуклеиновые кислоты, векторы и клетки-хозяева.

[00157] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM или фрагмент антитела дополнительно содержит

(a) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом или фрагментом антитела, при этом расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом или фрагментом антитела, при этом маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии,

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент).

[00158] Активируемое антитело к EpCAM, содержащее:

(a) антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности члена, выбранного из группы:

(i) SEQ ID NO: 13-15, 42, 40, и 41, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 13-15, и 39-41, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 13, 26, 15, и 39-41, соответственно; и

(iv) SEQ ID NO: 13, 24, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

(c) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы;

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент).

[00159] Активируемые антитела к EpCAM в активированном состоянии

связывают EpCAM человека и содержат (i) антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела (Ат), которое специфически связывается с EpCAM человека (например, как описано в данном документе); (ii) маскирующий фрагмент (ММ), который, когда активируемое антитело к EpCAM находится в нерасщепленном состоянии, ингибирует связывание активируемого антитела к EpCAM с EpCAM; и (c) расщепляемый фрагмент (СМ), связанный с антителом EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, где СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в нерасщепленном состоянии имеет следующую структурную структуру от N-конца к C-концу: ММ-СМ-Ат или Ат-СМ-ММ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит связывающий пептид между ММ и СМ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит связывающий пептид между СМ и Ат.

[00160] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в нерасщепленном состоянии специфически связывается с EpCAM млекопитающего с константой диссоциации меньше или равной 1 нМ, меньше или равной 5 нМ, меньше или равной 10 нМ, меньше или равной до 15 нМ, меньше или равной 20 нМ, меньше или равной 25 нМ, меньше или равной 50 нМ, меньше или равной 100 нМ, меньше или равной 150 нМ, меньше или равной 250 нМ, меньше или равной 500 нМ, меньше или равной 750 нМ, меньше или равной 1000 нМ и 122 и/или меньше или равной 2000 нМ.

[00161] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в нерасщепленном состоянии специфически связывается с EpCAM млекопитающего (например, EpCAM человека или EpCAM яванского кролика) с константой диссоциации больше или равной 1 нМ, больше или равной 5 нМ, больше чем или равной 10 нМ, больше или равной 15 нМ, больше или равной 20 нМ, больше или равной 25 нМ, больше или равной 50 нМ, больше или равной 100 нМ, больше или равной 150 нМ, больше или равной 250 нМ, больше или равной 500 нМ, больше или равной 750 нМ, больше или равной 1000 нМ и 122 и/или больше или равной 2000 нМ.

[00162] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в нерасщепленном состоянии специфически связывается с EpCAM млекопитающего (например, EpCAM человека или EpCAM яванского кролика) с константой диссоциации в диапазоне от 1 нМ до 2000 нМ, 1 нМ до 1000 нМ, от 1 нМ до 750 нМ, от 1 нМ до 500 нМ, от 1 нМ до 250 нМ, от 1 нМ до 150 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 50 нМ, от 1 нМ до 25 нМ, от 1 нМ до 15 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ,

от 5 нМ до 2000 нМ, от 5 нМ до 1000 нМ, от 5 нМ до 750 нМ, от 5 нМ до 500 нМ, от 5 нМ до 250 нМ, от 5 нМ до 150 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 50 нМ, от 5 нМ до 25 нМ, от 5 нМ до 15 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, от 10 нМ до 2000 нМ, от 10 нМ до 1000 нМ, от 10 нМ до 750 нМ, от 10 нМ до 500 нМ, от 10 нМ до 250 нМ, от 10 нМ до 150 нМ, от 10 нМ до 100 нМ, от 10 нМ до 50 нМ, от 10 нМ до 25 нМ, от 10 нМ до 15 нМ, от 15 нМ до 2000 нМ, от 15 нМ до 1000 нМ, от 15 нМ до 750 нМ, от 15 нМ до 500 нМ, от 15 нМ до 250 нМ, от 15 нМ до 150 нМ, от 15 нМ до 100 нМ, от 15 нМ до 50 нМ, от 15 нМ до 25 нМ, от 25 нМ до 2000 нМ, от 25 нМ до 1000 нМ, от 25 нМ до 750 нМ, от 25 нМ до 500 нМ, от 25 нМ до 250 нМ, от 25 нМ до 150 нМ, от 25 нМ до 100 нМ, от 25 нМ до 50 нМ, от 50 нМ до 2000 нМ, от 50 нМ до 1000 нМ, от 50 нМ до 750 нМ, от 50 нМ до 500 нМ, от 50 нМ до 250 нМ, от 50 нМ до 150 нМ, от 50 нМ до 100 нМ, от 100 нМ до 2000 нМ, от 100 нМ до 1000 нМ, от 100 нМ до 750 нМ, от 100 нМ до 500 нМ, от 100 нМ до 250 нМ, от 100 нМ до 150 нМ, от 150 нМ до 2000 нМ, от 150 нМ до 1000 нМ, от 150 нМ до 750 нМ, от 150 нМ до 500 нМ, от 150 нМ до 250 нМ, от 250 нМ до 2000 нМ, от 250 нМ до 1000 нМ, от 250 нМ до 750 нМ, от 250 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 2000 нМ, от 500 нМ до 1000 нМ, от 500 нМ до 750 нМ, от 500 нМ до 500 нМ, от 500 нМ до 250 нМ, от 500 нМ до 150 нМ, от 500 нМ до 100 нМ, от 500 нМ до 50 нМ, от 750 нМ до 2000 нМ, от 750 нМ до 1000 нМ, или от 1000 нМ до 2000 нМ.

[00163] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в активированном состоянии специфически связывается с EpCAM млекопитающих (например, EpCAM человека или EpCAM яванского макака) с константой диссоциации, которая меньше или равна 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в активированном состоянии специфически связывается с EpCAM млекопитающего с константой диссоциации больше или равной 0,01 нМ, 0,05 нМ, 0,1 нМ, 0,5 нМ, 1 нМ, 5 нМ или 10 нМ.

[00164] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM в активированном состоянии специфически связывается с EpCAM млекопитающего (например, EpCAM человека или EpCAM яванского макака) с константой диссоциации в диапазоне от 0,01 нМ до 100 нМ, 0,01 нМ до 10 нМ, от 0,01 нМ до 5 нМ, от 0,01 нМ до 1 нМ, от 0,01 до 0,5 нМ, от 0,01 нМ до 0,1 нМ, от 0,01 нМ до 0,05 нМ, от 0,05 нМ до 100 нМ, от 0,05 нМ до 10 нМ, от 0,05 нМ до 5 нМ, от 0,05 нМ до 1 нМ, от 0,05 до 0.5 нМ, от 0,05 нМ до 0.1 нМ, от 0,1 нМ до 100 нМ, от 0,1 нМ до 10 нМ, от 0,1 нМ до 5 нМ, от 0,1 нМ до 1 нМ, от 0,1 до 0,5 нМ, от 0,5 нМ до 100 нМ, от 0,5 нМ до 10 нМ, от 0,5 нМ до 5 нМ, от 0,5 нМ до 1 нМ, от 1 нМ до 100 нМ, от 1 нМ до 10 нМ, от 1 нМ до 5 нМ, от 5 нМ до 100 нМ, от 5 нМ до 10 нМ, или от 10 нМ до 100 нМ.

[00165] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM специфически связывается с EpCAM человека с константой диссоциации менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM специфически связывается с EpCAM яванского макака с константой диссоциации менее 1 нМ. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM специфически связывается с EpCAM человека и EpCAM яванского макака с константой диссоциации менее 1 нМ.

[00166] В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке активируемого антитела к EpCAM больше, чем у соответствующего антитела; например, pK активируемого антитела EpCAM длиннее, чем у соответствующего антитела. В некоторых вариантах осуществления период полужизни в сыворотке активируемого антитела к EpCAM аналогичен периоду полужизни соответствующего антитела.

[00167] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2 и VH-CDR3, имеющие последовательности, указанные в одной строке таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, указанные в одной строке таблицы 3.

[00168] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащее VH-CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 13 и 16-25; VH-CDR2, выбранную из SEQ ID NO: 14 и 26-29; VH-CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 15 и 30-38; VL-CDR1, выбранную из SEQ ID NO: 39 и 42-45; VL-CDR2 из SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3, выбранную из SEQ ID NO: 41 и 46-51.

[00169] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы, состоящей из: (i) SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно; (ii) SEQ ID NO: 13-15 и 39-41, соответственно; (iii) SEQ ID NO: 13, 26, 15 и 39-41, соответственно; и (iv) SEQ ID NO: 13, 26, 15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ

ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно.

[00170] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы, состоящей из: (i) SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно; (ii) SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40 и 41, соответственно; (iii) SEQ ID NO: 23, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно, и; (iv) SEQ ID NO: 25, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40 и 41, соответственно.

[00171] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит VH, описанную в таблице 4. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит VL, описанную в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89.

[00172] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит последовательность VH, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична выбранной последовательности из SEQ ID NO: 54, 75 и 77. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит последовательность VL, которая по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична последовательности, содержащей SEQ ID NO: 89.

[00173] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к

EpCAM содержит HC, описанную в таблице 6. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит LC, описанную в таблице 7. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 125, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 127, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

[00174] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, которое специфически связывается с эпитопом во внеклеточной области EpCAM человека (SEQ ID NO: 1). В определенных вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит антитело EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, которое специфически связывается с эпитопом в первом внеклеточном домене (D1) EpCAM человека (SEQ ID NO: 2).

[00175] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит: VH-CDR1, содержащую $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5); VH-CDR2, содержащую $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7); и VH-CDR3, содержащую $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран D и E, X_3 выбран P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит VL-CDR1, содержащую $RSSX_4SLLHSX_{10}G$ $X_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R and K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10); VL-CDR2 легкой цепи, содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и VL-CDR3, содержащую $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L, и Q, X_3 выбран из S, G, Y, и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит VH-CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 13; VH-CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 14; VH-CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15; VL-CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 42; VL-CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

[00176] В некоторых вариантах осуществления VH-CDR1 активируемого

антитела к EpCAM содержит последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I и W (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления VH-CDR3 активируемого антитела к EpCAM содержит последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления VL-CDR3 активируемого антитела к EpCAM содержит последовательность $AQX_3LELPNT$, где X_3 выбран из S, G, Y и N (SEQ ID NO: 12). В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит VH-CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 13; VH-CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 14; VH-CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 15; VL-CDR1, содержащую последовательность SEQ ID NO: 42; VL-CDR2, содержащую последовательность SEQ ID NO: 40; и VL-CDR3, содержащую последовательность SEQ ID NO: 41.

[00177] Подходящие компоненты описанного активируемого антитела к EpCAM также включают антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, которое перекрестно конкурирует за связывание с EpCAM человека и/или EpCAM яванского макака с антителом EpCAM, содержащим VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. Дополнительные подходящие активируемые антитела к EpCAM перекрестно конкурируют за связывание с EpCAM человека и/или EpCAM яванского макака с антителом к EpCAM, содержащим VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. Дополнительные подходящие активируемые антитела к EpCAM перекрестно конкурируют за связывание с EpCAM человека и/или EpCAM яванского макака с антителом к EpCAM, содержащим VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89.

[00178] Предлагаемые в данном документе активируемые антитела к EpCAM содержат маскирующий фрагмент (MM). В некоторых вариантах осуществления маскирующий фрагмент (или «маска») представляет собой аминокислотную последовательность, которая связана или иным образом присоединена к антителу к EpCAM и расположена внутри конструкции активируемого антитела к EpCAM таким образом, что маскирующий фрагмент снижает способность антитела к EpCAM специфически связывать EpCAM. Подходящие маскирующие фрагменты идентифицируют с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные маскирующие фрагменты идентифицируют с использованием способов, описанных в WO 2009/025846, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00179] В некоторых вариантах осуществления ММ активируемого антитела имеет константу диссоциации для связывания с Ат, которая больше, чем константа диссоциации Ат и EpCAM. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации для связывания с Ат, которая не превышает константу диссоциации Ат и EpCAM.

[00180] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет константу диссоциации для связывания с Ат, которая меньше, чем константа диссоциации Ат и EpCAM.

[00181] В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (Kd) ММ по отношению к Ат не более чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 раз или больше, или в 1-5, 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000- 10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000, или 100000-10000000 раз или больше, чем константа диссоциации Ат по отношению к мишени.

[00182] В некоторых вариантах осуществления ММ не мешает или не конкурирует с Ат за связывание с EpCAM, когда активируемое антитело к EpCAM находится в расщепленном состоянии. В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной от 2 до 40 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления ММ представляет собой полипептид длиной до около 40 аминокислот.

[00183] В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ отличается от полипептидной последовательности EpCAM. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ не более чем на 50% идентична любому природному партнеру по связыванию Ат. В некоторых вариантах осуществления полипептидная последовательность ММ отличается от полипептидной последовательности EpCAM и не более чем на 40%, 30%, 25%, 20%, 15% или 10% идентична любому природному партнеру по связыванию Ат.

[00184] В некоторых вариантах осуществления связывание ММ с Ат снижает способность Ат связывать EpCAM, так что константа диссоциации (IQ) Ат при связывании с ММ в отношении EpCAM на по меньшей мере 2, 5, 10, 20, 40, 100, 1000, 10000 больше, чем IQ Ат, когда оно не связано с ММ в отношении EpCAM.

[00185] В некоторых вариантах осуществления в присутствии EpCAM ММ снижает способность Ат связывать EpCAM по меньшей мере на 90%, когда СМ не расщеплен, по сравнению с тем, когда СМ расщепляется при анализе in vitro с

использованием анализа замещения мишени, такого как, например, анализ, описанный в WO 2010/081173, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00186] Когда Ат модифицируется с помощью ММ и находится в присутствии EpCAM человека, специфическое связывание Ат с EpCAM человека снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием Ат, которое не модифицировано ММ, или специфическим связыванием исходного Ат с EpCAM человека.

[00187] IQ Ат, модифицированного ММ, по отношению к EpCAM человека, в по меньшей мере 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000 или в 100000-10000000 раз больше, чем IQ Ат, которое не модифицировано с помощью ММ, или исходного Ат по отношению к EpCAM человека. Напротив, аффинность связывания Ат, модифицированного ММ, с EpCAM человека в по меньшей мере 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10-100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000, или 100000-10000000 раз ниже, чем аффинность связывания Ат, которое не модифицировано ММ, или исходного Ат по отношению к EpCAM человека.

[00188] В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (Kd) ММ по отношению к Ат приблизительно равна Kd Ат по отношению к EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (Kd) ММ по отношению к Ат не превышает константу диссоциации Ат по отношению к EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (Kd) ММ по отношению к Ат меньше, чем константа диссоциации Ат по отношению к EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления константа диссоциации (Kd) ММ по отношению к Ат больше, чем константа диссоциации Ат по отношению к EpCAM человека.

[00189] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая не превышает Kd в отношении связывания Ат с EpCAM человека.

[00190] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая не меньше, чем Kd в отношении связывания Ат с EpCAM

человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая приблизительно равна Kd в отношении связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая меньше, чем Kd в отношении связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая больше, чем Kd в отношении связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая не более чем в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз больше, чем Kd в отношении связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет Kd в отношении связывания с Ат, которая в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000 или 100-1000 раз больше, чем Kd в отношении связывания Ат с EpCAM человека.

[00191] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая меньше аффинности связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая не превышает аффинность связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая приблизительно равна аффинности связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая меньше аффинности связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая больше, чем аффинность связывания Ат с EpCAM человека.

[00192] В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая в 2, 3, 4, 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500 или 1000 раз меньше, чем аффинность связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая в 1-5, 2-5, 2-10, 5-10, 5-20, 5-50, 5-100, 10-100, 10-1000, 20-100, 20-1000 или в 100-1000 раз меньше, чем аффинность связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ имеет аффинность в отношении связывания с Ат, которая в 2-20 раз меньше, чем аффинность связывания Ат с EpCAM человека. В некоторых вариантах осуществления ММ, не связанный ковалентно с Ат и в эквимолярной концентрации с активируемым антителом к EpCAM, не ингибирует связывание Ат с EpCAM человека.

[00193] Когда Ат модифицируется с помощью ММ и находится в присутствии EpCAM человека специфическое связывание Ат с EpCAM человека снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием Ат, которое не модифицировано ММ, или специфическим связыванием исходного Ат с EpCAM человека.

По сравнению со связыванием Ат, не модифицированного ММ, или связыванием исходного Ат с EpCAM человека, способность Ат связывать EpCAM человека при модификации ММ может быть снижена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% по меньшей мере в течение 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или более при измерении in vivo или в анализе in vitro.

[00194] ММ ингибирует связывание Ат с EpCAM человека. ММ связывает антигенсвязывающий домен Ат и ингибирует связывание Ат с EpCAM человека. ММ может стерически ингибировать связывание Ат с EpCAM человека. ММ может аллостерически ингибировать связывание Ат с его мишенью. В этих вариантах осуществления, когда Ат модифицируется или связывается с ММ и в присутствии мишени отсутствует связывание или по существу отсутствует связывание Ат с EpCAM человека, или оно составляет не более 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40% или 50% связывания Ат с EpCAM человека по сравнению со связыванием Ат, не модифицированного ММ, исходного Ат или Ат, не связанного с ММ, с EpCAM человека в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов, или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении in vivo или в анализе in vitro.

[00195] Когда Ат связывается или модифицируется с помощью ММ, ММ «маскирует», снижает или иным образом ингибирует специфическое связывание Ат с EpCAM человека. Когда Ат связывается или модифицируется с помощью ММ, такое связывание или модификация может вызвать структурное изменение, которое снижает или ингибирует способность Ат специфически связывать свою мишень.

[00196] Ат, связанное с ММ или модифицированное им, может быть представлено следующими формулами (в порядке от амино (N)- концевой области до карбокси (C)- концевой области:

(ММ)-(Ат)

(Ат)-(ММ)

(ММ)-L-(Ат)

(Ат)-L-(ММ)

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, Ат представляет собой антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела, и L представляет собой линкер. Во многих вариантах осуществления может быть желательно вставить в

композицию один или более линкеров, например, гибкие линкеры, чтобы обеспечить гибкость.

[00197] В определенных вариантах осуществления ММ не является природным партнером по связыванию Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не имеет или практически не имеет гомологии с каким-либо природным партнером по связыванию Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% аналогичен любому природному партнеру по связывания Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75% или 80% идентичен любому природному партнеру по связывания Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 25% идентичен любому природному партнеру по связыванию Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 50% идентичен любому природному партнеру по связыванию Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 20% идентичен любому природному партнеру по связыванию Ат. В некоторых вариантах осуществления ММ не более чем на 10% идентичен любому природному партнеру по связыванию Ат.

[00198] В некоторых вариантах осуществления ММ содержит последовательность, описанную в таблице 9. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151-157. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 158-161. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 162-167. В некоторых вариантах осуществления ММ содержит последовательность SEQ ID NO: 155.

Таблица 9. Иллюстративные последовательности маскирующего фрагмента.

Название маски	Последовательность
Маски для гуманизированного антитела EpCAM23Gv4.2	
Ep01-2	PLMTCSDYYTCLNNL (SEQ ID NO: 151)
Ep02	LSCTHSRYDMHCPHM (SEQ ID NO: 152)
Ep03	HYCHSRTDTITHCNA (SEQ ID NO: 153)
Ep04	WCPRLFDRPSMGCPT (SEQ ID NO: 154)
Ep05	WWPPCQGGAWCEQRI (SEQ ID NO: 155)
Ep07	HSGCPRLFDRCSAPA (SEQ ID NO: 156)
Ep11	FICPTLYDRPHCMHT (SEQ ID NO: 157)

Название маски	Последовательность
Маски для аффинного варианта 1565-Y	
Ep101	SWCHSATDTILPCSN (SEQ ID NO: 158)
Ep102	SPACSDRYYQTCVLN (SEQ ID NO: 159)
Ep103	MSCVVDRFDRQCPHL (SEQ ID NO: 160)
Ep104	TTRCEHYWFTCPLSP (SEQ ID NO: 161)
Маски для аффинного варианта 1361-H	
Ep105	DCTGYSPSVLPACRV (SEQ ID NO: 162)
Ep106	FCSGYSPSVLPSCLM (SEQ ID NO: 163)
Ep107	SKPCSYMHPYCFYNS (SEQ ID NO: 164)
Ep108	LTRCTIAHPYCYYNY (SEQ ID NO: 165)
Ep109	PNTCMSERRICSLTY (SEQ ID NO: 166)
Ep110	PRPHCAILRQCLAAT (SEQ ID NO: 167)

[00199] Предлагаемые в данном документе активируемые антитела к EpCAM содержат расщепляемый фрагмент. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент (или «субстрат») включает аминокислотную последовательность, которая является субстратом для протеазы, как правило, внеклеточной протеазы. Подходящие субстраты идентифицируются с использованием любого из множества известных способов. Например, пептидные субстраты идентифицируют с использованием способов, описанных в патентах США №№ 7666817 и 8563269; и WO 2014/026136, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки (см. также Boulware et al., Biotechnol Bioeng. 106(3):339-346 (2010)).

[00200] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела к EpCAM содержат Ат, которое модифицировано ММ, а также содержат один или более расщепляемых фрагментов (СМ). Такие активируемые антитела к EpCAM проявляют активируемое/переключаемое связывание с EpCAM человека. Активируемые антитела к EpCAM, как правило, содержат антитело или фрагмент антигенсвязывающего антитела (Ат), модифицированное или связанное с маскирующим фрагментом (ММ) и модифицируемым или расщепляемым фрагментом (СМ). В некоторых вариантах осуществления СМ содержит аминокислотную последовательность, которая служит субстратом по меньшей мере для одной протеазы.

[00201] Элементы активируемых антител к EpCAM расположены так, что ММ и СМ расположены таким образом, что в расщепленном (или относительно активном) состоянии и в присутствии EpCAM человека активируемое антитело к EpCAM связывает EpCAM человека, но когда активируемое антитело к EpCAM находится в

нерасщепленном (или относительно неактивном) состоянии в присутствии EpCAM человека, специфическое связывание активируемого антитела к EpCAM с EpCAM человека снижается или ингибируется. Специфическое связывание активируемого антитела к EpCAM с EpCAM человека может быть снижено из-за ингибирования или маскировки способности активируемого антитела к EpCAM специфически связывать EpCAM человека посредством MM.

[00202] IQ активируемого антитела к EpCAM, модифицированного MM и CM, по отношению к EpCAM человека по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000 000 или больше, или в 5-10, 10-100, 10-1 000, 10-10000, 10-100000, 10-1000 000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100-1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000-10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000 или в 100000-10000000 раз больше, чем Kj активируемого антитела EpCAM, которое не модифицировано MM и CM, или исходного Ат по отношению к EpCAM человека. Напротив, аффинность связывания Ат, модифицированного MM и CM, по отношению к EpCAM человека по меньшей мере в 5, 10, 25, 50, 100, 250, 500, 1000, 2500, 5000, 10000, 50000, 100000, 500000, 1000000, 5000000, 10000000, 50000000 или больше, или в 5-10, 10-100, 10-1000, 10-10000, 10- 100000, 10-1000000, 10-10000000, 100-1000, 100-10000, 100-100000, 100- 1000000, 100-10000000, 1000-10000, 1000-100000, 1000-1000000, 1000- 10000000, 10000-100000, 10000-1000000, 10000-10000000, 100000-1000000, или в 100000-10000000 раз ниже аффинности связывания активируемого антитела к EpCAM, не модифицированного MM и CM, или исходного Ат по отношению к EpCAM человека.

[00203] Когда активируемое антитело к EpCAM модифицируется с помощью MM и CM и находится в присутствии EpCAM человека, но не в присутствии модифицирующего агента (например, по меньшей мере одной протеазы), специфическое связывание активируемого антитела к EpCAM с EpCAM человека снижается или ингибируется по сравнению со специфическим связыванием активируемого антитела к EpCAM, не модифицированного MM и CM, или исходного Ат с EpCAM человека. По сравнению со связыванием исходного Ат или связыванием активируемого антитела к EpCAM, не модифицированного с помощью MM и CM, с EpCAM человека, способность активируемого антитела к EpCAM связывать EpCAM человека при модификации с помощью MM и CM может быть снижена по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% и даже 100% в течение по меньшей мере 2, 4, 6, 8, 12, 28, 24, 30, 36, 48, 60, 72, 84 или 96 часов или 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150 или 180 дней, или 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12 месяцев или дольше при измерении in vivo

или в анализе in vitro.

[00204] Используемый в данном документе термин «расщепленное состояние» относится к состоянию активируемых антител к EpCAM после модификации CM по меньшей мере одной протеазой. В контексте данного документам термин «нерасщепленное» или «интактное состояние» относится к состоянию активируемых антител к EpCAM в отсутствие расщепления CM протеазой. Как обсуждалось выше, термин «активируемое антитело» или «активируемое антитело» используется в данном документе для обозначения активируемого антитела к EpCAM как в его нерасщепленном (нативном или интактном) состоянии, так и в его расщепленном состоянии. Обычному специалисту в данной области техники будет очевидно, что в некоторых вариантах осуществления расщепленное активируемое антитело к EpCAM может не иметь MM по причине расщепления CM протеазой, что приводит к высвобождению по меньшей мере MM (например, когда MM не соединяется с активируемым антителом к EpCAM посредством ковалентной связи (например, посредством дисульфидной связи между остатками цистеина).

[00205] Под активируемым или переключаемым подразумевается, что активируемое антитело к EpCAM демонстрирует первый уровень связывания с мишенью, когда активируемое антитело к EpCAM находится в ингибированном, замаскированном, интактном или нерасщепленном состоянии (т. е. в первой конформации), а также второй уровень связывания с EpCAM человека в неингибированном, немаскированном и/или расщепленном состоянии (т.е. во второй конформации), где второй уровень связывания мишени выше, чем первый уровень связывания. В целом, доступность EpCAM человека для Ат активируемого антитела к EpCAM больше в присутствии расщепляющего агента, способного расщеплять CM, т. е. протеазы, чем в отсутствие такого расщепляющего агента. Таким образом, когда активируемое антитело к EpCAM находится в нерасщепленном состоянии, Ат ингибируется в отношении связывания EpCAM человека и может быть замаскировано от связывания EpCAM человека (т. е. первая конформация такова, что Ат не может связывать EpCAM человека), а в расщепленном состоянии Ат не ингибируется или не маскируется в отношении связывания с мишенью.

[00206] CM и Ат активируемых антител к EpCAM выбраны таким образом, чтобы Ат представляет собой связывающий фрагмент для данной мишени, а CM представляет собой субстрат для протеазы. В некоторых вариантах осуществления протеаза совместно локализована с EpCAM человека в подвергаемой лечению области или области диагностического контроля у субъекта. В контексте данного документа термин «совместно локализованный» означает нахождение в одной и той же области или

относительно близко. В некоторых вариантах осуществления протеаза расщепляет СМ с образованием активированного антитела, которое связывается с мишенью, расположенной рядом с сайтом расщепления. Описанные в данном документе активируемые антитела к EpCAM находят особое применение там, где, например, протеаза, способная расщеплять сайт в СМ, т.е. протеаза, присутствует на относительно более высоких уровнях в содержащей мишень ткани подвергаемой лечению области или области диагностического контроля, чем в ткани областей, которые не подвергаются лечению, (например, в здоровой ткани). В некоторых вариантах осуществления СМ по изобретению также расщепляется одной или более другими протеазами. В некоторых вариантах осуществления это одна или более других протеаз, которые локализованы совместно с EpCAM человека и ответственны за расщепление СМ in vivo.

[00207] В некоторых вариантах осуществления активируемые антитела к EpCAM обеспечивают сниженную токсичность и/или неблагоприятные побочные эффекты, которые в противном случае могли бы возникнуть в результате связывания активируемых антител к EpCAM в областях, которые не подвергаются лечению, если активируемые антитела к EpCAM не были замаскированы или иным образом не ингибированы в отношении связывания с EpCAM человека.

[00208] В общем, активируемое антитело к EpCAM может быть сконструировано путем выбора представляющего интерес Ат и конструирования остатка активируемого антитела к EpCAM, так что при ограничении конформационной подвижности ММ обеспечивает маскировку активируемых антител к EpCAM или снижение связывания активируемых антител к EpCAM с EpCAM человека. Критерии структурного конструирования могут быть приняты во внимание для обеспечения этой функциональной особенности.

[00209] Предлагаются активируемые антитела к EpCAM, проявляющие переключаемый фенотип желаемого динамического диапазона для связывания мишени в ингибированной или неингибированной конформации. Динамический диапазон обычно относится к отношению (a) максимального обнаруженного уровня параметра при первом наборе условий к (b) минимальному обнаруженному значению этого параметра при втором наборе условий. Например, в контексте активируемого антитела к EpCAM динамический диапазон относится к отношению (a) максимального обнаруженного уровня связывания белка-мишени с активируемым антителом к EpCAM в присутствии по меньшей мере одной протеазы, способной расщеплять СМ активируемых антител к EpCAM к (b) минимально детектируемому уровню связывания белка-мишени с активируемым антителом к EpCAM в отсутствие протеазы. Динамический диапазон

активируемого антитела к EpCAM может быть рассчитан как отношение константы диссоциации активируемого антитела к EpCAM, обрабатываемого расщепляющим агентом (например, ферментом) к константе диссоциации активируемых антител к EpCAM, обрабатываемых расщепляющим агентом. Чем больше динамический диапазон активируемого антитела к EpCAM, тем лучше переключаемый фенотип активируемого антитела к EpCAM.

[00210] Активируемые антитела к EpCAM, имеющие относительно более высокие значения динамического диапазона (например, более 1), демонстрируют более желательные фенотипы переключения, так что связывание белка-мишени активируемыми антителами к EpCAM происходит в большей степени (например, преимущественно происходит) в присутствии расщепляющего агента (например, фермента), способного расщеплять СМ активируемых антител к EpCAM, чем в отсутствие расщепляющего агента.

[00211] Активируемые антитела к EpCAM могут быть представлены в различных структурных конфигурациях. Иллюстративные формулы активируемых антител к EpCAM представлены ниже. В частности, предполагается, что порядок от N-конца к C-концу Ат, ММ и СМ может быть обратным в пределах активируемого антитела к EpCAM. Также конкретно предполагается, что СМ и ММ могут перекрываться в аминокислотной последовательности, например, так, чтобы СМ содержалась в ММ.

[00212] Например, активируемые антитела к EpCAM могут быть представлены следующей формулой (в порядке от амино (N)- концевой области до карбокси (C)- концевой области:

(ММ)-(СМ)-(Ат)

(Ат)-(СМ)-(ММ)

где ММ представляет собой маскирующий фрагмент, СМ представляет собой расщепляемый фрагмент, а Ат представляет собой антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела. Следует отметить, что хотя ММ и СМ указаны как отдельные компоненты в формулах выше, во всех иллюстративных вариантах осуществления (включая формулы), описанных в данном документе, предполагается, что аминокислотные последовательности ММ и СМ могут перекрываться, например, такие что СМ полностью или частично содержится в ММ. Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или C-конце по отношению к элементам активируемых антител к EpCAM.

[00213] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к

EpCAM содержит СМ, который расщепляется протеазой. В некоторых вариантах осуществления содержание уровень протеазы, которая расщепляет СМ, активна, например, повышается или не повышается иным образом, в пораженной ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе к EpCAM, когда активируемое антитело к EpCAM подвергается действию протеазы.

[00214] В некоторых вариантах осуществления протеаза совместно локализована с EpCAM в ткани, и протеаза расщепляет СМ в активируемом антителе к EpCAM, когда активируемое антитело к EpCAM подвергается действию протеазы.

[00215] В некоторых вариантах осуществления СМ расположен в активируемом антителе к EpCAM, так что, когда активируемое антитело к EpCAM находится в нерасщепленном состоянии, связывание активируемого антитела к EpCAM с EpCAM снижается, чтобы происходить с константой диссоциации, которая в по меньшей мере 2, 5, 10, 20, 40, 50, 100 или в 200 раз больше, чем константа диссоциации немодифицированного Ат, связывающегося с EpCAM, тогда как в расщепленном состоянии (т.е. когда активируемое антитело к EpCAM находится в расщепленном состоянии), Ат связывает EpCAM.

[00216] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот.

[00217] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой полипептид, который включает первый расщепляемый фрагмент (СМ1), который является субстратом по меньшей мере для одной матричной металлопротеазы (MMP), и второй расщепляемый фрагмент (СМ2), который является субстратом по меньшей мере для одной сериновой протеазы (SP). В некоторых вариантах осуществления каждая из последовательности субстрата СМ1 и последовательности субстрата СМ2 из субстрата СМ1-СМ2 независимо представляет собой полипептид длиной до 15 аминокислот.

[00218] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат по меньшей мере для одной протеазы, уровень которая является или предположительно повышается или не повышается иным образом при злокачественном новообразовании. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для одной протеазы, уровень которой является или предположительно повышается при воспалении. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат по меньшей мере для одной протеазы, уровень которой или предположительно повышается или не повышается иным образом при аутоиммунной реакции.

[00219] В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой

субстрат по меньшей мере для одной протеазы, выбранной из матриксной металлопротеазы (MMP), тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, легумаина и сериновой протеазы, такой как матриптаза (MT-SP1), и урокиназа (uPA). Не ограничиваясь теорией, полагают, что эти уровень протеаз повышается или иным образом не повышается по меньшей мере в одном из следующих случаев: злокачественное новообразование, воспаление и/или аутоиммунная реакция.

[00220] Примеры субстратов включают, но не ограничиваются ими, субстраты, расщепляемые одним или более из следующих ферментов или протеаз: ADAMS/ADAMTS (например, ADAM8, ADAM9, ADAM 10, ADAM 12, ADAM 15, ADAM 17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5) аспартат протеаза (например, BACE, ренин); аспарагиновый катепсин (например, катепсин D и катепсин E); каспаза (например, каспаза 1-10, и каспаза 14); цистеиновый катепсин (например, катепсин B, катепсин C, катепсин K, катепсин L, катепсин S, катепсин V/L2, и катепсин X/Z/P); цистеиновая протеиназа (например, крузипаин, легумаин и отубаин-2); KLK (например, KLK4-8, KLK10, KLK 11, KLK 13, и KLK14); металлопротеиназа (например, меприн, неприлизин, PSMA, и BMP1); MMP (например, MMP1-3, MMP 7-17, MMP 19, MMP 20, MMP 23, MMP 24, MMP 26, и MMP 27); сериновая протеаза (например, активированный белок C, катепсин A, катепсин C, химаза, и протеаза фактора свертывания крови, такая как FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, и FXIIa), эластаза (например, человеческая нейтрофильная эластаза); гранзим B; гуанидинобензоатаза; HtrAl; лактоферрин; марапсин; NS3/4A; PACE4; плазмин; PSA, tPA; тромбин; триптаза; uPA; трансмембранная сериновая протеаза II типа (TTSP) (например, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптаза-2, MT-SPl/матриптаза, и TMPRSS2-4).

[00221] В некоторых вариантах осуществления CM выбран для использования со специфической протеазой, например, протеазой, которая, как известно, локализуется совместно с мишенью активируемого антитела к EpCAM.

[00222] В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом по меньшей мере для одной MMP. Примеры MMP включают MMP1-3, MMP 7-17, MMP19, MMP20, MMP23, MMP24, MMP26 и MMP27. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для протеазы, выбранной из MMP 9, MMP 14, MMP1, MMP3, MMP13, MMP 17, MMP11 и MMP19. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для MMP9. В некоторых вариантах осуществления CM является субстратом для MMP14.

[00223] Подходящие CM, которые можно обычным образом включать в предлагаемые активируемые антитела, известны в данной области техники. См.,

например, WO 2016/179285, например, страницы 40-47, содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00224] В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для эластазы нейтрофилов. В некоторых вариантах реализации СМ является субстратом для сериновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для легумаина. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для матриптазы. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом для цистеиновой протеазы. В некоторых вариантах осуществления СМ представляет собой субстрат для цистеиновой протеазы, такой как катепсин. В других вариантах осуществления СМ является субстратом для uPA.

[00225] В конкретных вариантах осуществления СМ является субстратом для uPA. В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность, описанную в таблице 10.

Таблица 10. Примеры последовательностей СМ.

Название субстрата	Последовательность
3014	AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 168)
2014	ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 169)

[00226] В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 168).

[00227] В некоторых вариантах осуществления СМ содержит последовательность ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 169).

[00228] В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для двух протеаз. В некоторых вариантах осуществления каждая протеаза выбрана из следующего: ADAMS/ADAMTS (например, ADAM8, ADAM9, ADAM 10, ADAM 12, ADAM 15, ADAM 17/TACE, ADAMDEC1, ADAMTS1, ADAMTS4, ADAMTS5) аспартат протеаза (например, BACE, ренин); аспарагиновый катепсин (например, катепсин D и катепсин E); каспаза (например, каспаза 1-10, и каспаза 14); цистеиновый катепсин (например, катепсин B, катепсин C, катепсин K, катепсин L, катепсин S, катепсин V/L2, и катепсин X/Z/P); цистеиновая протеиназа (например, крузипаин, легумаин и отубаин-2); KLK (например, KLK4-8, KLK10, KLK 11, KLK 13, и KLK14); металлопротеиназа (например, меприн, неприлизин, PSMA, и BMP1); MMP (например, MMP1-3, MMP 7-17, MMP 19, MMP 20, MMP 23, MMP 24, MMP 26, и MMP 27);

сериновая протеаза (например, активированный белок С, катепсин А, катепсин С, химаза, и протеаза фактора свертывания крови, такая как FVIIa, FIXa, FXa, FXIa, и FXIIa), эластаза (например, человеческая нейтрофильная эластаза); гранзим В; гуанидинобензоатаза; HtrAl; лактоферрин; марапсин; NS3/4A; PACE4; плазмин; PSA, tPA; тромбин; триптаза; uPA; трансмембранная сериновая протеаза II типа (TTSP) (например, DESC1, DPP-4, FAP, гепсин, матриптаза-2, MT-SPl/матриптаза, и TMPRSS2-4. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для двух протеаз, при этом одна из протеаз выбрана из: MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы, а другая протеаза выбрана из вышеперечисленного. В некоторых вариантах осуществления СМ является субстратом по меньшей мере для двух протеаз, выбранных из группы: ММП, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы.

[00229] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит по меньшей мере первую СМ и вторую СМ. В некоторых вариантах осуществления первая СМ и вторая СМ представляют собой полипептиды длиной не более 15 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления первая СМ и вторая СМ в активируемом антителе к EpCAM в нерасщепленном состоянии имеют следующее структурное расположение от N-конца к С-концу: ММ-СМ1-СМ2-Ат или Ат-СМ2-СМ1-ММ. В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере одна из первой СМ и второй СМ представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы, выбранной из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы. В некоторых вариантах осуществления первая СМ расщепляется первым расщепляющим агентом, выбранным из MMP, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы в ткани-мишени, а вторая СМ расщепляется вторым расщепляющим агентом в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления другая протеаза выбрана из перечня, представленного в предыдущем абзаце. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из ММП, тромбина, эластазы нейтрофилов, цистеиновой протеазы, uPA, легумаина и матриптазы, а первая СМ и вторая СМ являются разными субстратами для фермента. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент представляют собой одну и ту же протеазу, выбранную из перечня в предыдущем абзаце. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент представляют собой разные протеазы. В некоторых вариантах осуществления первый расщепляющий агент и второй расщепляющий агент

совместно локализованы в ткани-мишени. В некоторых вариантах осуществления первая СМ и вторая СМ расщепляются по меньшей мере одним расщепляющим агентом в ткани-мишени.

[00230] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM также содержит сигнальный пептид. В некоторых вариантах осуществления сигнальный пептид конъюгирован с активируемым антителом к EpCAM через спейсер. В некоторых вариантах осуществления спейсер конъюгирован с активируемым антителом к EpCAM в отсутствие сигнального пептида. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединен непосредственно к ММ активируемого антитела к EpCAM. В некоторых вариантах осуществления спейсер присоединен непосредственно к ММ активируемого антитела к EpCAM в структурном расположении от N-конца к С-концу спейсер-ММ-СМ-Ат.

[00231] Подходящие спейсеры и технология спейсеров известны в данной области техники и могут, как правило, использоваться для включения спейсеров в некоторых вариантах предлагаемых активируемых антител. См., например, WO 2016/179285 (например, на страницах 52-53), содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00232] Во многих вариантах осуществления может быть желательно вставить один или более линкеров, например, гибкие линкеры, в конструкцию активируемого антитела к EpCAM, таким образом, чтобы обеспечить гибкость в одном или более соединениях ММ-СМ, соединении СМ-Ат, или оба. Например, Ат, ММ и/или СМ могут не содержать достаточного количества остатков (например, Gly, Ser, Asp, Asn, особенно Gly и Ser, в частности Gly) для обеспечения желаемой гибкости. По существу, введение одной или более аминокислот, которое обеспечивает получение гибкого линкера, может иметь полезный эффект на переключаемый фенотип таких конструкций активируемых антител к EpCAM. Кроме того, как описано ниже, когда активируемое антитело к EpCAM предложено в виде конструкции с ограничением конформационной подвижности, гибкий линкер может быть функционально вставлен для облегчения образования и поддержания циклической структуры в нерасщепленном активируемом антителе к EpCAM.

[00233] Например, в некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM имеет одну из следующих формул (где формула ниже представляет аминокислотную последовательность или в направлении от N- к С-концу, или в направлении от С- к N-концу):

(ММ)-L1-(СМ)-(Ат)

(MM)-(CM)-L2-(Ат)

(MM)-L1-(CM)-L2-(Ат)

где MM, CM и Ат имеют указанные выше значения; где каждый из L1 и L2 независимо и необязательно присутствует или отсутствует, и представляют собой одинаковые или разные гибкие линкеры, которые содержат по меньшей мере 1 гибкую аминокислоту (например, Gly). Кроме того, приведенные выше формулы обеспечивают дополнительные аминокислотные последовательности, которые могут быть расположены на N-конце или C-конце по отношению к элементам активируемых антител к EpCAM. Примеры включают, но не ограничиваются ими, нацеливающие фрагменты (например, лиганд для рецептора клетки, присутствующей в ткани-мишени) и фрагменты, увеличивающие период полужизни в сыворотке (например, полипептиды, которые связывают белки сыворотки, такие как иммуноглобулин (например, IgG) или сывороточный альбумин (например, сывороточный альбумин человека (HSA)).

[00234] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM подвергается действию и расщепляется протеазой таким образом, что в активированном или расщепленном состоянии активированное антитело содержит последовательность легкой цепи, которая содержит по меньшей мере часть последовательности LP2 и/или CM после расщепления CM протеазой.

[00235] CM специфически расщепляется по меньшей мере одной протеазой со скоростью около 0,001-1500 x 10^4 $M^{-1}S^{-1}$ или по меньшей мере 0,001, 0,005, 0,01, 0,05, 0,1, 0,5, 1, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 200, 250, 500, 750, 1000, 1250, или 1500 x 10^4 $M^{-1}S^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления CM специфически расщепляется со скоростью около 100000 $M^{-1}S^{-1}$. В некоторых вариантах осуществления CM специфически расщепляется со скоростью от около 1x10^2 до около 1 x 10^6 $M^{-1}S^{-1}$ (т.е. от около 1 x10^2 до около 1 x 10^6 $M^{-1}S^{-1}$).

[00236] Для специфического расщепления ферментом устанавливается контакт между ферментом и CM. Когда активируемое антитело к EpCAM, содержащее Ат (например, антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела), связанное с MM и CM, находится в присутствии EpCAM и достаточной активности фермента, CM может быть отщеплен. Достаточная активность фермента может относиться к способности фермента вступать в контакт с CM и влиять на расщепление. Легко предположить, что фермент может находиться поблизости от CM, но не может расщеплять из-за других клеточных факторов или белковой модификации фермента.

[00237] Линкеры, подходящие для использования в активируемом антителе к EpCAM, описанные в данном документе композиции, как правило, представляют собой

композиции, которые обеспечивают гибкость модифицированного Ат (например, антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела) или активируемого антитела к EpCAM, для облегчения ингибирования связывания активируемого антитела к EpCAM с EpCAM человека. Такие линкеры, как правило, называют гибкими линкерами. Подходящие линкеры могут быть легко выбраны и могут иметь любую подходящую длину, например, от 1 аминокислоты (например, Gly) до 20 аминокислот, от 2 аминокислот до 15 аминокислот, от 3 аминокислот до 12 аминокислот, в том числе от 4 аминокислот до 10 аминокислот, от 5 аминокислот до 9 аминокислот, от 6 аминокислот до 8 аминокислот или от 7 аминокислот до 8 аминокислот, и могут иметь длину в 1, 2, 3, 4, 5, 6 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 аминокислот.

[00238] Иллюстративные гибкие линкеры для активируемых антител, антител и фрагментов антител, предложенных в данном документе, включают полимеры глицина (G)n, полимеры глицин-серин (включая, например, (GS)n. Подходящие линкеры и линкерная технология известны в данной области техники и могут обычно использоваться для включения спейсеров в некоторых вариантах предлагаемых активируемых антител. См., например, WO 2016/179285 (например, на страницах 26, 113-116), содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки. Обычному специалисту в данной области техники понятно, что конструкция активируемых антител к EpCAM может содержать линкеры, которые являются полностью или частично гибкими, так что линкер может содержать гибкий линкер, а также одну или более частей, которые придают менее гибкую структуру для обеспечения желаемой структуры активируемых антител к EpCAM.

[00239] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом активируемое антитело к EpCAM в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-LP1-CM-LP2-Ат или Ат-LP2-CM-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[00240] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM, содержит первый связывающий пептид (LP1) и второй связывающий пептид (LP2), и при этом активируемое антитело к EpCAM в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: MM-LP1-CM-LP2-Ат или Ат-LP2-CM-LP1-MM. В некоторых вариантах осуществления два связывающих пептида не обязательно должны быть идентичными друг другу.

[00241] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один из LP1

или LP2 активируемого антитела к EpCAM содержит гибкий линкер. Подходящие линкеры и линкерная технология известны в данной области техники и могут обычно использоваться для включения спейсеров в некоторых вариантах предлагаемых активируемых антител. См., например, WO 2016/179285 (например, на страницах 26, 113-116), содержание которой полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00242] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, последовательность которой представлена в таблице 11. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 174. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело содержит легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 179.

Таблица 11. Иллюстративные последовательности активируемого антитела с легкими цепями.

Название активируемого антитела	Последовательность
Для применения с тяжелой цепью HuEpCAM23Gv4.2, 1361-H или 1565-Y	
Ep01-2 3014 Lv	QGQSGQGPLMTCSDYYTCLNNLGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 170)
Ep02 3014 Lv	QGQSGQGLSCTHSRYDMHCPHMGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 171)
Ep03 3014 Lv	QGQSGQGHYCHSRTDTITHCNAGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 172)

Ep04 3014 Lv	QGQSGQGWCPRLFDRPSMGCPTGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 173)
Ep05 3014 Lv	QGQSGQGWWPPCQGGAWCEQRIGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDN IGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 174)
Ep07 3014 Lv	QGQSGQGHSGCPRLFDRCSAPAGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 175)
Ep11 3014 Lv	QGQSGQGFICPTLYDRPHCMHTGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 176)
Ep01-2 2014 Lv	QGQSGQGPLMTCSDYYTCLNNLGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDI VLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQL LIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 177)
Ep04 2014 Lv	QGQSGQGWCPRLFDRPSMGCPTGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDI VLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQL LIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV

	YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 178)
Ep05 2014 Lv	QGQSGQGWWPPCQGGAWCEQRIGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDI VLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQL LIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 179)
Ep07 2014 Lv	QGQSGQGHSGCPRLFDRCSAPAGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 180)
Для применения с тяжелой цепью 1565-Y	
Ep101 2014 Lv	QGQSGQGSWCHSATDTILPCSNGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 181)
Ep102 2014 Lv	QGQSGQGSPACSDRYYQTCVLNGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDI VLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQL LIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 182)
Ep103 2014 Lv	QGQSGQGMSCVVDRFDRQCPHLGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDI VLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQL LIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 183)
Ep104 2014 Lv	QGQSGQGTTRCEHYWFTCPLSPGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI

	YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 184)
Ep101 3014 Lv	QGQSGQGSWCHSATDTILPCSNGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNIG GSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQN LELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 185)
Ep102 3014 Lv	QGQSGQGSPACSDRYYQTCVLNGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 186)
Ep103 3014 Lv	QGQSGQGMSCVVDRFDRQCPHLGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 187)
fEp104 3014 Lv	QGQSGQGTTRCEHYWFTCPLSPGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 188)
Для применения с тяжелой цепью 1361-H	
Ep105 2014 Lv	QGQSGQGDCTGYSPSVLPACRVGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 189)

Ep106 2014 Lv	QGQSGQGFCSGYSPSVLPSCLMGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 190)
Ep107 2014 Lv	QGQSGQGSKPCSYMHPYCFYNSGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDI VLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQL LIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 191)
Ep108 2014 Lv	QGQSGQGLTRCTIAHPYCYYNYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 192)
Ep109 2014 Lv	QGQSGQGPNTCMSERRICSLTYGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 193)
Ep110 2014 Lv	QGQSGQGPRPHCAILRQCLAATGGGSSGGSISSGLLSGRSDNIGGSDIV LTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLI YQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 194)
Ep105 3014 Lv	QGQSGQGDCTGYSPSVLPACRVGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY

	EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 195)
Ep106 3014 Lv	QGQSGQGFCSGYSPSVLPSCLMGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNIG GSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQN LELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 196)
Ep107 3014 Lv	QGQSGQGSKPCSYMHPYCFYNSGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 197)
Ep108 3014 Lv	QGQSGQGLTRCTIAHPYCYYNYGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNI GGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPG QSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQ NLELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 198)
Ep109 2014 Lv	QGQSGQGPNTCMSERRICSLTYGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNIG GSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQN LELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 199)
Ep110 3014 Lv	QGQSGQGPRPHCAILRQCLAATGGGSSGGAVGLLAPPGGLSGRSDNIG GSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQ SPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQN LELPNTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY PREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 200)

[00243] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 170-180, и тяжелую цепь, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 103,

125 и 127. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 170-180, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 174, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 179, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103.

[00244] В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 181-188, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 127. В некоторых вариантах осуществления активируемое антитело к EpCAM содержит легкую цепь, имеющую последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 189-200, и тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 125.

[00245] В определенных вариантах осуществления антитело huEpCAM23 кодируется плазмидами, депонированными в Американской коллекции типовых культур (ATCC), расположенной по адресу: Университетский бульвар 10801, Манассас, штат Вирджиния. 20110, 4 октября 2018 г. в соответствии с условиями Будапештского договора и имеющими номера хранения в ATCC PTA-125343 и PTA-125344 или PTA-125345. В данном документе представлены примеры антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела и активируемого антитела к EpCAM, иммуноконъюгатов.

Полинуклеотиды, векторы, клетки-хозяева и рекомбинантные способы

[00246] В изобретении также предложены полинуклеотиды, содержащие нуклеотидную последовательность, кодирующую антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела к EpCAM, описанные в данном документе.

[00247] Полинуклеотиды могут быть получены и нуклеотидная последовательность полинуклеотидов может быть определена с использованием способов, известных в данной области техники. Например, если нуклеотидная последовательность антитела известна, полинуклеотид, кодирующий антитело, может быть собран из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier et al., BioTechniques 17: 242 (1994)), который, вкратце, включает: синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов с помощью ПЦР.

[00248] В некоторых вариантах осуществления полинуклеотид по изобретению содержит последовательность, представленную в таблице 12.

Таблица 12. Иллюстративные последовательности нуклеиновых кислот.

Название антитела	Последовательность
Химерное антитело 23	
Ch Epcam23 HC	gaggtgaagctggaggagagcggccccgccctggtgaagcctggagcttccgtgaggatcagctgtaaggcctctg gctacacctttacaaactactatatccattgggtgaagcagcggccaggacagggcctggactacatcggctggatct atcccggcaacgtgtacatccagtataatgagaagttcaagggcaaggccaccctgacagctgataagtccagctcta ccgcttttatgcagctgtccagcctgacaagcgaggactctgccgtgtacttctgcgctagggatggcccttggtttgcc tattggggccagggcaccctggtgacagtgtcttccgcttccaccaagggcccatcagttttccccttggctccaagttc taaatccacaagcggtggaacagctgcactgggatgcctcgttaaagattatttccctgagcctgtgacagtgagctgg aatagcggagcattgacttcaggtgtgcacacttttcccgctgtgttgcagtcctccggtctgtactcactgtccagtgtc gtaaccgtcccttctagcagcttgggaacccagacctacatctgtaacgtcaaccataaaccatccaacacaaaggtg gataagaaggttgaaccaaagagctgtgataagacacatacatgccctccttgtcctgcaccagagctcctcggaggt ccatctgtgttcctgtttcccccccaaacccaaggacactcttatgatctctcgtactccagaggtcacctgtgttgttgtcg acgtgagccatgaagatcccgaggttaaattcaactggtacgtggatggagtcgaggttcacaatgccaagaccaag cccagggaggagcaatataattctacatatcgggtagtgagcgttctgaccgtgctccaccaagattggctcaatggaa aagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggctcttcccgctcccattgagaaaactatctccaaagccaaggggcag ccacgggaaccccaggtgtatacattgcccccatctagagacgagctgaccaagaaccaggtgagtctcacttgtctg gtcaaggggttttacccttctgacattgctgtagagtgggagtctaacggacagccagaaaacaactacaagacaactc ccccagtgctggacagcgacgggagcttcttcctctactccaagttgactgtagacaagtctagatggcagcaaggaa acgttttctcctgctcagtaatgcatgaggctctgcacaatcactatacccagaaatcactgtcccttagcccaggg (SEQ ID NO: 201)
Ch EpCam23 LC	gatattgtgctgacccagactccattctccaatcccgtcactcttggaacatcagcttccatctcctgcaggtctagtaag agtctcctacatagtgatggcttcacttatttgtattggtttctgcagaagccaggccagtctcctcatctcctgatttatcag acgtccaaccttgcctcaggagtcccagacaggttcagtagcagtgggtcaggaactgatttcacactgagaatcagc agagtggaggctgaagatgtgggtgtttattactgtgctcaaaatctagaacttcccaacacgttcggaggggggacca agctggaaatcaaacgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaact gcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaat cgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgc tgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcac aaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 202)

Гуманизированный вариант 23Gv4.2	
Hu EpCAM23_VHGv2	caggtgcagctggtgcagagcggagctgaggtgaagaagccaggagcttccgtgaaggtgagctgtaaggcctctg gctacaccttcacaaactactatatccattgggtgaggcaggctccaggacagcggctggagtacatcggatggatct atcctggcaacgtgtacatccagtataatgagaagtttaagggcagggccaccctgacagctgacaagagcgcctcta ccgcttacatggagctgtccagcctgagatctgaggacacagccgtgtactattgcgctcgcgatggcccttggtttgc ctattggggccagggcaccctggtgacagtgtcttccgcttccaccaagggcccatcagttttccccttggctccaagtt ctaaatccacaagcggtggaacagctgcactgggatgcctcgttaaagattatttccctgagcctgtgacagtgagctg gaatagcggagcattgacttcaggtgtgcacacttttcccgctgtgttgcagtcctccggtctgtactcactgtccagtgt cgtaaccgtcccttctagcagcttgggaacccagacctacatctgtaacgtcaaccataaaccatccaacacaaaggtg gataagaaggttgaaccaaagagctgtgataagacacatacatgccctccttgtcctgcaccagagctcctcggaggt ccatctgtgttcctgtttcccccaaacccaaggacactcttatgatctctcgtactccagaggtcacctgtgttgttgtcg acgtgagccatgaagatcccgaggttaaattcaactggtacgtggatggagtcgaggttcacaatgccaagaccaag cccagggaggagcaatataattctacatatcgggtagtgagcgttctgaccgtgctccaccaagattggctcaatggaa aagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggctcttcccgctcccattgagaaaactatctccaaagccaaggggcag ccacgggaaccccaggtgtatacattgcccccatctagagacgagctgaccaagaaccaggtgagtctcacttgtctg gtcaaggggttttaccttctgacattgctgtagagtgggagtctaacggacagccagaaaacaactacaagacaactc ccccagtgctggacagcgacgggagcttcttcctctactccaagttgactgtagacaagtctagatggcagcaaggaa acgttttctcctgctcagtaatgcatgaggctctgcacaatcactatacccagaaatcactgtcccttagcccaggg (SEQ ID NO: 203)
Hu EpCAM23_VLGv4	gacatcgtgctgacccagacaccactgtctctgtccgtgaccccaggacagcctgctagcatctcttgtaggtccagca ggtccctgctgcatagcgatggcttcacctacctgtattggtttctgcagaagccaggccagtctccccagctgctgatc taccagacatctaacctggcttccggcgtgcctgacaggttctcttccagcggcagcggcaccgacttcaccctgaag atctctcgggtggaggctgaggacgtgggcgtgtactattgcgctcagaacctggagctgccaaataccttttggccag ggcacaaagctggagatcaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaat ctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgc cctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcac cctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcg cccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 204)
Аффинные варианты (тяжелая цепь)	
Тяжелая цепь Hu EpCam23 HG2-1361-H	caggtgcagctggtgcagagcggagctgaggtgaagaagccaggagcttccgtgaaggtgagctgtaaggcctctg gctacaccttcacaaactaccacatccattgggtgaggcaggctccaggacagcggctggagtacatcggatggatct atcctggcaacgtgtacatccagtataatgagaagtttaagggcagggccaccctgacagctgacaagagcgcctcta ccgcttacatggagctgtccagcctgagatctgaggacacagccgtgtactattgcgctcgcgatggcccttggtttgc ctattggggccagggcaccctggtgacagtgtcttccgcttccaccaagggcccatcagttttccccttggctccaagtt ctaaatccacaagcggtggaacagctgcactgggatgcctcgttaaagattatttccctgagcctgtgacagtgagctg

	gaatagcggagcattgacttcaggtgtgcacacttttcccgctgtgttgcagtcctccggtctgtactcactgtccagtgt cgtaaccgtcccttctagcagcttgggaacccagacctacatctgtaacgtcaaccataaaccatccaacacaaaggtg gataagaaggttgaaccaaagagctgtgataagacacatacatgccctccttgtcctgcaccagagctcctcggaggt ccatctgtgttcctgtttcccccccaaacccaaggacactcttatgatctctcgtactccagaggtcacctgtgttgttgtcg acgtgagccatgaagatcccgaggttaaattcaactggtacgtggatggagtcgaggttcacaatgccaagaccaag cccagggaggagcaatataattctacatatcgggtagtgagcgttctgaccgtgctccaccaagattggctcaatggaa aagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggctcttcccgctcccattgagaaaactatctccaaagccaaggggcag ccacgggaaccccaggtgtatacattgcccccatctagagacgagctgaccaagaaccaggtgagtctcacttgtctg gtcaaggggttttaccttctgacattgctgtagagtgggagtctaacggacagccagaaaacaactacaagacaactc ccccagtgctggacagcgacgggagcttcttcctctactccaagttgactgtagacaagtctagatggcagcaaggaa acgttttctcctgctcagtaatgcatgaggctctgcacaatcactatacccagaaatcactgtcccttagcccagggtga (SEQ ID NO: 205)
Тяжелая цепь Hu EpCam23 HG2-1361-D	caggtgcagctggtgcagagcggagctgaggtgaagaagccaggagcttccgtgaaggtgagctgtaaggcctctg gctacaccttcacaaactacgacatccattgggtgaggcaggctccaggacagcggctggagtacatcggatggatc tatcctggcaacgtgtacatccagtataatgagaagtttaagggcagggccaccctgacagctgacaagagcgcctct accgcttacatggagctgtccagcctgagatctgaggacacagccgtgtactattgcgctcgcgatggcccttggtttg cctattggggccagggcaccctggtgacagtgtcttccgcttccaccaagggcccatcagttttcccccttggctccaagt tctaaatccacaagcggtggaacagctgcactgggatgcctcgttaaagattatttccctgagcctgtgacagtgagct ggaatagcggagcattgacttcaggtgtgcacacttttcccgctgtgttgcagtcctccggtctgtactcactgtccagtg tcgtaaccgtcccttctagcagcttgggaacccagacctacatctgtaacgtcaaccataaaccatccaacacaaaggt ggataagaaggttgaaccaaagagctgtgataagacacatacatgccctccttgtcctgcaccagagctcctcggagg tccatctgtgttcctgtttcccccccaaacccaaggacactcttatgatctctcgtactccagaggtcacctgtgttgttgtcg acgtgagccatgaagatcccgaggttaaattcaactggtacgtggatggagtcgaggttcacaatgccaagaccaag cccagggaggagcaatataattctacatatcgggtagtgagcgttctgaccgtgctccaccaagattggctcaatggaa aagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggctcttcccgctcccattgagaaaactatctccaaagccaaggggcag ccacgggaaccccaggtgtatacattgcccccatctagagacgagctgaccaagaaccaggtgagtctcacttgtctg gtcaaggggttttaccttctgacattgctgtagagtgggagtctaacggacagccagaaaacaactacaagacaactc ccccagtgctggacagcgacgggagcttcttcctctactccaagttgactgtagacaagtctagatggcagcaaggaa acgttttctcctgctcagtaatgcatgaggctctgcacaatcactatacccagaaatcactgtcccttagcccagggtga (SEQ ID NO: 206)
Тяжелая цепь Hu EpCam23 HG2-1565-Y	caggtgcagctggtgcagagcggagctgaggtgaagaagccaggagcttccgtgaaggtgagctgtaaggcctctg gctacaccttcacaaactactatatccattgggtgaggcaggctccaggacagcggctggagtacatcggatggatct atcctggcaacgtgtacatccagtataatgagaagtttaagggcagggccaccctgacagctgacaagagcgcctcta ccgcttacatggagctgtccagcctgagatctgaggacacagccgtgtactattgcgctcgcgatggctactggtttgc ctattggggccagggcaccctggtgacagtgtcttccgcttccaccaagggcccatcagttttcccccttggctccaagtt

	ctaaatccacaagcggtggaacagctgcactgggatgcctcgttaaagattatttccctgagcctgtgacagtgagctg gaatagcggagcattgacttcaggtgtgcacacttttcccgctgtgttgcagtcctccggtctgtactcactgtccagtgt cgtaaccgtcccttctagcagcttgggaacccagacctacatctgtaacgtcaaccataaaccatccaacacaaaggtg gataagaaggttgaaccaaagagctgtgataagacacatacatgccctccttgtcctgcaccagagctcctcggaggt ccatctgtgttcctgtttcccccccaaacccaaggacactcttatgatctctcgtactccagaggtcacctgtgttgttgtcg acgtgagccatgaagatcccgaggttaaattcaactggtacgtggatggagtcgaggttcacaatgccaagaccaag cccagggaggagcaatataattctacatatcgggtagtgagcgttctgaccgtgctccaccaagattggctcaatggaa aagagtacaagtgcaaggtgtccaacaaggctcttcccgctcccattgagaaaactatctccaaagccaaggggcag ccacgggaaccccaggtgtatacattgcccccatctagagacgagctgaccaagaaccaggtgagtctcacttgtctg gtcaaggggttttaccttctgacattgctgtagagtgggagtctaacggacagccagaaaacaactacaagacaactc ccccagtgctggacagcgacgggagcttcttcctctactccaagttgactgtagacaagtctagatggcagcaaggaa acgttttctcctgctcagtaatgcatgaggctctgcacaatcactatacccagaaatcactgtcccttagcccagggtga (SEQ ID NO: 207)
Легкие цепи активируемого антитела (антитело huEpCAMGv4.2)	
Ep05 3014 Lv	cagggacagtctggacagggatggtggccaccttgccagggaggagcttggtgtgagcagaggatcggaggagg ctccagcggaggagctgtgggcctgctggctccaccaggaggactgtctggcagatccgacaacatcggcggctcc gatatcgtgctgacccagacacccctgagcctgtctgtgacccctggccagccagcctccatcagctgcaggtcttcc cggtccctgctgcatagcgacggcttcacctacctgtattggtttctgcagaagcccggccagagccctcagctgctga tctaccagacatctaatctggcttccggcgtgccagacagattcagctcttccggcagcggcaccgacttcaccctgaa gatctctcgcgtggaggccgaggatgtgggcgtgtactattgtgctcagaacctggagctgcccaatacctttggcca gggcacaaagctggagatcaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaa tctggaactgcctctgttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacg ccctccaatcgggtaactcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagca ccctgacgctgagcaaagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctc gcccgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 208)
Ep05 2014 Lv	cagggacagagcggacagggatggtggccaccttgccagggaggagcttggtgtgagcagaggatcggaggagg ctccagcggaggctctatctcttccggcctgctgagcggcagatctgacaacatcggcggctccgatatcgtgctgac ccagacaccactgtccctgagcgtgaccccaggacagccagcctctatctcctgcaggagctctcggtctctgctgca ttccgacggcttcacctacctgtattggtttctgcagaagcctggccagtctccacagctgctgatctaccagacaagca atctggcttctggcgtgcccgacagattctccagctctggctccggcaccgacttcaccctgaagatcagccgcgtgg aggctgaggatgtgggcgtgtactattgtgctcagaacctggagctgcctaataccttggccagggcacaaagctgg agatcaagcgtacggtggctgcaccatctgtcttcatcttcccgccatctgatgagcagttgaaatctggaactgcctct gttgtgtgcctgctgaataacttctatcccagagaggccaaagtacagtggaaggtggataacgccctccaatcgggta actcccaggagagtgtcacagagcaggacagcaaggacagcacctacagcctcagcagcaccctgacgctgagca aagcagactacgagaaacacaaagtctacgcctgcgaagtcacccatcagggcctgagctcgcccgtcacaaagag

	cttcaacaggggagagtgt (SEQ ID NO: 209)

[00249] В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 201 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 202. В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 204. В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 205 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 204. В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 206 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 204. В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 207 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 204.

[00250] В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 208. В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит последовательность нуклеиновой кислоты тяжелой цепи с SEQ ID NO: 203 и последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи с SEQ ID NO: 209.

[00251] В некоторых вариантах осуществления EpBA по изобретению содержит (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в Американской коллекции типовых культур (ATCC®) как PTA-125343, и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125342. Способы получения и применения антител к EpCAM и связывающего EpCAM фрагмента антитела, содержащего EpBA, также охватываются данным изобретением.

[00252] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает антитело к EpCAM, содержащее (i) тяжелую цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125343, и (ii) а легкую

цепь, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125342. Способы получения и применения антитела к EpCAM также охватываются данным изобретением.

[00253] В некоторых вариантах осуществления изобретение обеспечивает активируемое антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент активируемого антитела, содержащий (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной с помощью ATCC® как PTA-125343 и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую ту же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125344. Способы получения и применения активируемых антител к EpCAM или и связывающего EpCAM фрагмента активируемого антитела также охватываются данным изобретением.

[00254] В других вариантах осуществления изобретение обеспечивает активируемое антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент активируемого антитела, содержащее (i) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую ту же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной с ATCC® как PTA-125343 и (ii) вариабельную область легкой цепи, содержащую такую же аминокислотную последовательность, что и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи, кодируемая плазмидой, депонированной в ATCC® как PTA-125345. Способы получения и применения активируемых антител к EpCAM или и связывающего EpCAM фрагмента активируемого антитела также охватываются данным изобретением.

[00255] Способы конструирования рекомбинантных векторов, содержащих последовательности, кодирующие антитела, и соответствующие сигналы контроля транскрипции и трансляции, хорошо известны в данной области. После рекомбинантной экспрессии антитела его можно очистить любым способом, известным в данной области техники для очистки молекулы иммуноглобулина, например, с помощью хроматографии (например, ионного обмена, аффинности, особенно по аффинности к специфическому антигену после белка A, и колоночной хроматографии с распределением по размеру), центрифугирования, дифференциальной растворимости или любого другого стандартного метода очистки белков. В этой связи в настоящем изобретении был упомянут патент США

№ 7538195, содержание которого полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00256] В изобретении также предложены способы получения антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM, описанных в данном документе, путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии антитела и/или активируемого антитела к EpCAM, где клетка содержит молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитело, фрагмент антитела или активируемое антитело.

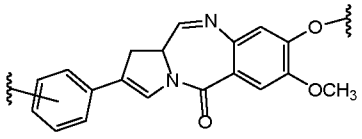
[00257] В изобретении также предложен способ производства активируемых антител к EpCAM, которые в активированном состоянии связывают EpCAM, путем (a) культивирования клетки, содержащей конструкцию нуклеиновой кислоты, кодирующую активируемое антитело к EpCAM, в условиях, которые приводят к экспрессии активируемого антитела к EpCAM, где активируемое антитело к EpCAM содержит маскирующий фрагмент (MM), расщепляемый фрагмент (CM) и Ат (например, и антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела), (i) где CM представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и (ii) где CM расположен в активируемом антителе к EpCAM, так что, когда активируемое антитело к EpCAM находится в нерасщепленном состоянии, MM препятствует специфическому связыванию Ат с EpCAM, а в расщепленном состоянии MM не препятствует или не конкурирует за специфическое связывание Ат с EpCAM; и (b) выделение активируемого антитела к EpCAM. Подходящие Ат, MM и/или CM включают любые Ат, MM и/или CM, описанные в данном документе.

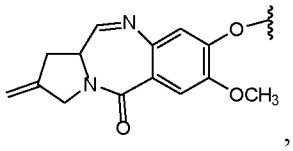
Иммуноконъюгаты

[00258] В одном варианте осуществления в изобретении предложены иммуноконъюгаты, содержащие антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, или активируемое антитело к EpCAM (например, как описано в данном документе), конъюгированное или ковалентно связанное с цитотоксическим агентом. Цитотоксические агенты включают любой агент, который является вредным для клеток, такой как, например, экзотоксин Pseudomonas, дифтерийный токсин, ботулинический токсин A-F, рицин, абрин, сапорин и цитотоксические фрагменты таких агентов. Цитотоксические агенты также включают любой агент, обладающий терапевтическим эффектом для профилактического или терапевтического лечения нарушения. Такие терапевтические агенты могут быть химическими терапевтическими агентами, белковыми или полипептидными терапевтическими агентами и включать терапевтические агенты, которые обладают желаемой биологической активностью и/или модифицируют данный

биологический ответ. Примеры терапевтических агентов включают, без ограничения, алкилирующие агенты, ингибиторы ангиогенеза, антимитотические агенты, агенты гормональной терапии и антитела, полезные для лечения нарушений пролиферации клеток. В определенных вариантах осуществления терапевтический агент представляет собой соединение майтанзиноид, например, описанное в патентах США №№ 5208020 и 7276497, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления терапевтические агенты представляют собой бензодиазепиновые соединения, такие как пирролобензодиазепиновые (PBD) (например, описанные в WO 2010/043880, WO 2011/130616, WO 2009/016516, WO 2013/177481 и WO 2012/112708) и индолинобензодиазепиновые (IGN) соединения (такие как описанные в WO 2010/091150, WO 2012/128868 и US 20170014522, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

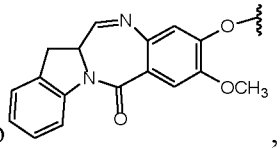
[00259] Используемый в данном термин «пирролобензодиазепин» (PBD) представляет собой соединение, имеющее структуру пирролобензодиазепинового ядра. Пирролобензодиазепин может быть замещенным или незамещенным. «Пирролобензодиазепиновое» соединение также может включать соединение, имеющее два пирролобензодиазепиновых ядра, связанных линкером. Функциональность имина (-C=N-) в составе индолинобензодиазепинового ядра может быть снижена.

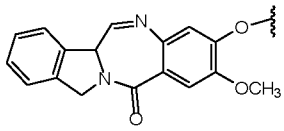
[00260] В некоторых вариантах осуществления пирролобензодиазепиновое соединение содержит структуру ядра, представленную  , которая необязательно может быть замещена.

[00261] В некоторых вариантах осуществления пирролобензодиазепиновые соединения содержат структуру ядра, представленную 4e3  , которая необязательно может быть замещена.

[00262] Используемое в данном документе «индолинобензодиазепиновое» (IGN) соединение представляет собой соединение, имеющее структуру индолинобензодиазепинового ядра. Индолинобензодиазепин может быть замещенным или незамещенным. «Индолинобензодиазепиновое» (IGN) соединение может также включать соединение, имеющее два индолинобензодиазепиновых ядра, связанных линкером. Функциональность имина (-C=N-) в составе индолинобензодиазепинового ядра

может быть снижена.

[00263] В некоторых вариантах осуществления индолинбензодиазепиновое соединение содержит структуру ядра, представленную  , которая может быть необязательно замещена.

[00264] В некоторых вариантах осуществления индолинбензодиазепиновое соединение содержит структуру ядра, представленную  , которая может быть дополнительно замещена.

[00265] Цитотоксический агент может быть связан или конъюгирован или непосредственно со связывающим EpCAM агентом (например, с антителом к EpCAM, или связывающим EpCAM фрагментом антитела, или активируемым антителом к EpCAM, описанными в данном документе), или косвенно, через линкер с использованием способов, известных в данной области техники, с образованием «иммуноконъюгата», «конъюгата», «ADC» или «AADC».

Линкерные молекулы

[00266] Любые подходящие линкеры, известные в данной области техники, можно использовать при получении описанных иммуноконъюгатов. В определенных вариантах осуществления линкеры представляют собой бифункциональные линкеры. Используемый в данном документе термин «бифункциональный линкер» относится к модифицирующим агентам, которые обладают двумя реакционноспособными группами; одна из которых способна реагировать с агентом, связывающим клетки, в то время как другая реагирует с цитотоксическим соединением, связывая два фрагмента вместе. Такие бифункциональные сшиватели хорошо известны в данной области техники (см., например, Isalm and Dent in Bioconjugation chapter 5, p218-363, Groves Dictionaries Inc. New York, 1999). Например, бифункциональные сшивающие агенты, которые обеспечивают связывание посредством тиоэфирной связи, включают N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбоксилат (SMCC) для введения малеимидных групп или с N-сукцинимидил-4- (йодоацетил)-аминобензоатом (SICBA) для введения йодацетильных групп. Другие бифункциональные агенты, вводящие малеимидо-группы или галогенацетные группы в связывающий клетки агент, хорошо известны в данной области техники (см., например, США 2008/0050310 и США 20050169933, доступный от Pierce Biotechnology Inc., P.O. Box 117, Rockland, IL 61105, USA) и включают, но не

ограничиваются ими, бис-малеимидополиэтиленгликоль (BMPEO), $BM(PEO)_2$, $BM(PEO)_3$, N-(β- малеимидопропилокси)сукцинимидный эфир (BMPS), N-сукцинимидиловый эфир γ-малеиминомасляной кислоты (GMBS), N-гидроксисукцинимидный эфир 6-малеимидокапроновой кислоты (EMCS), 5-малеимидовалериановую кислоту NHS, HBVS, N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)-циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат), который является «длинноцепочечным» аналогом SMCC (LC-SMCC), м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимидного эфира (MBS), гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)-бутировой кислоты или соли HCl (MPBH), N-сукцинимидил-3-(бромацетамидо)пропионат (SBAP), N-сукцинимидил-йодоацетат (SIA), N-сукцинимидиловый эфир к-малеиминидоундекановой кислоты (KMUA), N-сукцинимидил-4-(п-малеимидофенил)-бутират (SMPB), сукцинимидил-6-(β-малеимидопропионамидо)гексаноат (SMPH), сукцинимидил-(4-винилсульфонил)бензоат (SVSB), дитиобисмалеимидоэтан (DTME), 1,4-бис-малеимидобутан (BMB), 1,4-бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDB), бис-малеимидогексан (BMH), бис-малеимидоэтан (BMOE), сульфосукцинимидил 4-(N-малеимидо-метил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC), сульфосукцинимидил (4-йод-ацетил)аминобензоат (сульфо-SICBA), м-малеимидобензоил-N-гидроксисульфосукцинимидный эфир (сульфо-MBS), N-(γ-малеимидобутилокси) сульфосукцинимидный эфир (сульфо-GMBS), N-(ε-малеимидокапроилокси) сульфосукцинимидный эфир (сульфо-EMCS), N-(к-малеимидоундеканоилокси)сульфосукцинимидный эфир (сульфо-KMUS) и сульфосукцинимидил-4-(п-малеимидофенил) бутират (сульфо-SMPB).

[00267] Гетеробифункциональные сшивающие агенты представляют собой бифункциональные сшивающие агенты, имеющие две разные реакционноспособные группы. Гетеробифункциональные сшивающие агенты, содержащие как реакционноспособную по аминогруппе N-гидроксисукцинимидную группу (группу NHS), так и реакционноспособную по карбонилу гидразиновую группу, также можно использовать для связывания описанных в данном документе цитотоксических соединений со связывающим клетки агентом (например, антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM). Примеры таких коммерчески доступных гетеробифункциональных сшивающих агентов включают сукцинимидил 6-гидразиноникотинамид ацетон гидразон (SANH), сукцинимидил 4-гидразидотерефталат гидрохлорид (SHTH) и сукцинимидил гидразиния никотинат гидрохлорид (SHNH). Конъюгаты, несущие кислотолабильную связь, также могут быть получены с использованием гидразинсодержащего производного бензодиазепина по настоящему изобретению. Примеры бифункциональных сшивающих

агентов, которые можно использовать, включают сукцинимидил-п-формилбензоат (SFB) и сукцинимидил-п-формилфеноксиацетат (SFPA).

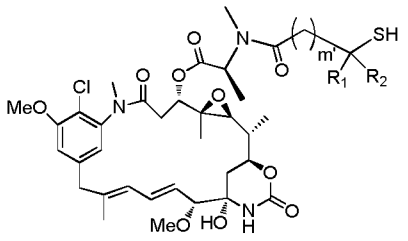
[00268] Бифункциональные сшивающие агенты, которые обеспечивают связывание связывающего клетки агента с цитотоксическими соединениями посредством дисульфидных связей, известны в данной области техники и включают N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)пентаноат (SPP), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат (SPDB), N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)2-сульфобутаноат (сульфо-SPDB) для введения дитиопиридильных групп. Другие бифункциональные сшивающие агенты, которые можно использовать для введения дисульфидных групп, известны в данной области техники и описаны в патентах США 6913748, 6716821 и US 20090274713 и 20100129314, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В качестве альтернативы также можно использовать сшивающие агенты, такие как 2-иминотиолан, гомоцистеин-тиолактон или S-ацетилсукциновый ангидрид, которые вводят тиоловые группы.

[00269] В определенных вариантах осуществления бифункциональные линкеры представлены любой из формул (a1L) - (a10L), описанной ниже.

Цитотоксические агенты

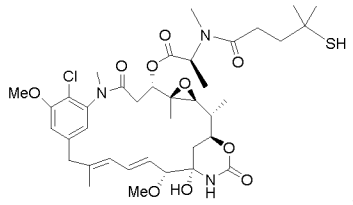
А. Майтанзиноид

[00270] В определенных вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой соединение майтанзиноид, например, описанное в патентах США №№ 5208020 и 7276497, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки. В некоторых вариантах осуществления соединение майтанзиноид представлено следующей формулой:

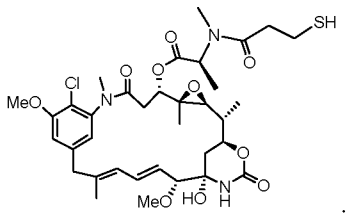


при этом переменные являются такими, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 13-го по 15-й первого варианта осуществления, приведенного выше, и в любых более конкретных вариантах осуществления, описанных в нем.

[00271] В более конкретном варианте осуществления соединение майтанзиноид представляет собой DM4:



[00272] В еще одном варианте осуществления соединение майтанзиноид представляет собой DM1:



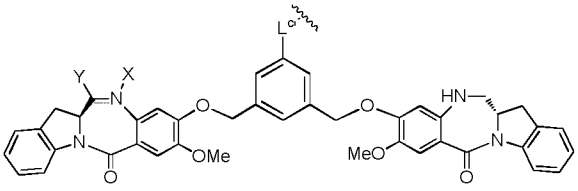
B. Бензодиазепин

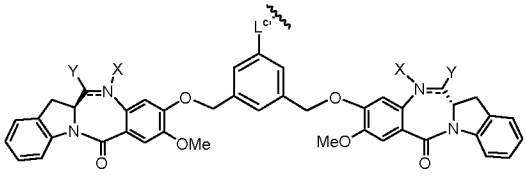
[00273] В определенных вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой бензодиазепиновое соединение, такое как пирролобензодиазепин (PBD) (такие как соединения, описанные в WO 2010/043880, WO 2011/130616, WO 2009/016516, WO 2013/177481 и WO 2012/112708) и индолинобензодиазепиновые соединения (IGN) (такие как соединения, описанные в WO 2010/091150 и WO 2012/128868 и US20170014522. Все идеи каждого из этих патентов, патентных публикаций и заявок полностью включены в данный документ посредством ссылки.

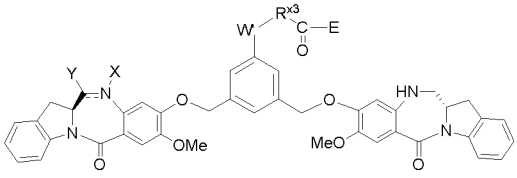
[00274] Используемый в данном документе термин «бензодиазепиновое» соединение представляет собой соединение, имеющее структуру бензодиазепинового ядра. Бензодиазепиновое ядро может быть замещенным или незамещенным и/или конденсированным с одной или более кольцевыми структурами. Он также включает соединение, имеющее два бензодиазепиновых ядра, связанных линкером. Функциональность имина (-C=N-) в составе бензодиазепинового ядра может быть снижена.

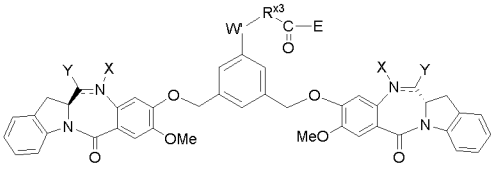
[00275] Используемый в данном документе термин «пирролобензодиазепиновое» (PBD) соединение представляет собой соединение, имеющее структуру пирролобензодиазепинового ядра. Пирролобензодиазепин может быть замещенным или незамещенным. Он также включает соединение, имеющее два пирролобензодиазепиновых ядра, связанных линкером. Функциональность имина (-C=N-) в составе индолинобензодиазепинового ядра может быть снижена.

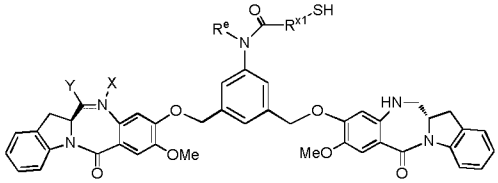
[00276] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой индолинобензодиазепиновое соединение, представленное следующей формулой:

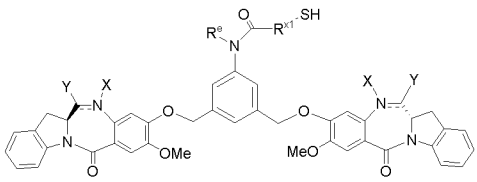

(L1a'),

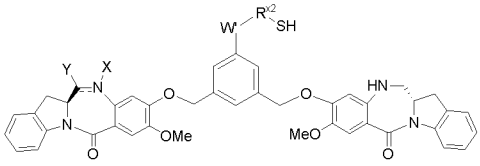

(L1a'1),

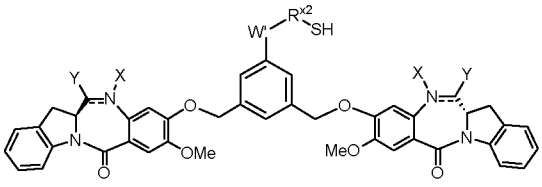

(L1b'),


(L1b'1),


(L2a');


(L2a'1);


(L2b'); или


(L2b'1),

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

$L^{c'}$ представлен следующей формулой:

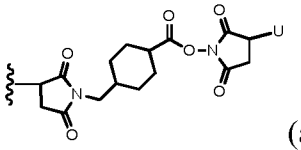
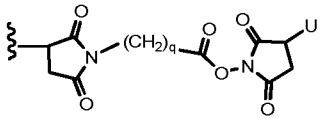
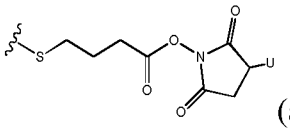
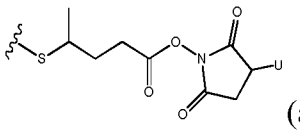
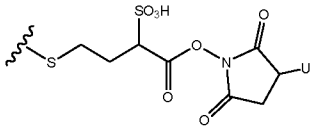
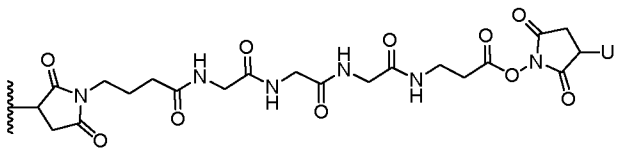
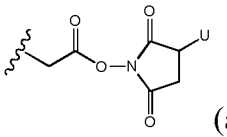
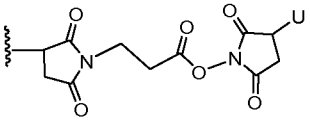
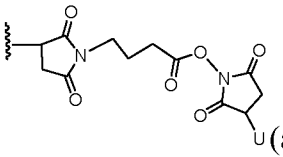
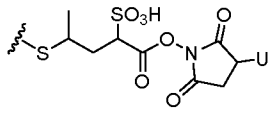
$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)E$ (B1); или

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^s$ (B2)

C(=O)E представляет собой реакционноспособную сложноэфирную группу, такую как N-гидроксисукцинимидный эфир, N-гидроксисульфосукцинимидный эфир,

нитрофениловый (например, 2- или 4-нитрофениловый) эфир, динитрофениловый (например, 2,4-динитрофениловый) эфир, сульфо-тетрафторфениловый (например, 4-сульфо-2,3,5,6-тетрафторфениловый) эфир или пентафторфениловый эфир, предпочтительно N-гидроксисукцинимида;

Z^s представлен следующей формулой:


(a1);

(a2);

(a3);

(a4);

(a5),

(a6),

(a7);

(a8);

(a9); и

(a10),

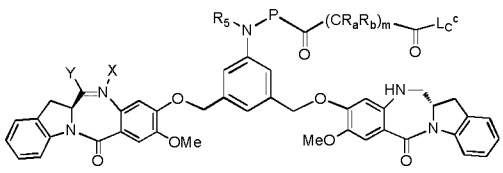
где:

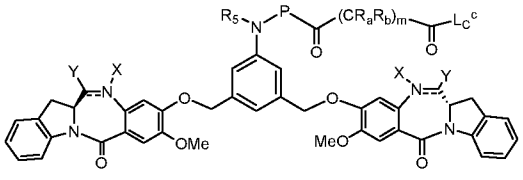
q равен целому числу от 1 до 5; и

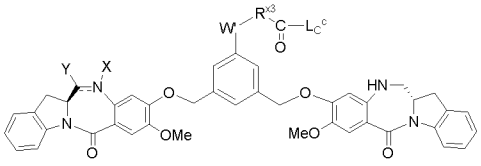
U представляет собой –H или SO_3H, или его фармацевтически приемлемую соль; и

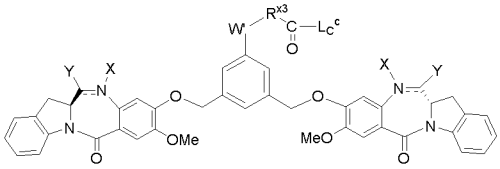
остальные переменные такие, как описано в любом из конкретных вариантов осуществления с 1-го по 12-й и 17-й первого варианта осуществления, описанного выше, или любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем.

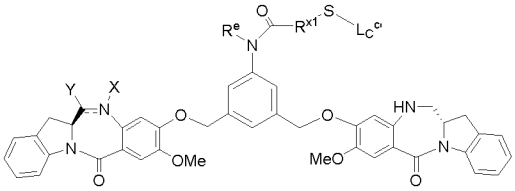
[00277] В некоторых вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой индолинобензодиазепиновое соединение, представленное следующей формулой:

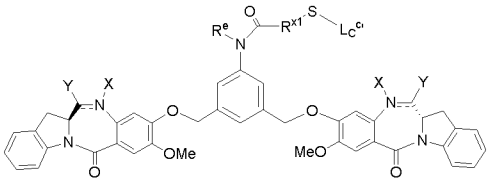

(C1a');

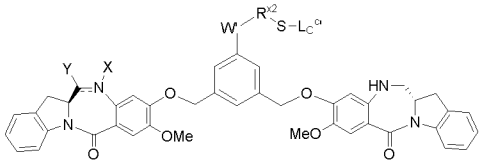

(C1a'1)

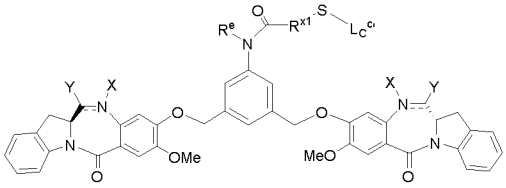

(C1b'),


(C1b'1),


(C2a"),

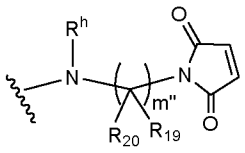

(C2a"1),


(C2b"), или


(C2b"1)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

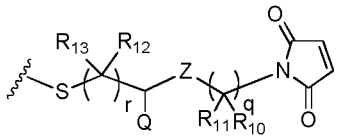
$-L_C^c$ для формул (C1a'), (C1a'1), (C1b') и (C1b'1) представлен следующей формулой:

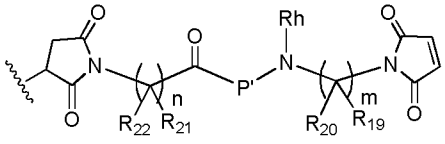


при этом переменные являются такими, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 1-го по 9-й и 23-й, второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем; и

$Lc^{c'}$ для формул (C2a"), (C2a"1), (C2b") и (C2b"1) представлен следующей

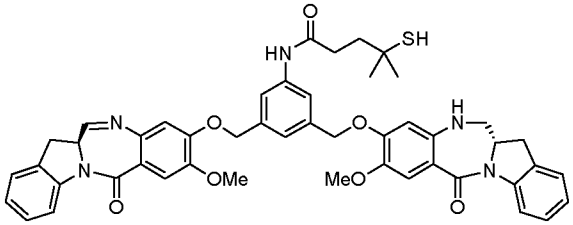
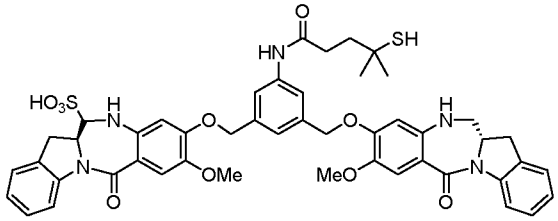
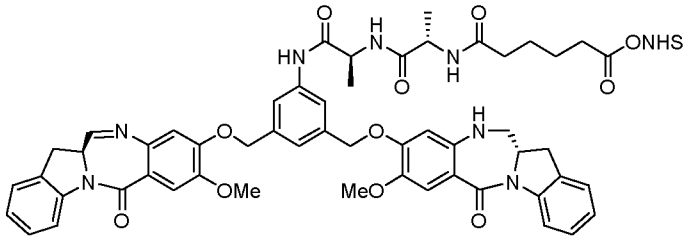
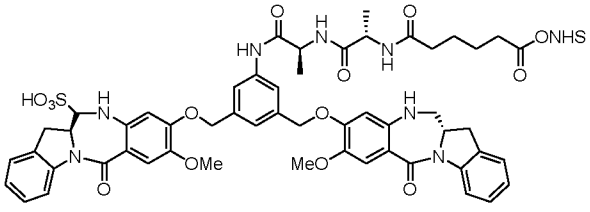
формулой:

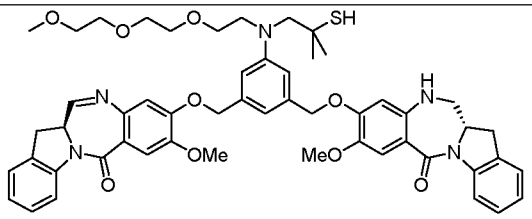
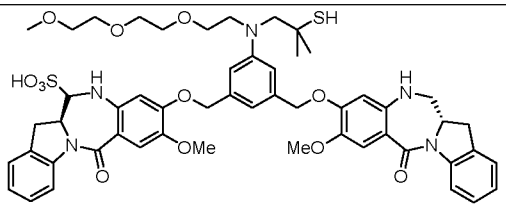
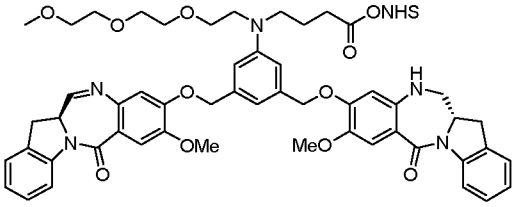
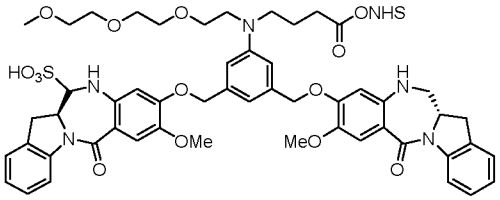
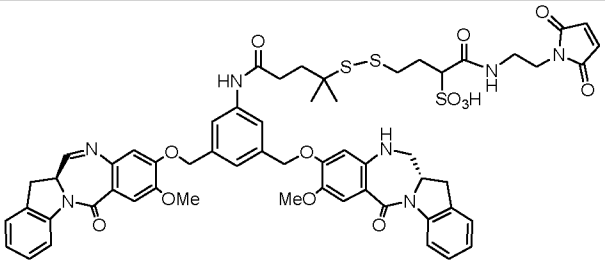
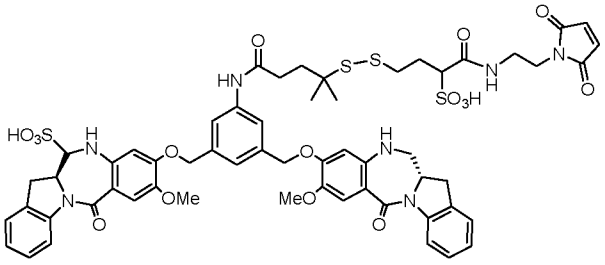
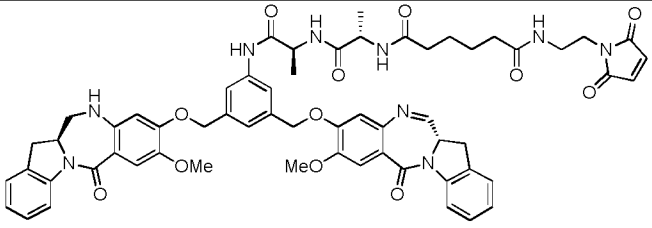

; или

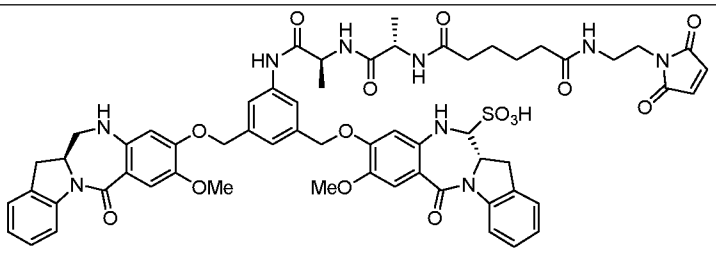
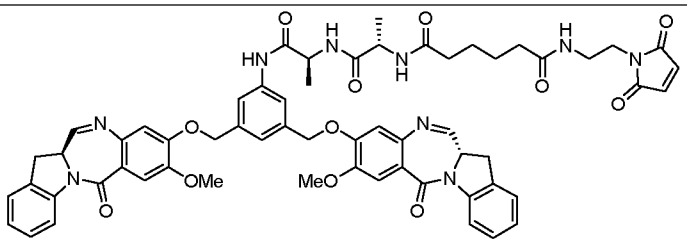
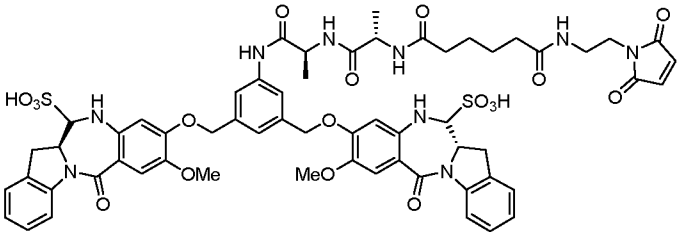
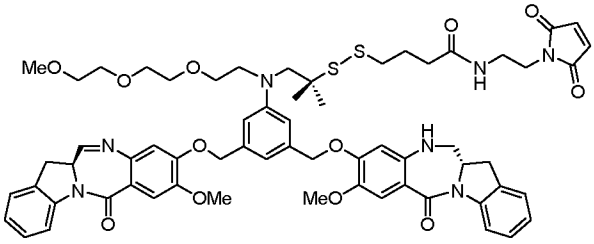
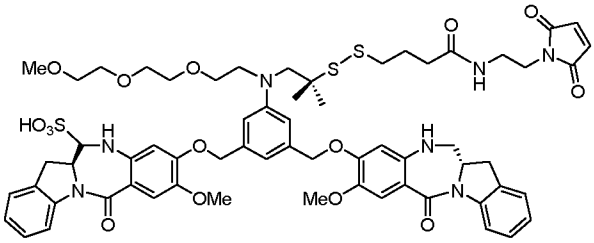
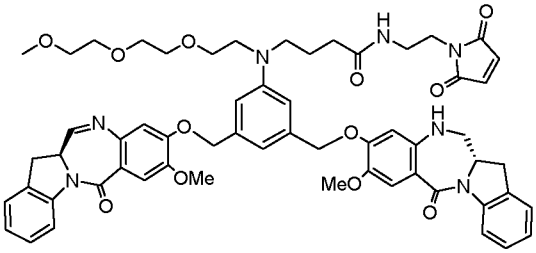
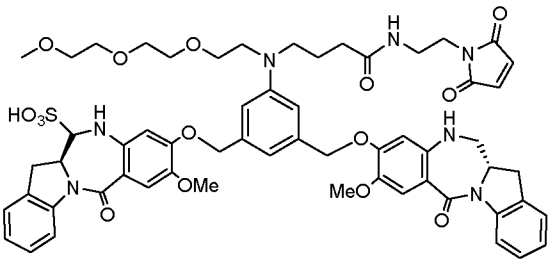

;

при этом переменные такие, как описано выше в любом из 10-16 и 23-го конкретных вариантов осуществления второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем.

[00278] В определенных вариантах осуществления цитотоксический агент представляет собой индолинобензодиазепиновое соединение любого из следующих компонентов или его фармацевтически приемлемую соль:

Соединение №	Структура
D1	
sD1	
D2	
sD2	

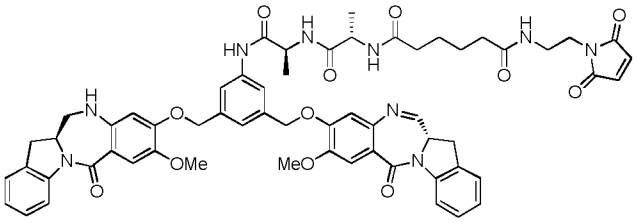
Соединение №	Структура
DGN462	
sDGN462	
D3	
sD3	
D4	
sD4	
D5	

Соединение №	Структура
sD5	
D5’	
sD5’	
D6	
sD6	
D7	
sD7	

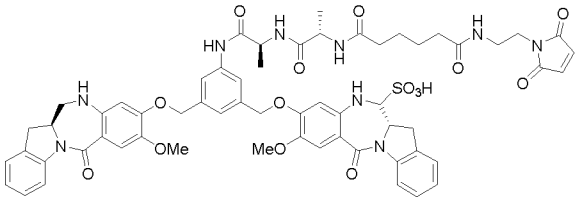
[00279] Соединения D1, sD1, D2, sD2, DGN462, sDGN462, D3 и sD3, показанные выше, могут быть получены в соответствии с процедурами, известными в данной области техники, например, как описано в патентах США №№ 9381256, 8765740, 8426402 и 9353127, а также US 2016/0082114, содержание каждого из которых полностью включено в данный документ посредством ссылки.

[00280] В определенных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль соединений, показанных выше (например, sD1, sD2, sD4, sDGN462, sD3, sD4, sD5, sD5', sD6 или sD7) представляет собой натриевую или калиевую соль. В конкретных вариантах осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую соль.

[00281] В конкретном варианте осуществления цитотоксический агент представлен следующей формулой:

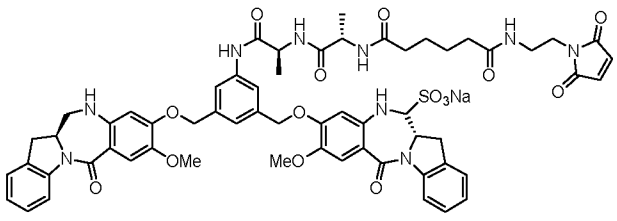


; или



или его фармацевтически приемлемая соль. В конкретном варианте осуществления фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую или калиевую соль.

[00282] В еще одном конкретном варианте цитотоксический агент представлен следующей формулой:



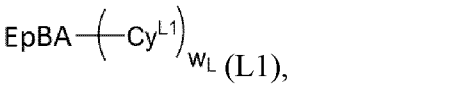
.

Примеры иммуноконъюгатов

[00283] В первом варианте осуществления иммуноконъюгат содержит связывающий EpCAM агент (EpBA, например, антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, описанные в данном документе), ковалентно связанный с цитотоксическим агентом, описанным в данном

документе, через ε-аминогруппу одного или более остатков лизина, расположенных на EpBA.

[00284] В 1-м конкретном варианте осуществления первого варианта иммуноконъюгат представлен следующей формулой:



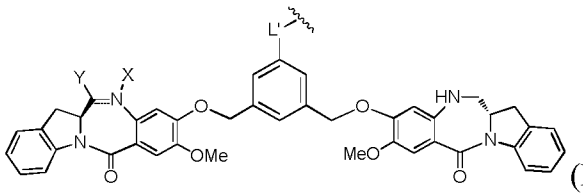
(L1),

при этом:

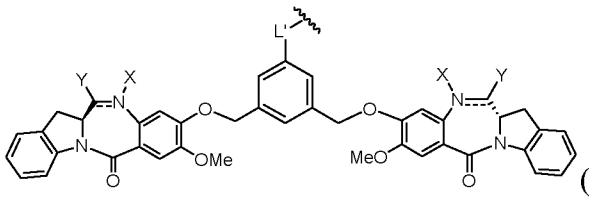
EpBA (например, антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, описанные в данном документе), который ковалентно связан с Cy^{L1} через остаток лизина;

W_L равен целому числу от 1 до 20; и

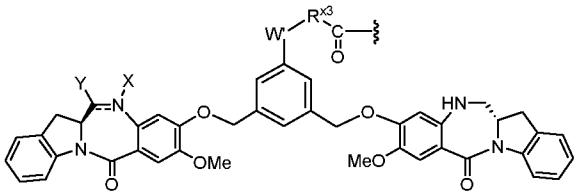
Cy^{L1} представляет собой цитотоксическое соединение, представленное следующей формулой:



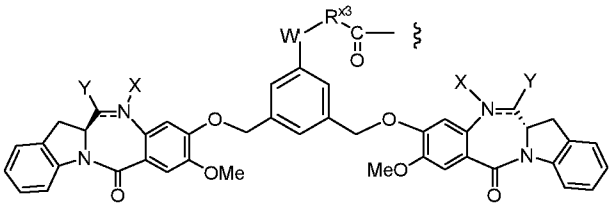
(L1a),



(L1a1),



(L1b), или



(L1b1);

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что когда она представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H, или (C_1-C_4)алкил; и когда она представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H или защитный фрагмент на амин, и Y представляет собой -OH или -SO_3H, или его фармацевтически приемлемая соль;

W’ представляет собой -$NR^{e'}$,

$R^{e'}$ представляет собой -$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n равен целому числу от 2 до 6;

R^k представляет собой -H или -Me;

R^{x3} представляет собой (C_1-C_6)алкил;

L’ представлен следующей формулой:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1’); или

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-$ (B2’);

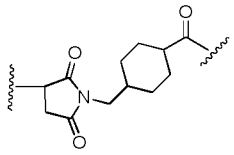
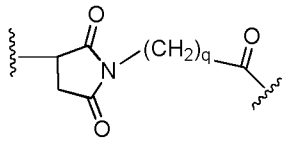
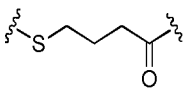
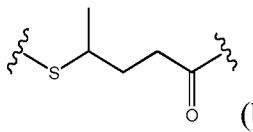
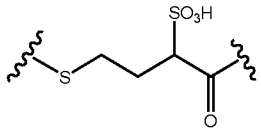
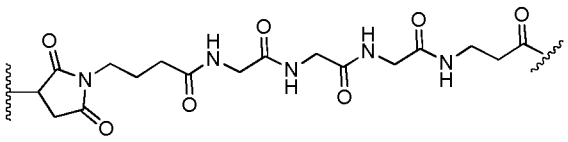
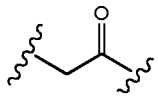
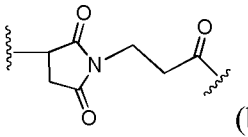
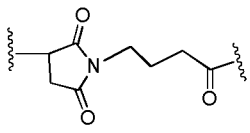
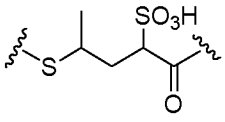
R_5 представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил;

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

каждый из R_a и R_b, в каждом случае независимо, представляет собой -H, (C_1-C_3)алкил или заряженный заместитель или ионизируемую группу Q;

m равен целому числу от 1 до 6; и

Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:


(b1);

(b2);

(b3);

(b4);

(b5),

(b6),

(b7);

(b8);

(b9); и

(b10),

где q равен целому числу от 1 до 5.

[00285] Во 2-м конкретном варианте осуществления для конъюгатов формулы (L1), Cy^{L1} представлен формулой (L1a) или (L1a1); а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м конкретном варианте осуществления.

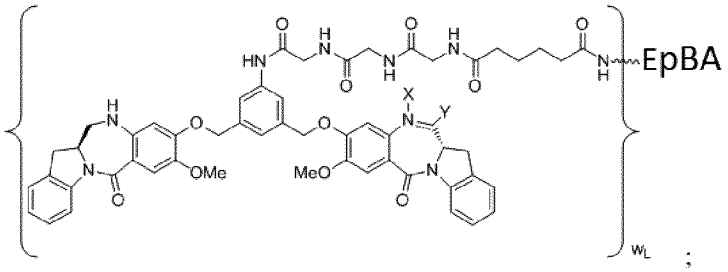
[00286] В 3-м конкретном варианте осуществления для конъюгатов формулы (L1), Cy^{L1} представлен формулой (L1b) или (L1b1); а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м конкретном варианте осуществления. В частности, R^{x3} представляет собой (C_2-C_4)алкил.

[00287] В 4-м конкретном варианте осуществления для конъюгатов формулы (L1), Cy^{L1} представлен формулой (L1a); оба из R_a и R_b представляют собой H; R_5 представляет собой H или Me, а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м конкретном варианте осуществления.

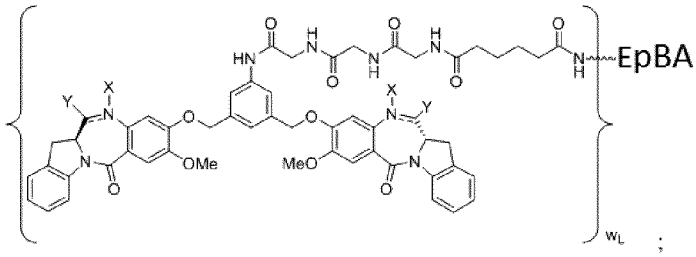
[00288] В 5-м конкретном варианте осуществления P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков; а остальные переменные описаны выше в 1-м, 2-м или 4-м конкретном варианте осуществления. В более конкретном варианте осуществления P выбран из: Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 215), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 216), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 217), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe и Gln-Ala. Более конкретно, P представляет собой Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, или D-Ala-D-Ala.

[00289] В 6-м конкретном варианте осуществления Q представляет собой –SO3H, или его фармацевтически приемлемая соль; а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м, 2-м, 4-м или 5-м конкретном варианте осуществления или в любом другом варианте осуществления, описанном в нем.

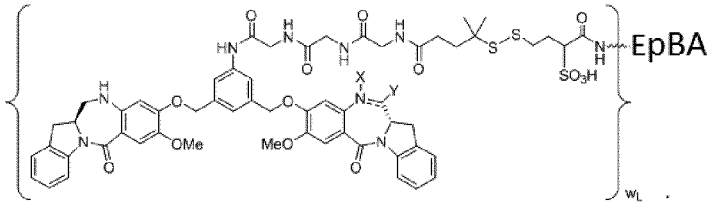
[00290] В 7-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат первого варианта осуществления представлен следующей формулой:



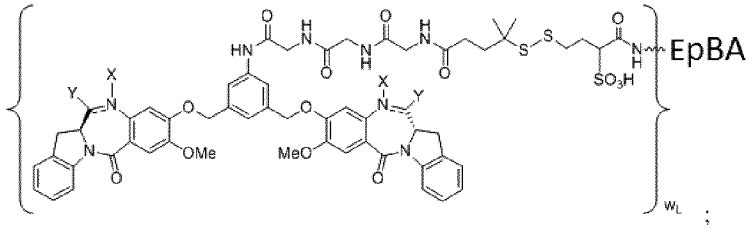
;


EpBA
OMe
MeO
w_L

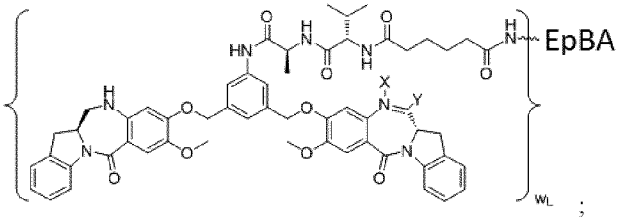
;


EpBA
SO_3H
OMe
MeO
w_L

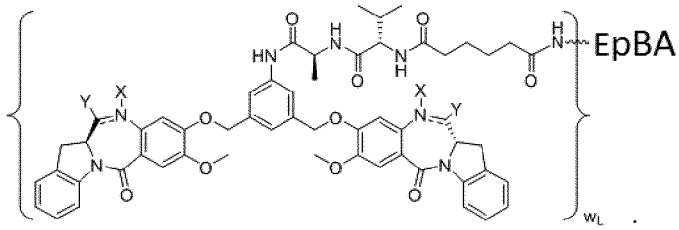
;


EpBA
SO_3H
OMe
MeO
w_L

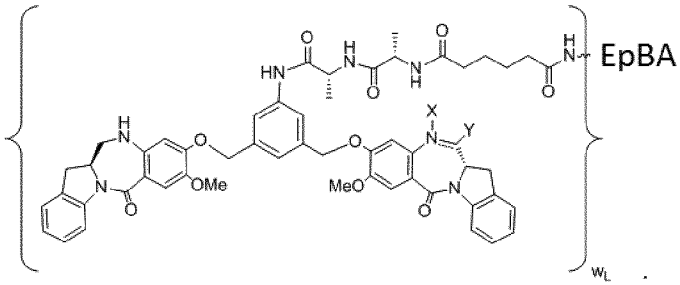
;


EpBA
w_L

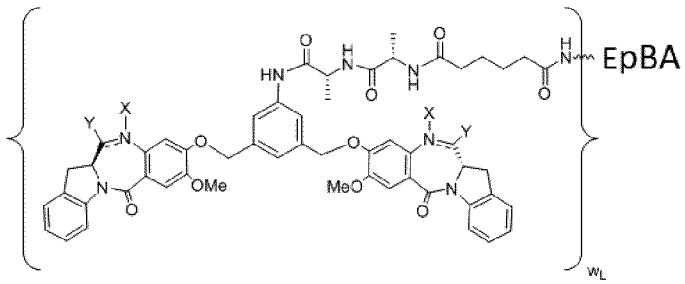
;

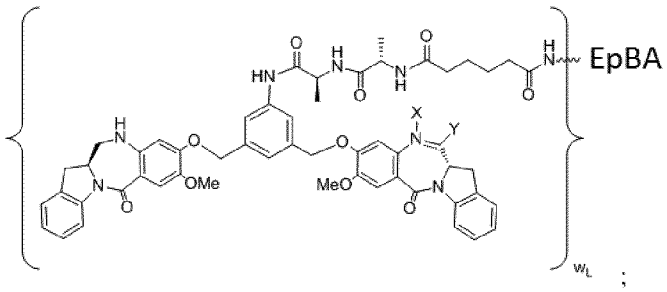

EpBA
w_L

;

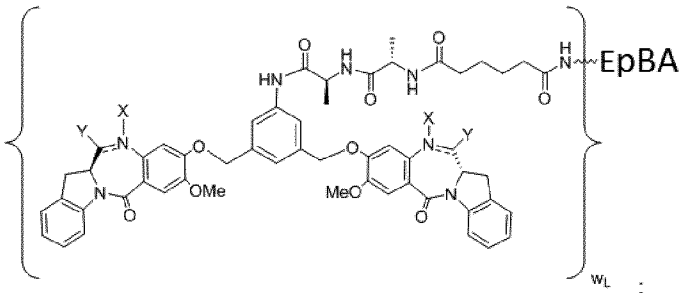

EpBA
OMe
MeO
w_L

;

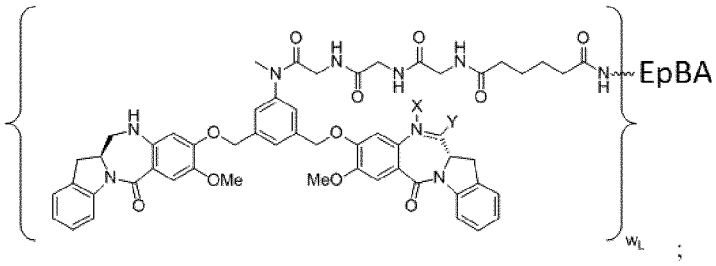

EpBA
OMe
MeO
X
Y
w_L


EpBA
OMe
MeO
X
Y
w_L

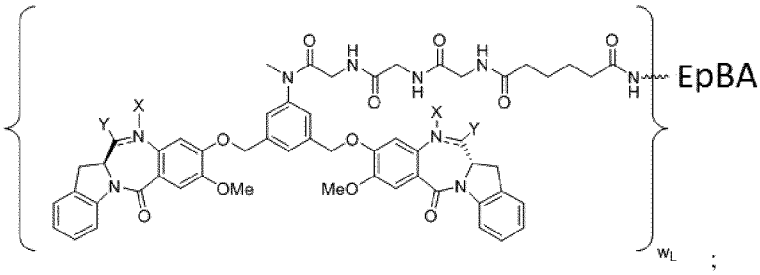
;


EpBA
OMe
MeO
X
Y
w_L

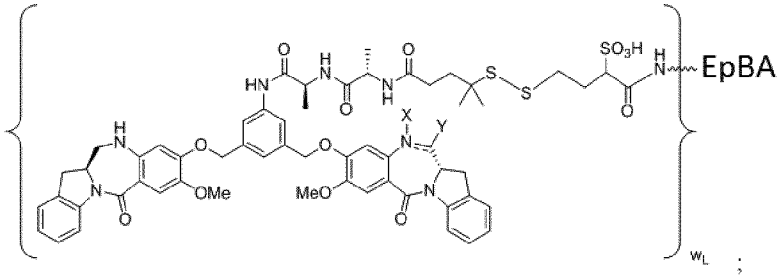
;


EpBA
OMe
MeO
X
Y
w_L

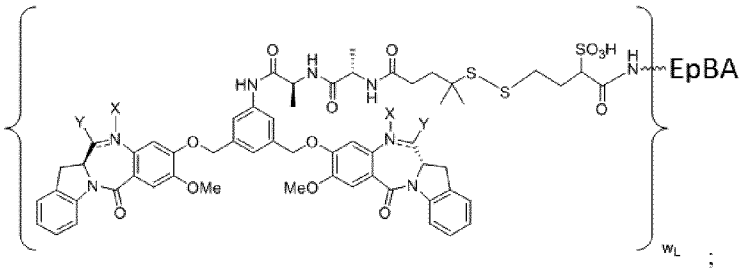
;


EpBA
OMe
MeO
X
Y
w_L

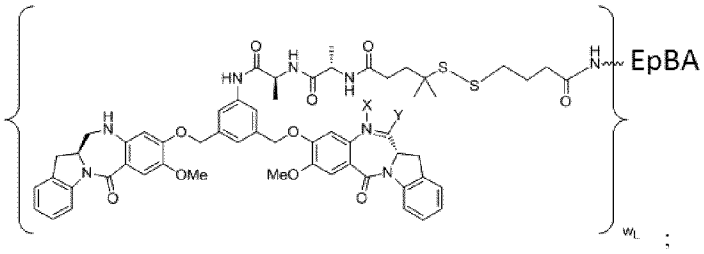
;


EpBA
SO_3H
S
S
OMe
MeO
X
Y
w_L

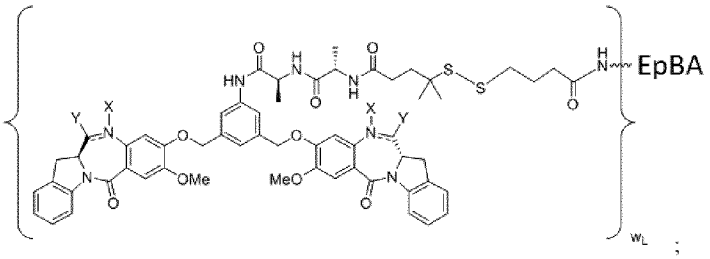
;


EpBA
w_L

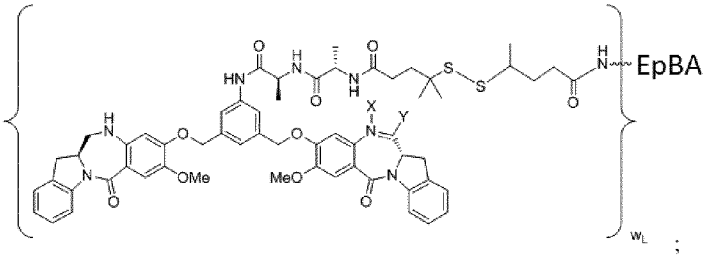
;


EpBA
w_L

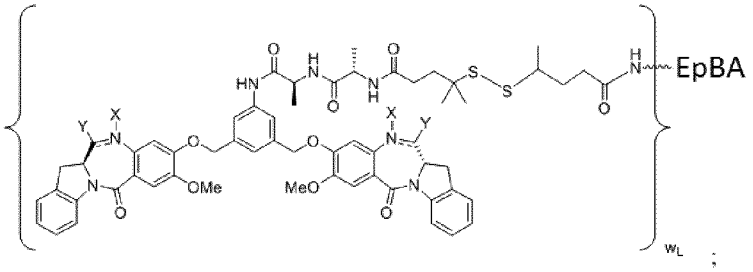
;


EpBA
w_L

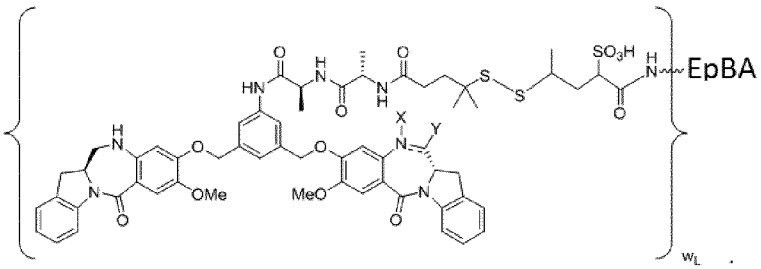
;


EpBA
w_L

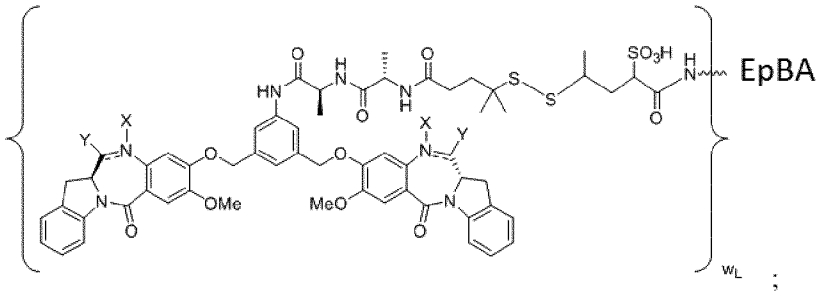
;


EpBA
w_L

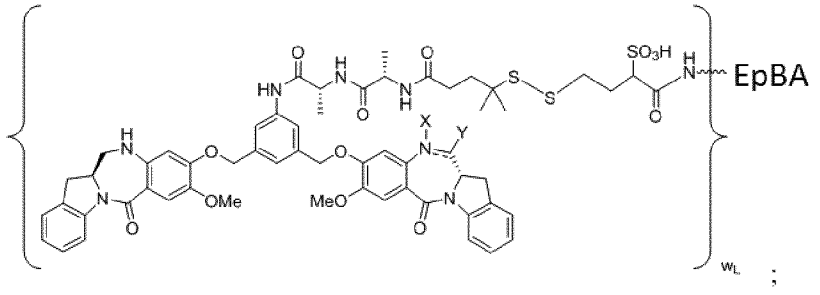
;


EpBA
w_L

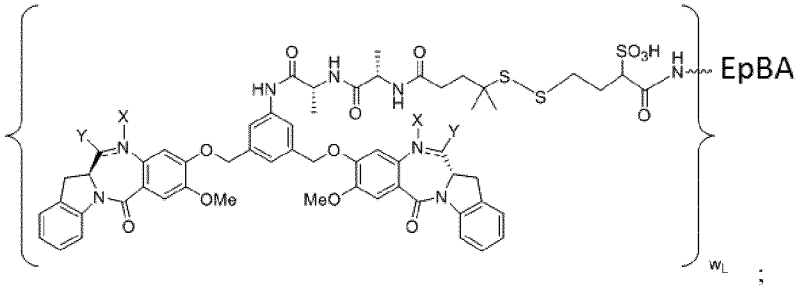
;


EpBA
w_L

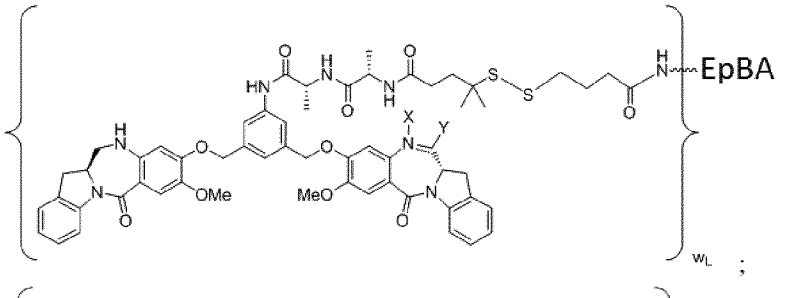
;


EpBA
w_L

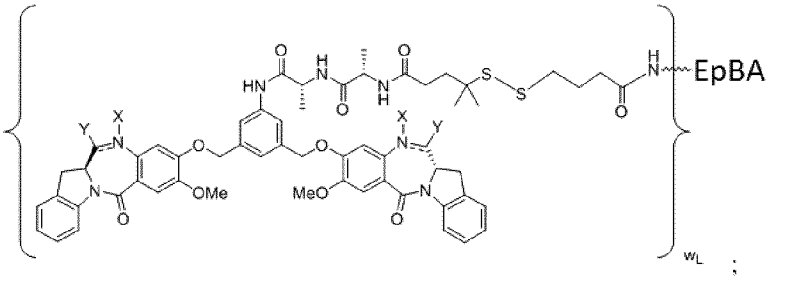
;


EpBA
w_L

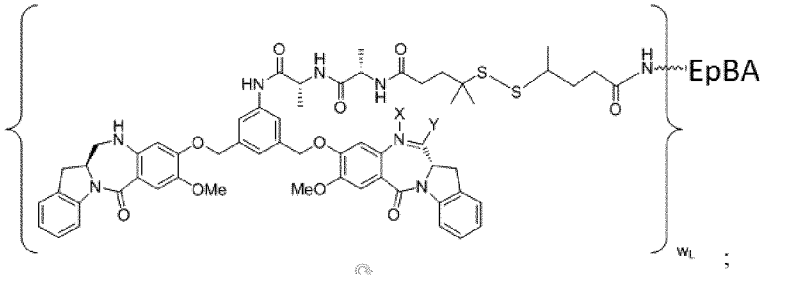
;


EpBA
w_L

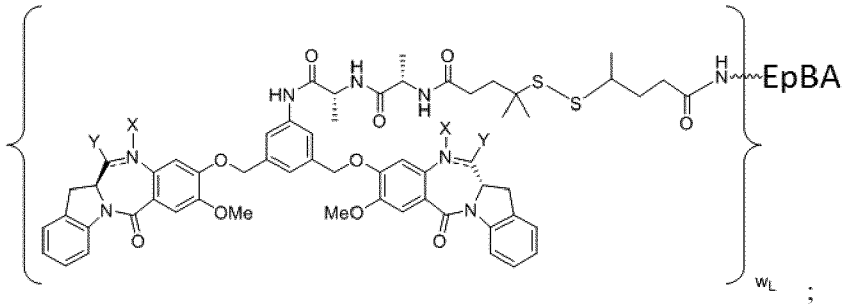
;


EpBA
w_L

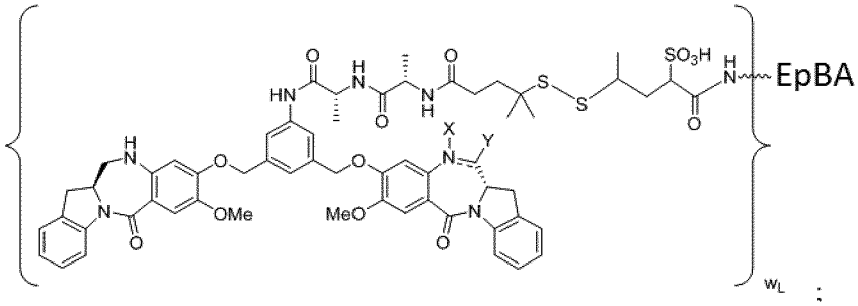
;


EpBA
w_L

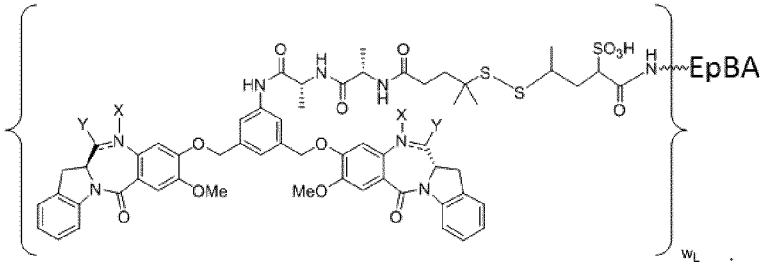
;


EpBA
w_L

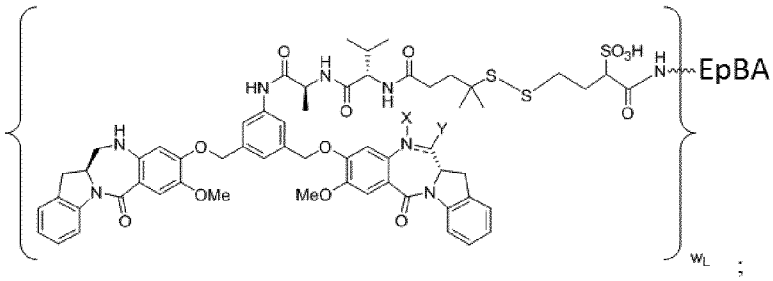
;


EpBA
w_L

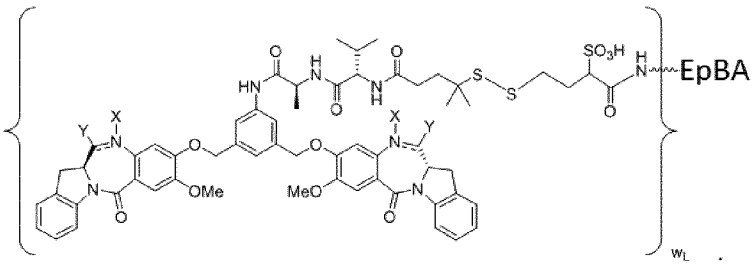
;


EpBA
w_L

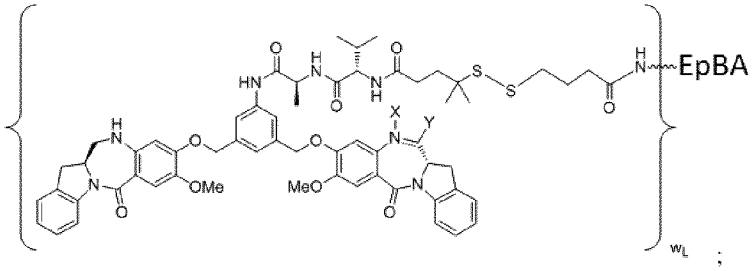
;


EpBA
w_L

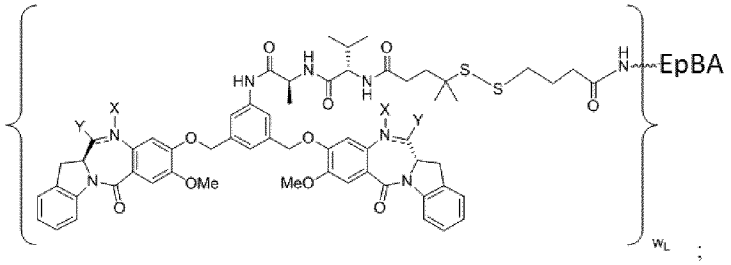
;


EpBA
w_L

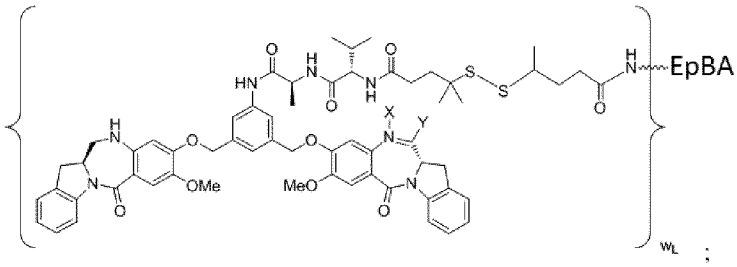
;


EpBA
w_L

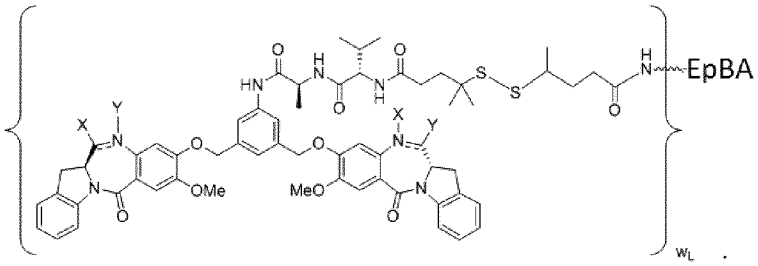
;



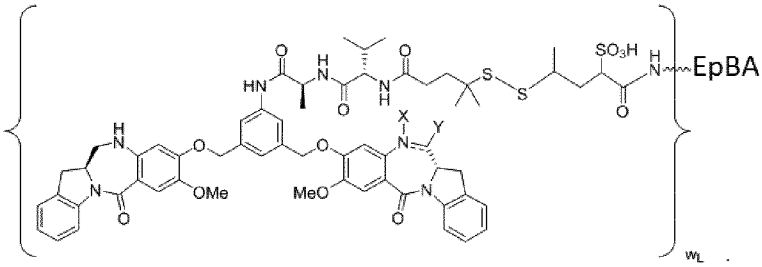
;



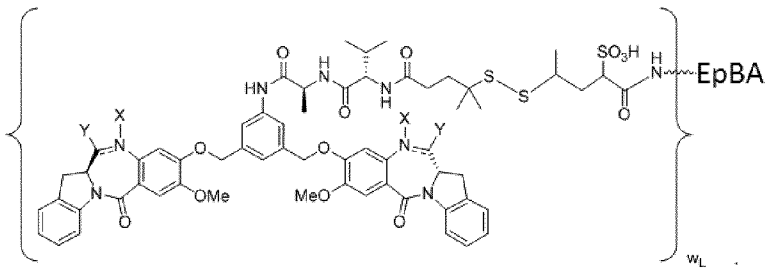
;



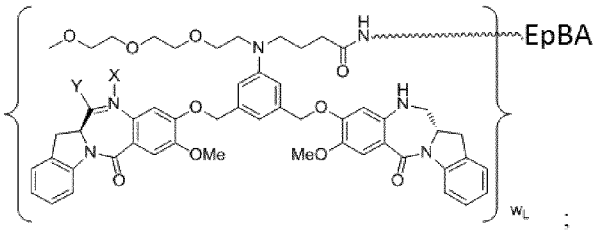
;



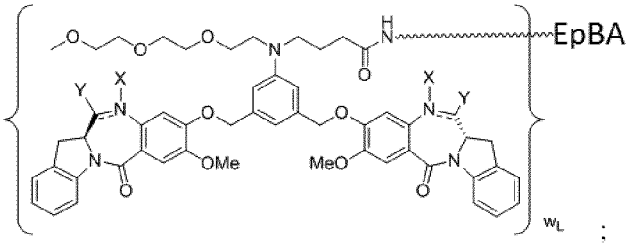
;



;



; или



;

или его фармацевтически приемлемая соль, где W_L равно целому числу от 1 до 10; двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что когда она представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой -H; и когда она представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой -OH или $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль. В более конкретном варианте осуществления двойная линия == между N и C представляет собой двойную связь, X отсутствует, а Y представляет собой -H. В другом более конкретном варианте осуществления двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь, X представляет собой –H, а Y представляет собой $–SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль.

[00291] В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления содержит VH-CDR1, содержащую $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5); VH-CDR2, содержащую $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7); и VH-CDR3, содержащую $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран из D и E, X_3 выбран из P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления содержит VL-CDR1, содержащую $RSSX_4SLLHSX_{10}G\ X_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10); VL-CDR2 легкой цепи, содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и VL-CDR3, содержащую $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L, и Q, X_3 выбран из S, G, Y, и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11).

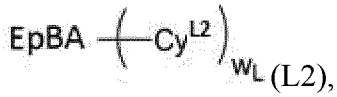
[00292] В некоторых вариантах осуществления VH-CDR1 EpBA содержит последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I и W (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления VH-CDR3 EpBA содержит последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления VL-CDR3 EpBA содержит последовательность $AQX_3LELPNT$, где X_3

выбран из S, G, Y и N (SEQ ID NO: 12).

[00293] В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2, и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

[00294] В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее MM с SEQ ID NO: 155. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления дополнительно включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее CM с SEQ ID NO: 168. В альтернативных вариантах осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее CM с SEQ ID NO: 169. В одном варианте осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 174. В одном варианте осуществления EpBA по 1-7 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 179.

[00295] В 8-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту осуществления представлены следующей формулой:



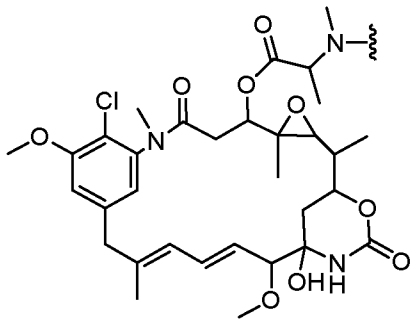
(L2),

при этом:

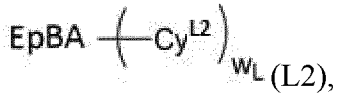
EpBA представляет собой связывающий EpCAM агент (например, антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM), описанный в данном документе, который ковалентно связан с Cy^{L2} через остаток Lys;

W_L равен целому числу от 1 до 20; и

Cy^{L2} представлен следующей формулой:



[00296] В 9-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту осуществления представлены следующей формулой:



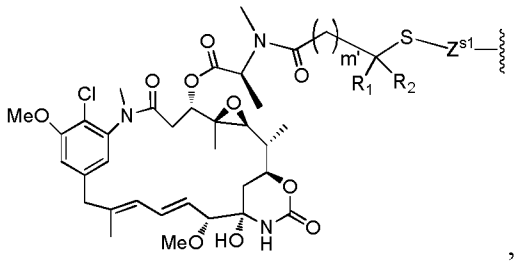
(L2),

при этом:

EpBA представляет собой связывающий EpCAM агент (например, антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM), описанный в данном документе, который ковалентно связан с Cy^{L2} через остаток Lys;

W_L равен целому числу от 1 до 20;

Cy^{L2} представлен следующей формулой:

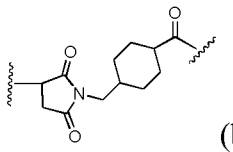


,

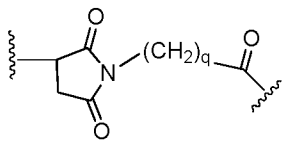
m' равен 1 или 2;

Каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой H или (C_1-C_3)алкил; и

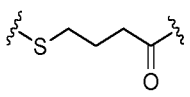
Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:



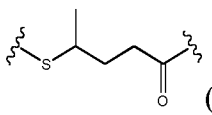
(b1);



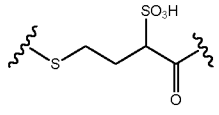
(b2);



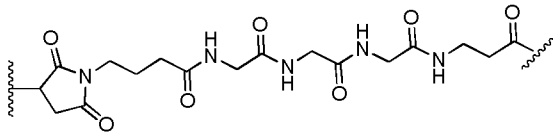
(b3);



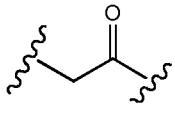
(b4);



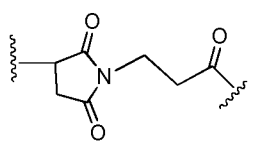
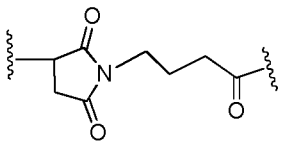
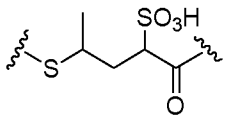
(b5),



(b6),



(b7);

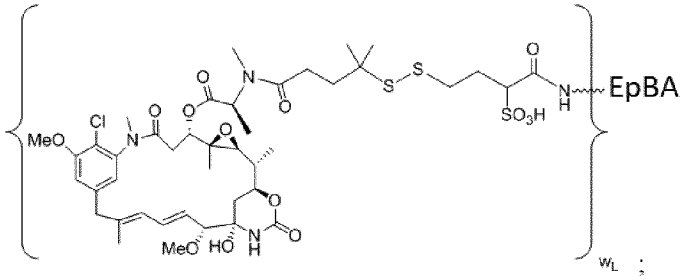

(b8);

(b9), и

(b10),

где q равен целому числу от 1 до 5.

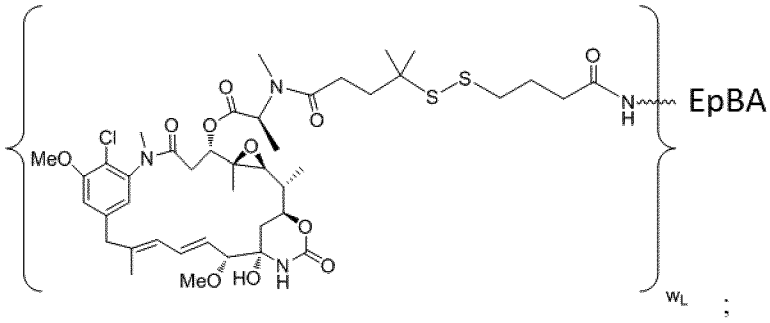
[00297] В 10-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгатов формулы (L2) m' равен 1, и оба из R_1 и R_2 представляют собой H; а остальные переменные такие, как описано выше в 13-м конкретном варианте осуществления.

[00298] В 11-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгатов формулы (L2) m' равен 2, и оба из R_1 и R_2 представляют собой Me; а остальные переменные такие, как описано выше в 13-м конкретном варианте осуществления.

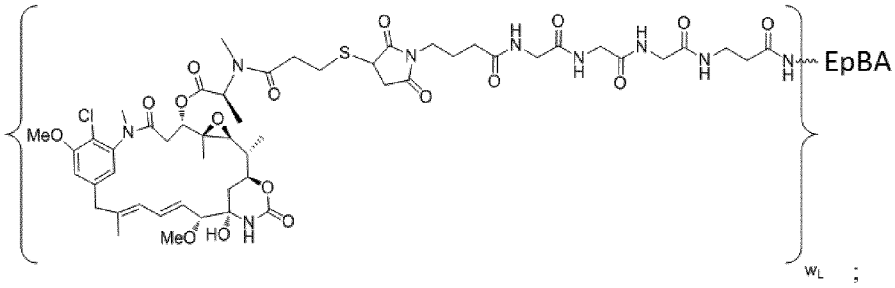
[00299] В 12-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту осуществления представлены следующей формулой.



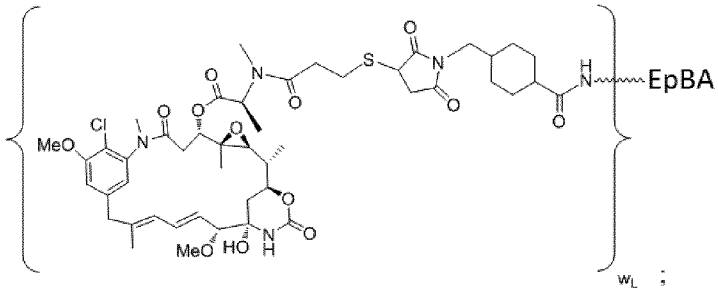
;



;



; или



;

или его фармацевтически приемлемая соль, где W_L равен целому числу от 1 до 10.

[00300] В 12-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгатов по первому варианту осуществления Y представляет собой -SO_3H, –SO_3Na или –SO_3K; а остальные переменные такие, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 1-го по 16-й или в любых более конкретных вариантах осуществления, описанных в них. В одном варианте осуществления Y представляет собой –SO3Na.

[00301] В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 по конкретным вариантам осуществления содержит VH-CDR1, содержащую $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5); VH-CDR2, содержащую $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7); и VH-CDR3, содержащую $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран из D и E, X_3 выбран из P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления содержит CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10); VL-CDR2 легкой цепи, содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и VL-CDR3, содержащую $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L, и Q, X_3 выбран из S, G, Y, и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11).

[00302] В некоторых вариантах осуществления VH-CDR1 EpBA содержит последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I и W (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления VH-CDR3 EpBA содержит последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления VL-CDR3 EpBA содержит последовательность $AQX_3LELPNT$, где X_3 выбран из S, G, Y и N (SEQ ID NO: 12).

[00303] В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2, и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH,

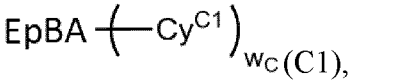
имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

[00304] В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее MM с SEQ ID NO: 155. В некоторых вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления дополнительно включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее CM с SEQ ID NO: 168. В альтернативных вариантах осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее CM с SEQ ID NO: 169. В одном варианте осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 174. В одном варианте осуществления EpBA по 8-12 конкретным вариантам осуществления включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 179.

[00305] В определенных вариантах осуществления для композиций (например, фармацевтических композиций), содержащих иммуноконъюгаты по первому варианту осуществления или по 1-му, 2-му, 3-му, 4-му, 5-му, 6-му, 7-му, 8-му, 9-му, 10-му, 11-му или 12-му конкретному варианту осуществления, среднее количество цитотоксического агента на молекулу антитела (т.е. среднее значение wL), также известное как отношение лекарственного средства к антителу (DAR) в композиции, находится в диапазоне от 1,0 до 8,0. В некоторых вариантах осуществления DAR находится в диапазоне от 1,0 до 5,0, от 1,0 до 4,0, от 1,0 до 3,4, от 1,0 до 3,0, от 1,5 до 2,5, от 2,0 до 2,5 или от 1,8 до 2,2. В некоторых вариантах осуществления DAR составляет менее 4,0, менее 3,8, менее 3,6, менее 3,5, менее 3,0 или менее 2,5.

[00306] Во втором варианте осуществления иммуноконъюгаты содержат EpBA, ковалентно связанный с цитотоксическим агентом, описанным в данном документе, через тиоловую группу (-SH) одного или более остатков цистеина, расположенных на EpBA.

[00307] В 1-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат по второму варианту осуществления представлен следующей формулой:



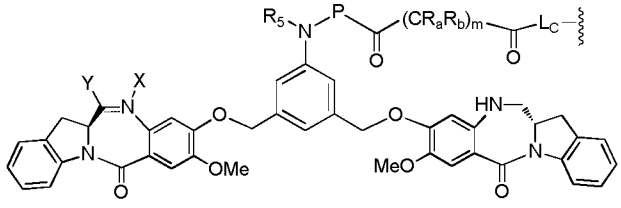
(C1),

при этом:

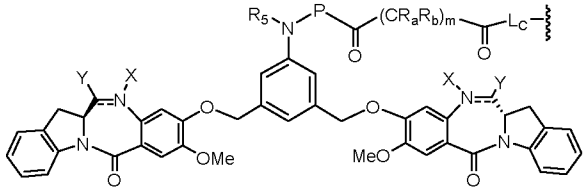
EpBA представляет собой антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, описанные в данном документе, ковалентно связанные с Cy^{C1} через остаток цистеина;

W_C равен 1 или 2;

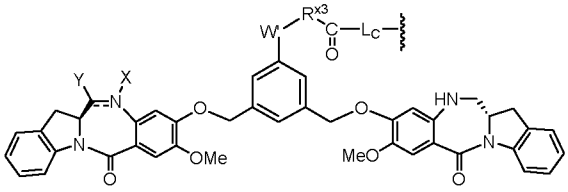
Cy^{C1} представлен следующей формулой:



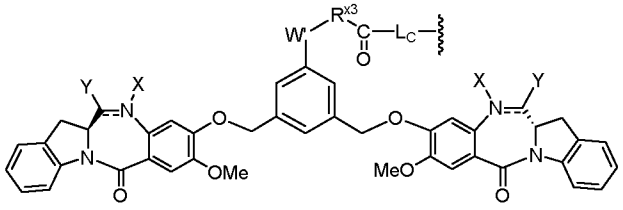
(C1a);



(C1a1);



(C1b), или



(C1b1)

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что когда она представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H, или (C_1-C_4)алкил; и когда она представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H или защитный фрагмент на амин, Y представляет собой -OH или $-SO_3H$;

R_5 представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил;

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

R_a и R_b в каждом случае независимо представляет собой -H, (C_1-C_3)алкил или заряженный заместитель, или ионизируемую группу Q;

m равно целому числу от 1 до 6;

W' представляет собой -$NR^{e'}$,

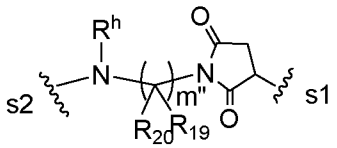
$R^{e'}$ представляет собой -$(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n равен целому числу от 2 до 6;

R^k представляет собой -H или -Me;

R^{x3} представляет собой (C_1-C_6)алкил; и

L_C представлен:



,

где s1 представляет собой сайт, ковалентно связанный с EpBA, и s2 представляет собой сайт, ковалентно связанный с группой -C(=O)- на Cy^{C1}; где:

R_{19} и R_{20}, в каждом случае независимо представляют собой -H или (C_1-C_3)алкил;

m" равен целому числу от 1 до 10; и

R^h представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил.

[00308] Во 2-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгата формулы (C1), CyC1 представлен формулой (C1a) или (C1a1); а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления.

[00309] В 3-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгата формулы (C1), CyC1 представлен формулой (C1b) или (C1b1); а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления.

[00310] В 4-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгата формулы (C1), CyC1 представлен формулой (C1a) или (C1a1); оба из Ra и Rb представляют собой H; и R5 представляет собой H или Me; а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м или 2-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления.

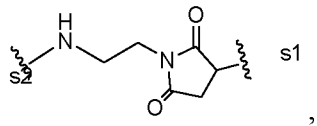
[00311] В 5-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгата формулы (C1) P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков; а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м, 2-м или 4-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления. В более конкретном варианте осуществления P выбран из: Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-

Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 215), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 216), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 217), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe и Gln-Ala. В другом более конкретном варианте осуществления P представляет собой Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala или D-Ala-D-Ala.

[00312] В 6-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгатов формулы (C1), Q представляет собой $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль; а остальные переменные такие же, как описано выше в 1-м, 2-м, 4-м или 5-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантах осуществления, описанных в нем.

[00313] В 7-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгатов формулы (C1), оба из R19 и R20 представляют собой H; и m" равен целому числу от 1 до 6; а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м или 6-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантах осуществления, описанных в нем.

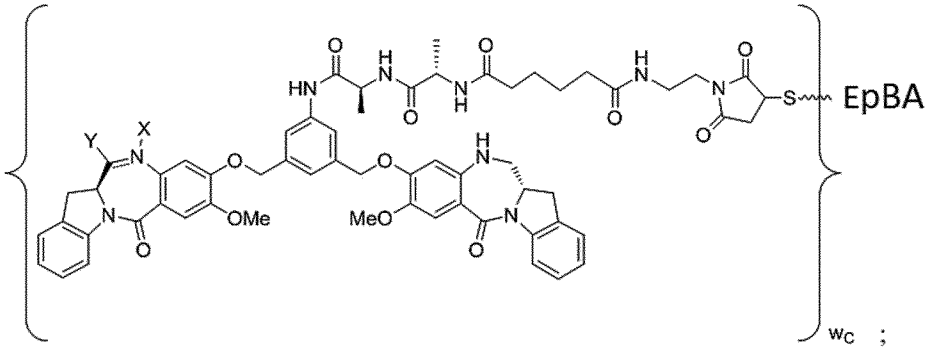
[00314] В 8-м конкретном варианте осуществления для иммуноконъюгатов формулы (C1), -L-LC- представлен следующей формулой:



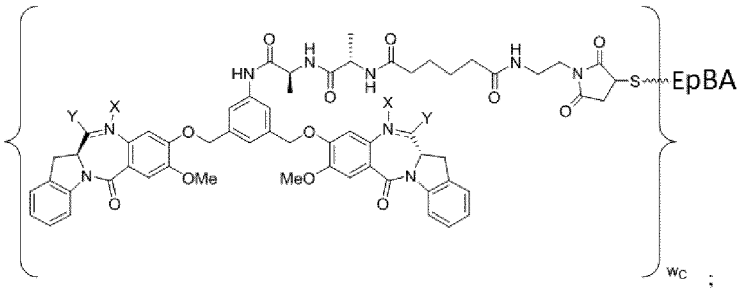
,

а остальные переменные такие, как описано выше в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м, 6-м или 7-м конкретном варианте осуществления второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантах осуществления, описанных в нем.

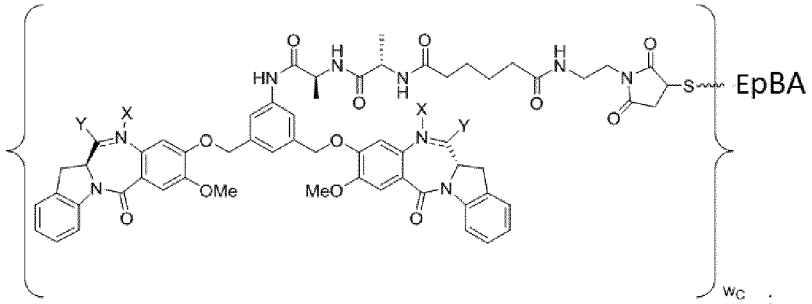
[00315] В 9-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат второго варианта осуществления представлен следующей формулой:



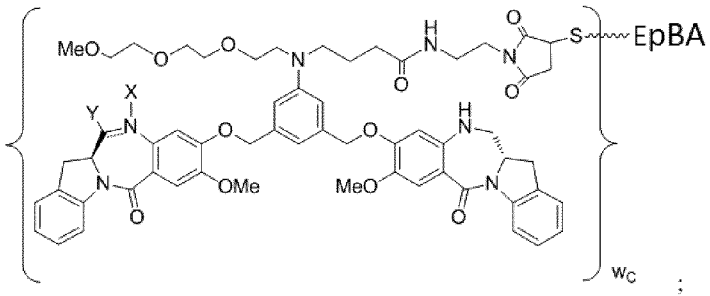
;



;

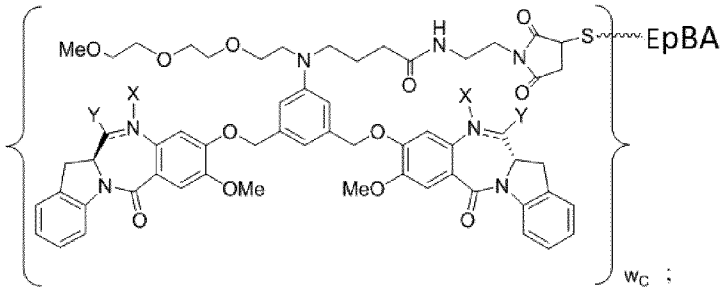


;



;

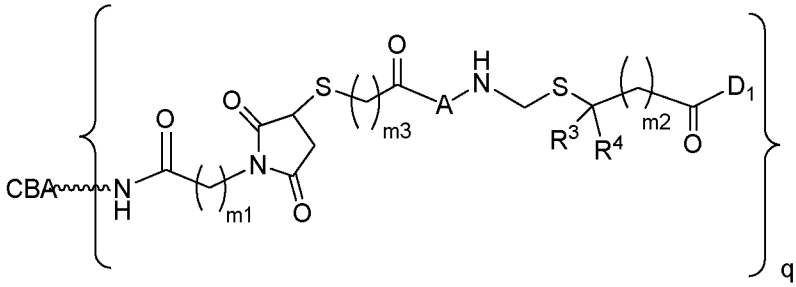
или



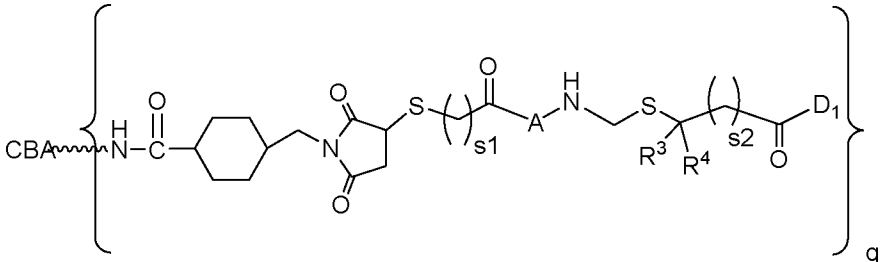
;

или его фармацевтически приемлемая соль, причем двойная линия== между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что когда она представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой -H, и когда она представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой -OH или -SO_3 H или его фармацевтически приемлемая соль. В более конкретном варианте осуществления двойная линия == между N и C представляет собой двойную связь, X отсутствует, а Y представляет собой– H. В другом более конкретном варианте осуществления двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь, X представляет собой- H, а Y представляет собой- SO_3H, или его фармацевтически приемлемая соль.

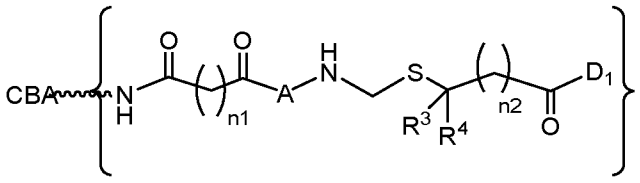
[00316] В 3-м варианте осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:



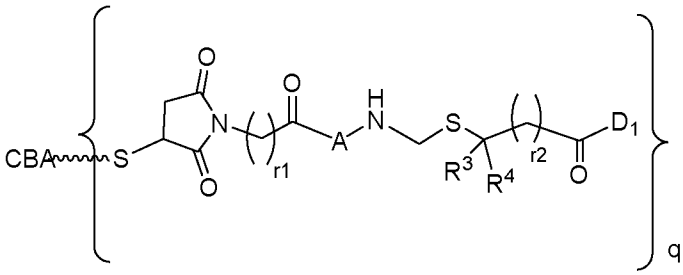
q (Ia);



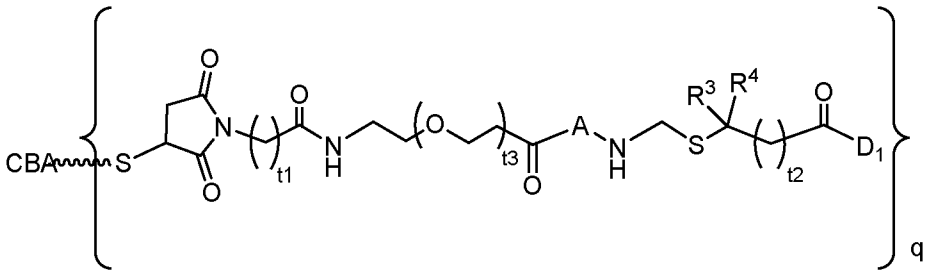
q (Ib);



q (Ic);



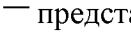
q (Id); или



q (Ie);

или его фармацевтически приемлемая соль, где:

 представляет собой EpBA, соединенную с группой L_2 через аминогруппу Lys;

 представляет собой EpBA, соединенную с группой L_2 через тиоловую группу Cys;

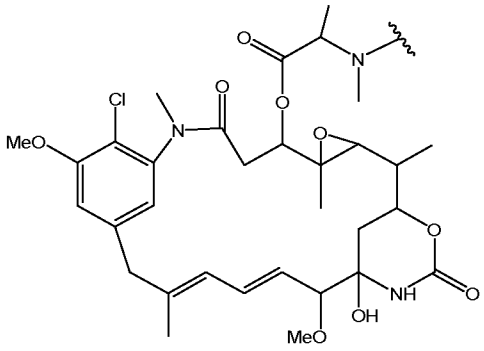
каждый из R^3 и R^4 независимо представляет собой H или Me;

каждый из m1, m3, n1, r1, s1 и t1 независимо равен целому числу от 1 до 6;

каждый из m2, n2, r2, s2 и t2 независимо равен целому числу от 1 до 7;

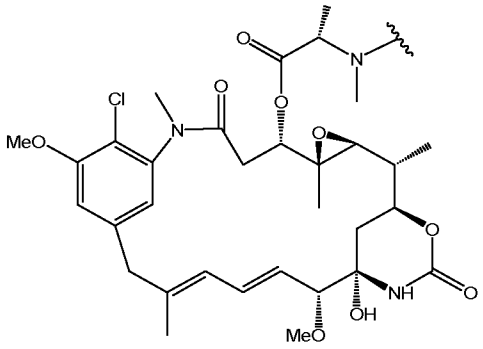
t3 равен целому числу от 1 до 12;

D_1 представлен следующей формулой:



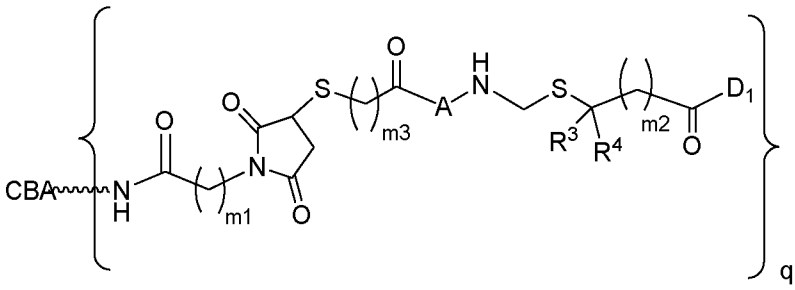
; и

q представляет собой целое число от 1 до 20. В более конкретном варианте осуществления D_1 представлен следующей формулой:

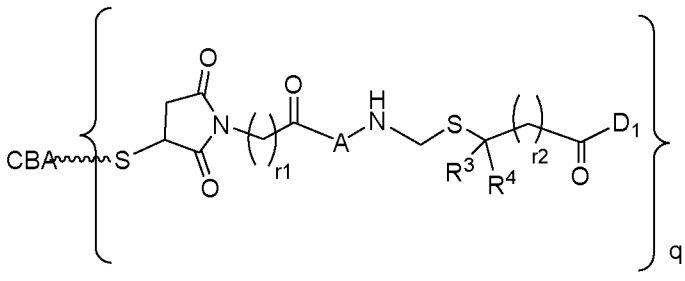


.

[00317] В 1-м конкретном варианте осуществления 3-го варианта осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:



q (Ia), или



q (Id);

где:

каждый из m1 и m3 независимо равен целому числу от 2 до 4;

m2 равен целому числу от 2 до 5;

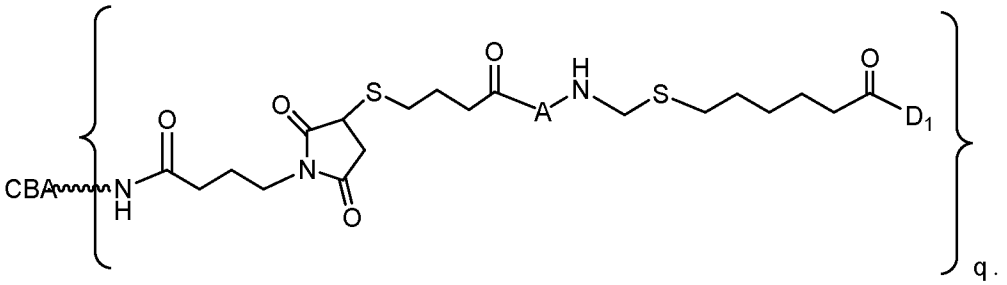
r1 равен целому числу от 2 до 6;

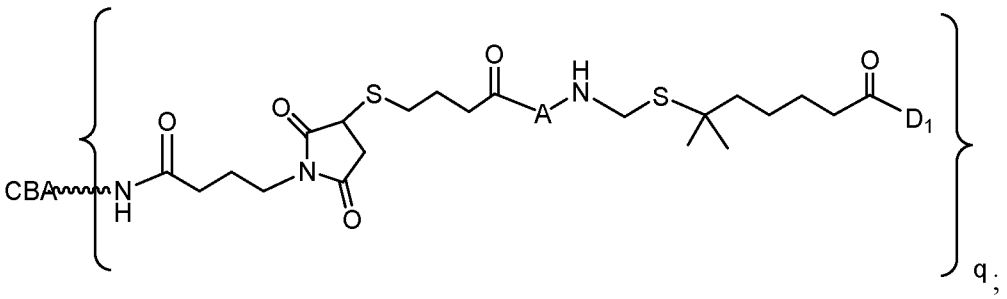
r2 равен целому числу от 2 до 5; и

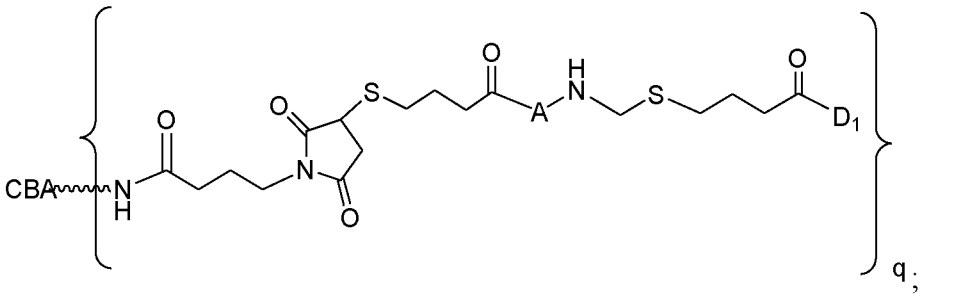
остальные переменные такие, как описано в 3-м варианте осуществления.

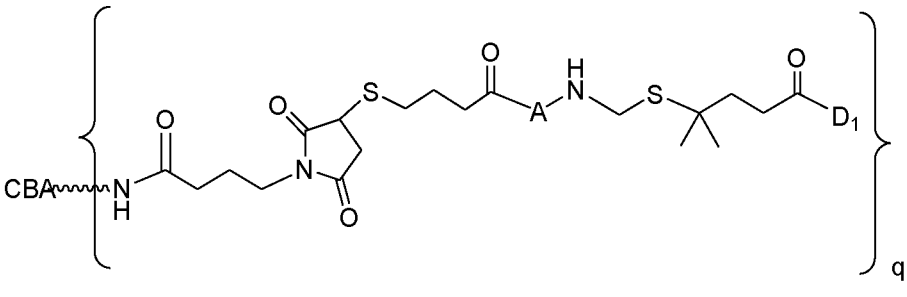
[00318] Во 2-м конкретном варианте для иммуноконъюгатов, описанных в 3-м варианте осуществления и 1-м конкретном варианте осуществления, A представляет собой Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, или D-Ala-tBu-Gly. В более конкретном варианте для иммуноконъюгатов, описанных в 3-м варианте осуществления и 1-м конкретном варианте осуществления, A представляет собой L-Ala-D-Ala-L-Ala.

[00319] В 3-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:

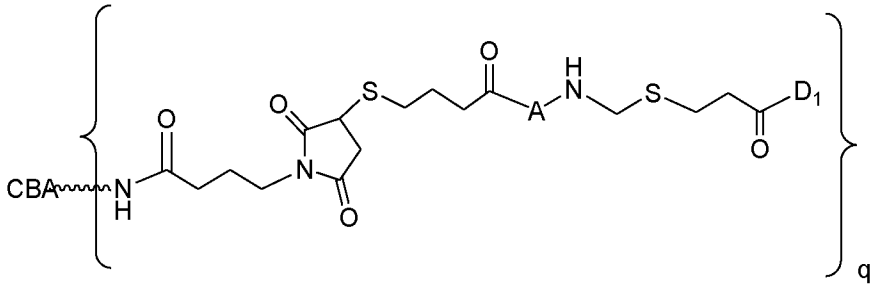




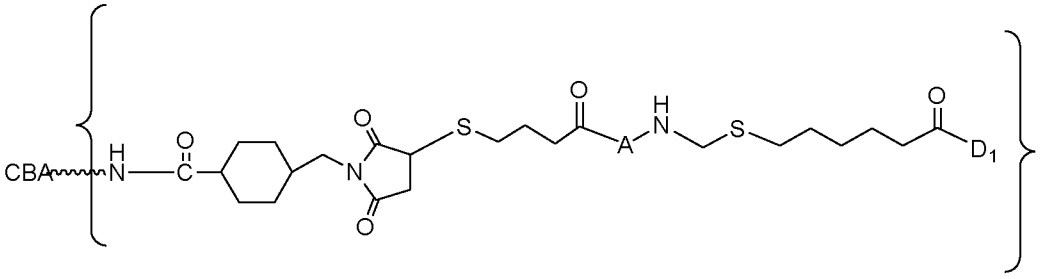




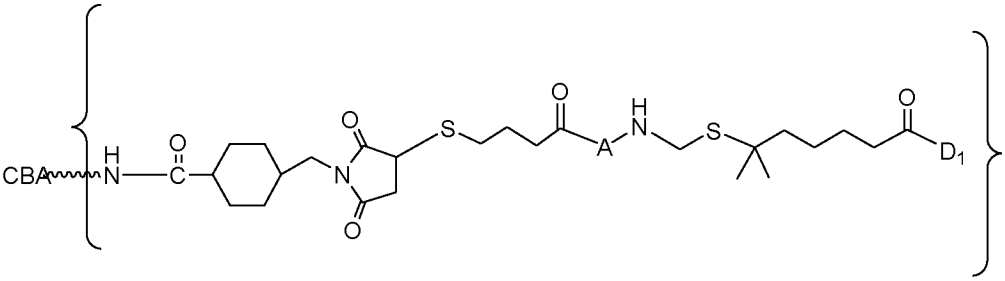
q ;



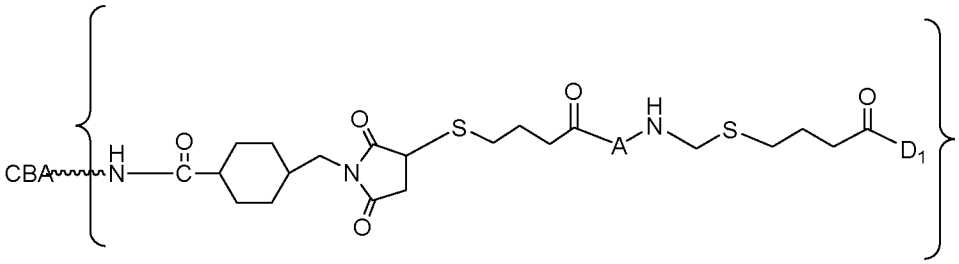
q ;



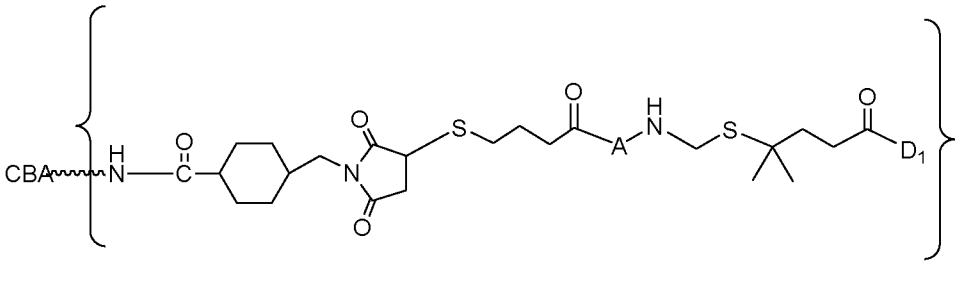
q ;



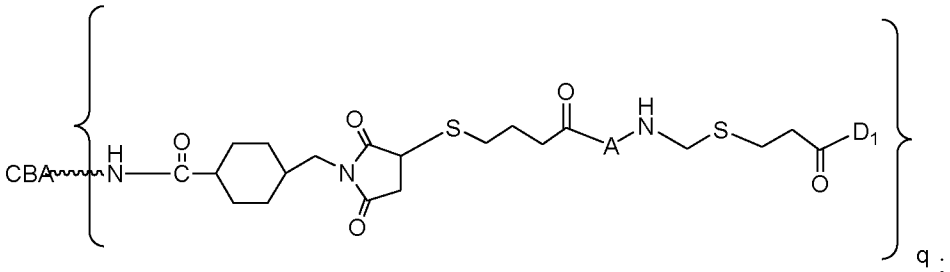
q ;



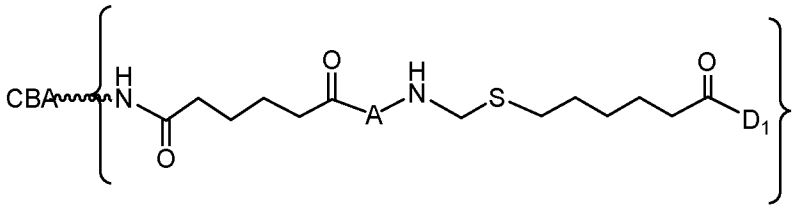
q ;



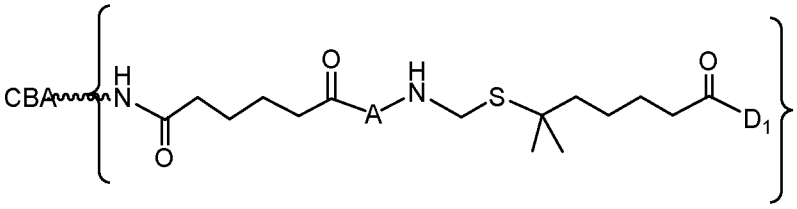
q ;



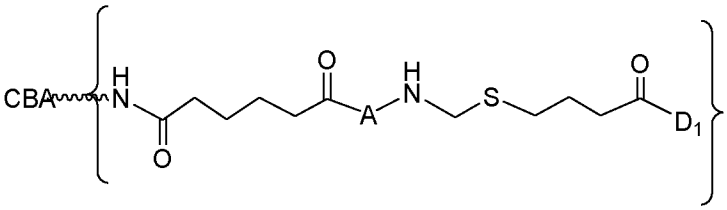
q;



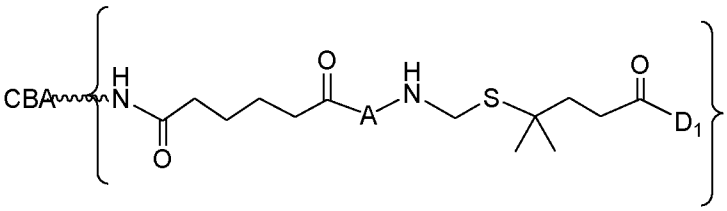
q;



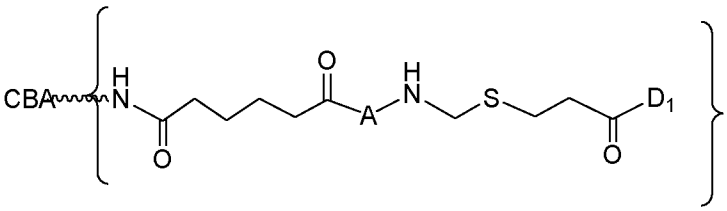
q;



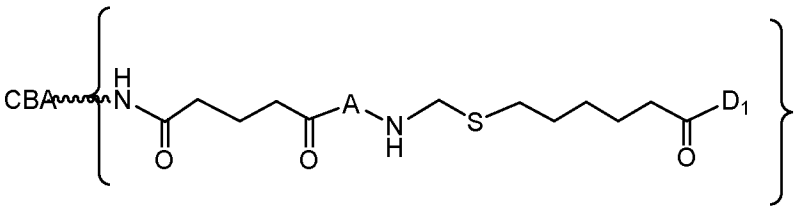
q;



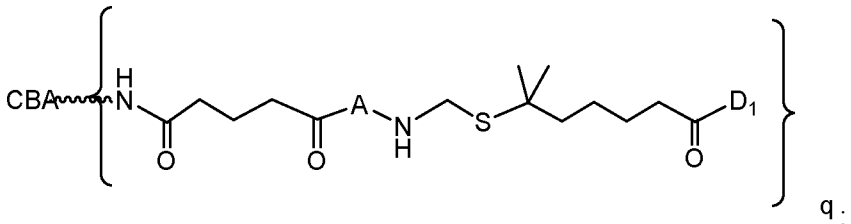
q;

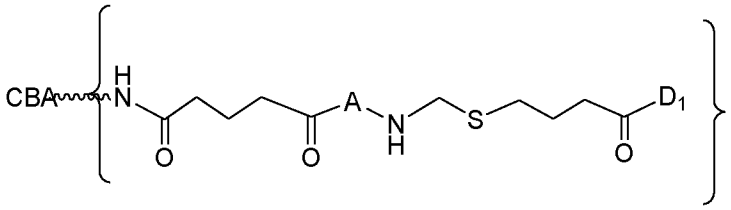


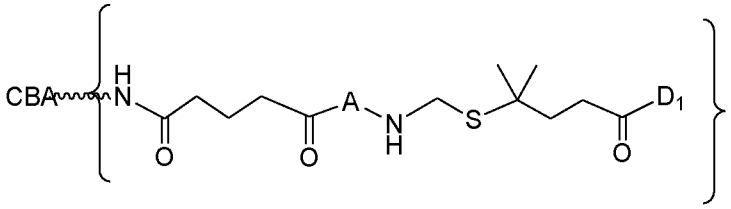
q;

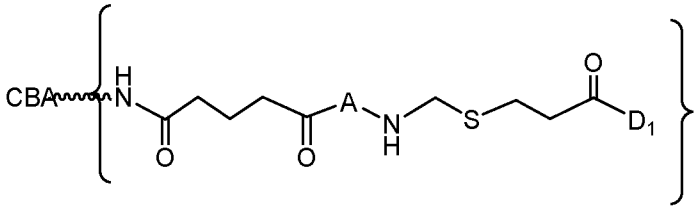


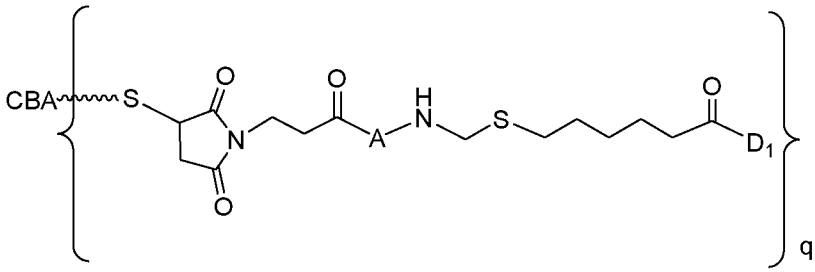
q;

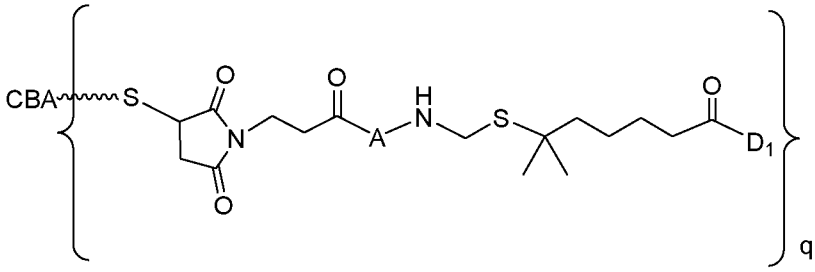

CBA
H
N
O
A
N
H
S
D1
q;

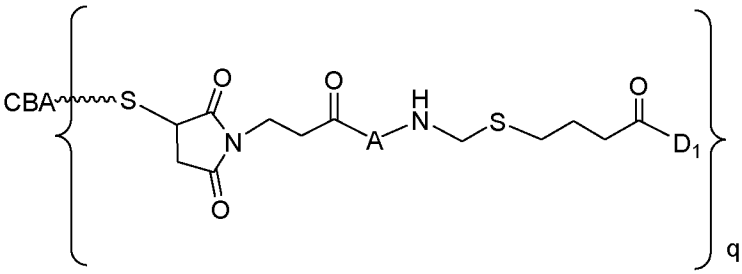

CBA
H
N
O
A
N
H
S
D1
q;

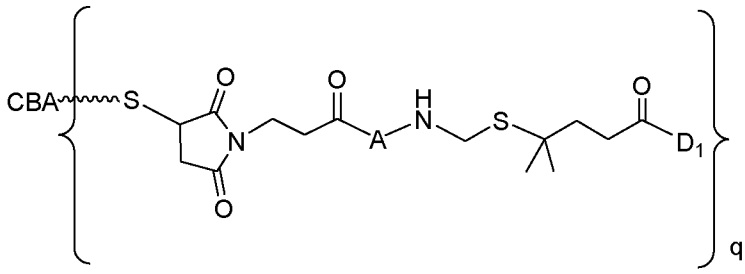

CBA
H
N
O
A
N
H
S
D1
q;


CBA
H
N
O
A
N
H
S
O
D1
q;

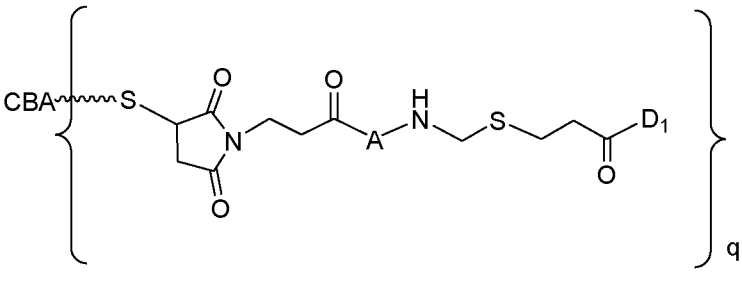

CBA
S
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q;


CBA
S
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q;

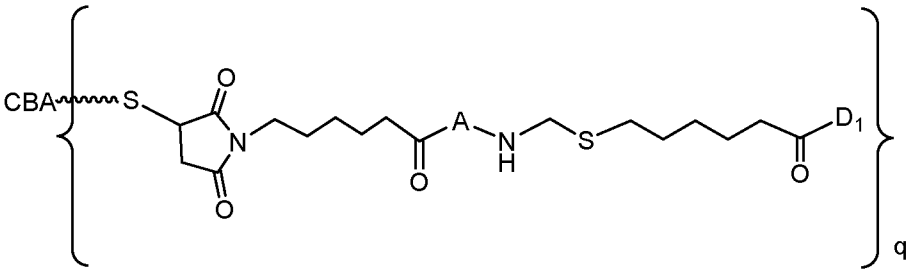

CBA
S
O
N
O
A
H
N
S
O
D1
q;



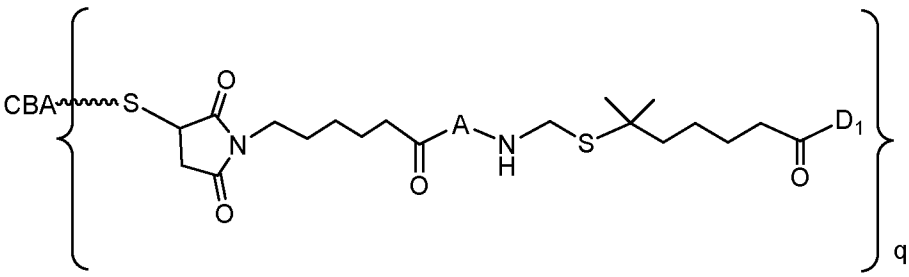
q; или



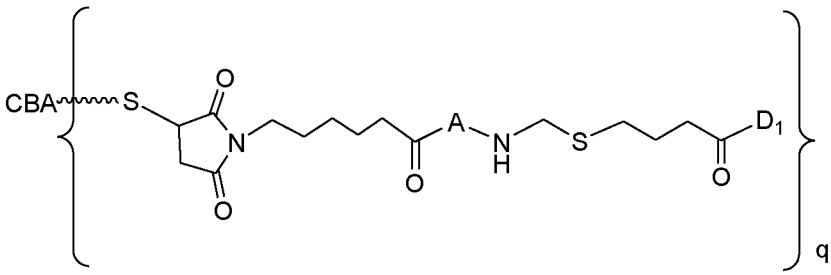
q;



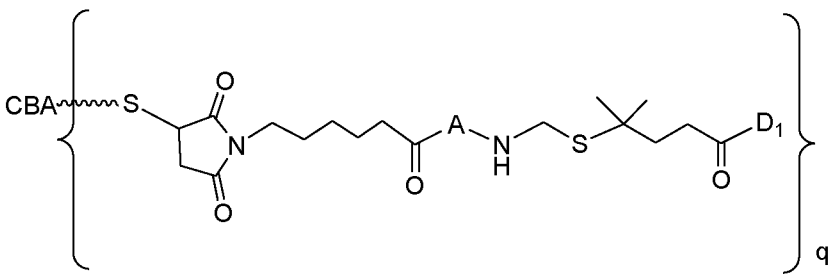
q;



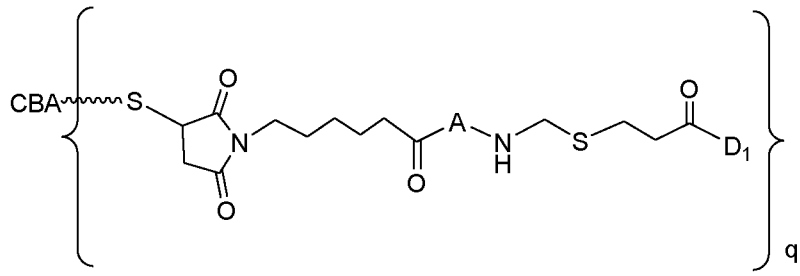
q;

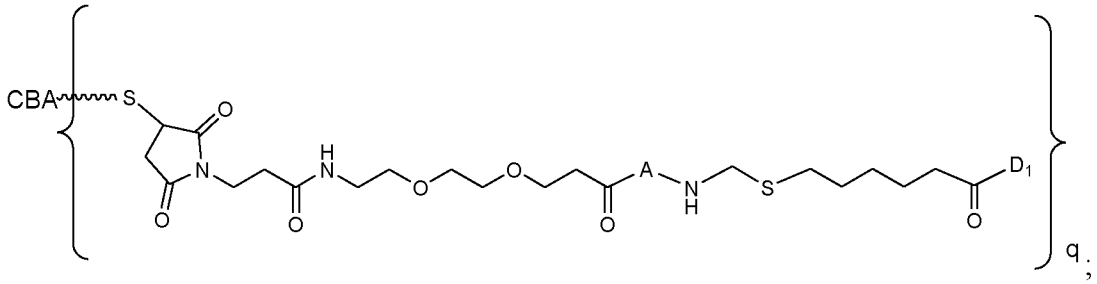


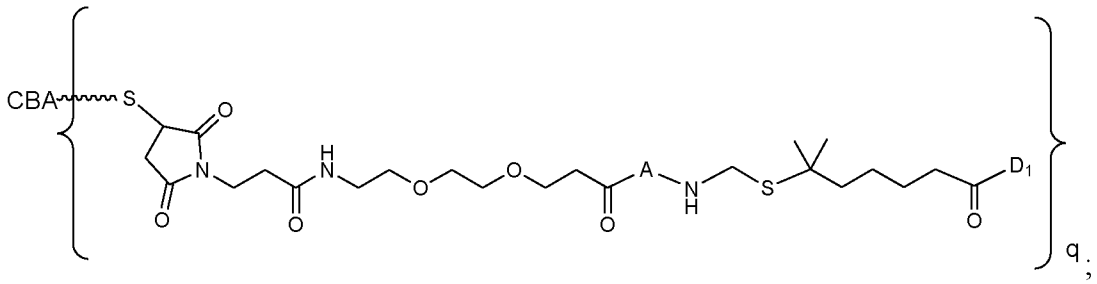
q;

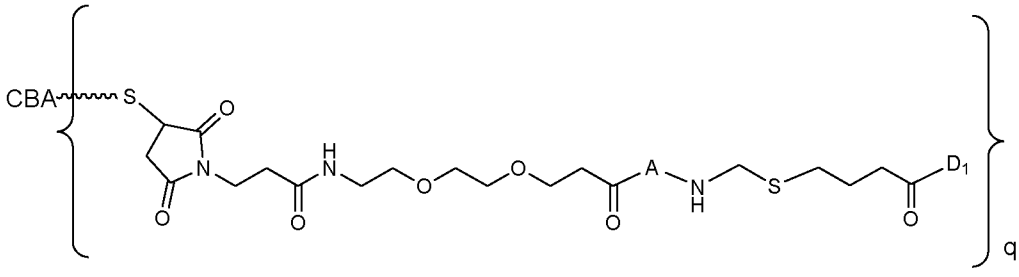


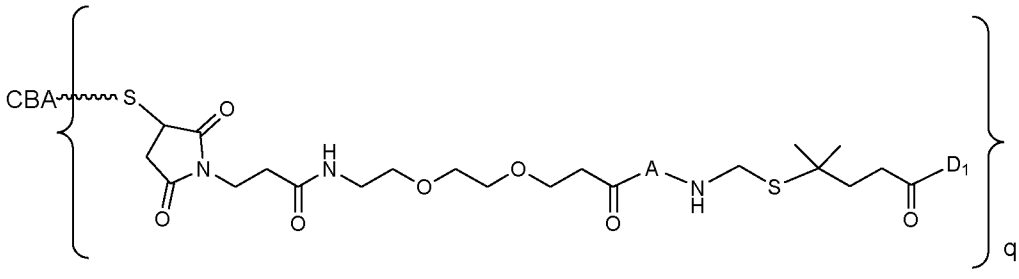
q;

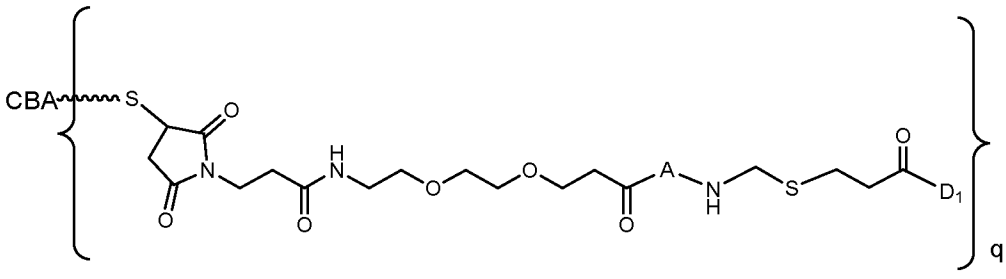


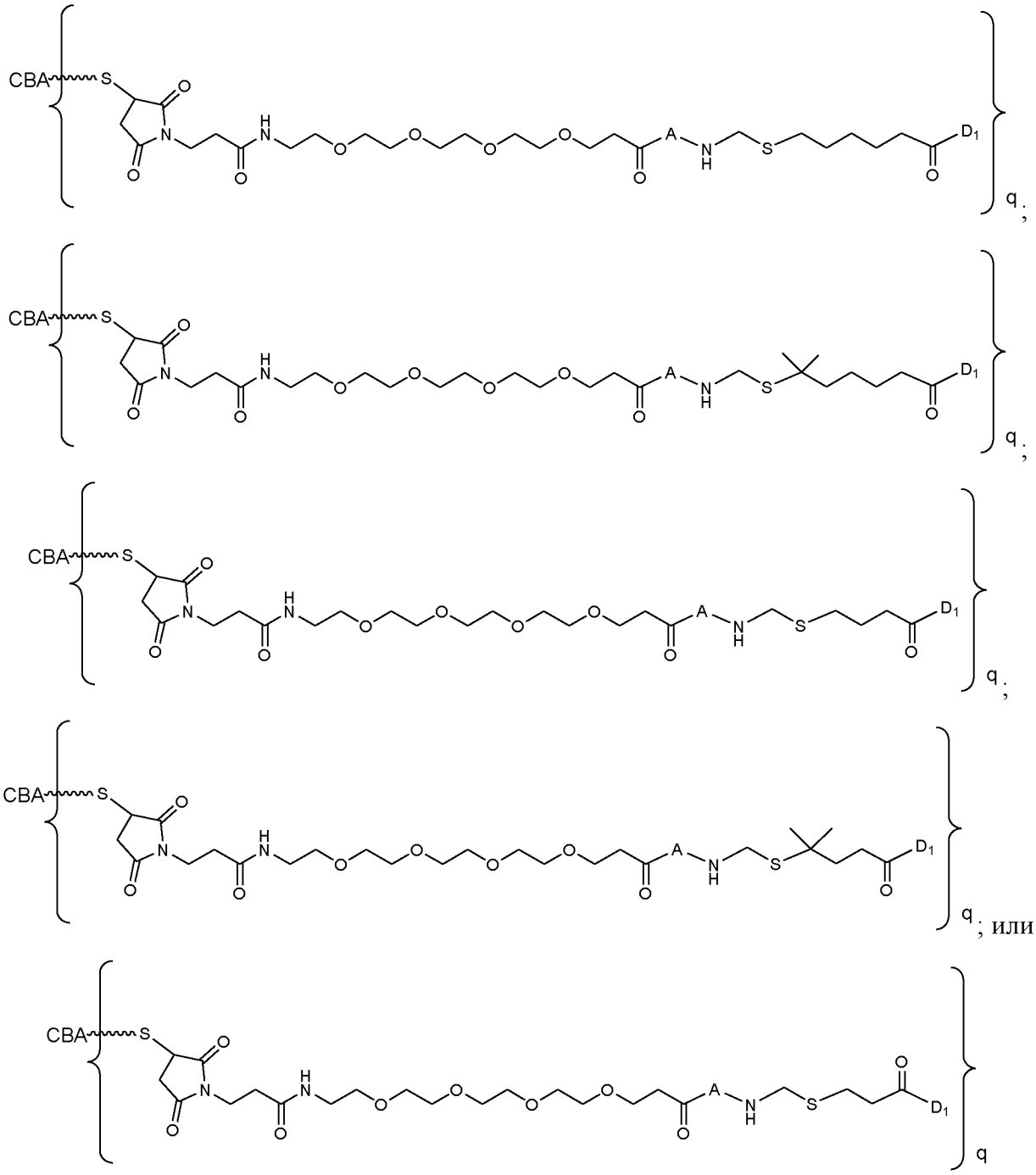








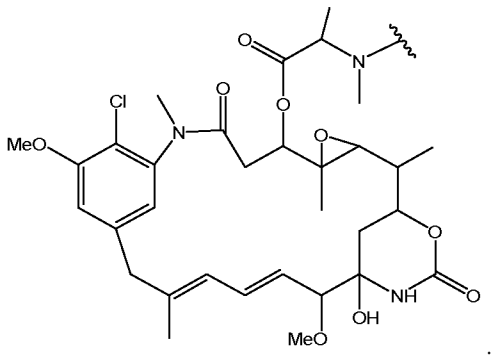




или его фармацевтически приемлемая соль, где:

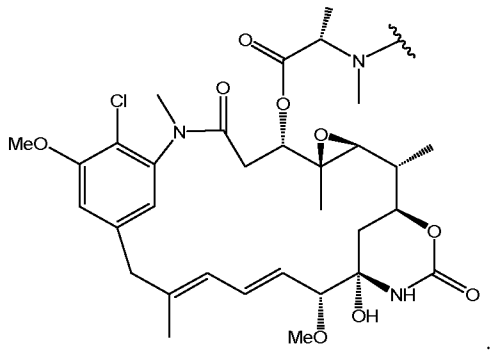
A представляет собой Ala-Ala-Ala, Ala-D-Ala-Ala, Ala-Ala, D-Ala-Ala, Val-Ala, D-Val-Ala, D-Ala-Pro, или D-Ala-tBu-Gly, и

D_1 представлен следующей формулой:



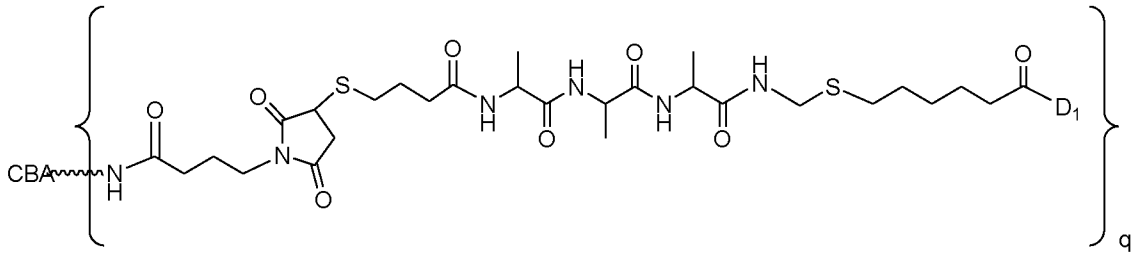
;

и остальные переменные такие, как описано в 3-м варианте осуществления и его 1-м и 2-м конкретных вариантах осуществления. В более конкретном варианте осуществления A представляет собой L-Ala-D-Ala-L-Ala. В более конкретном варианте осуществления D_1 представлен следующей формулой:

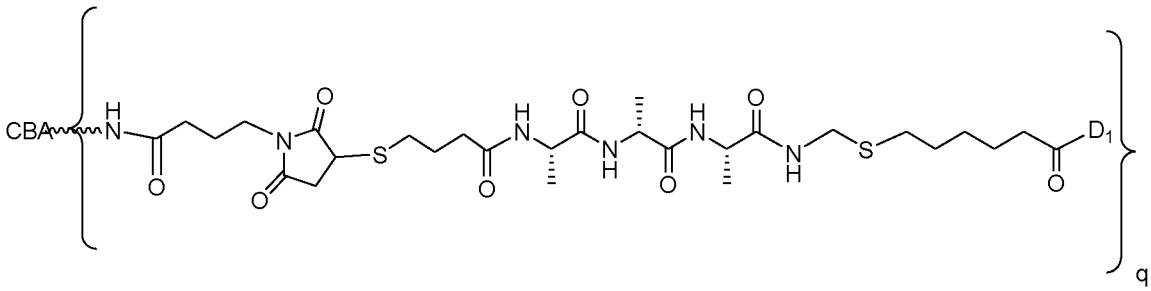


.

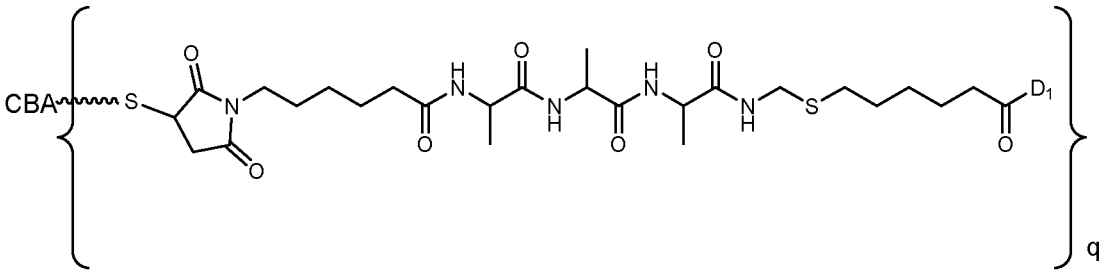
[00320] В 4-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:



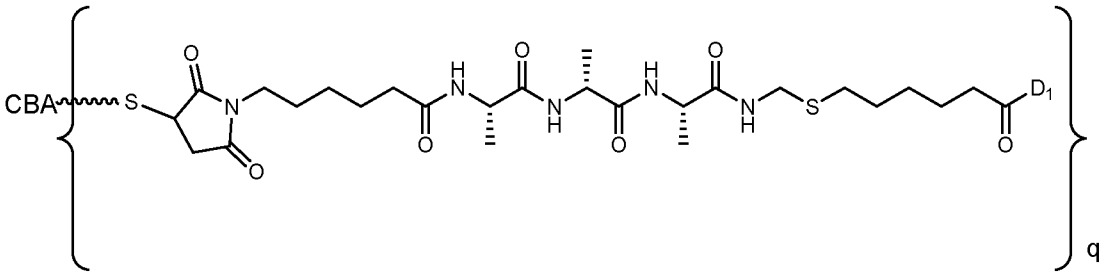
q;



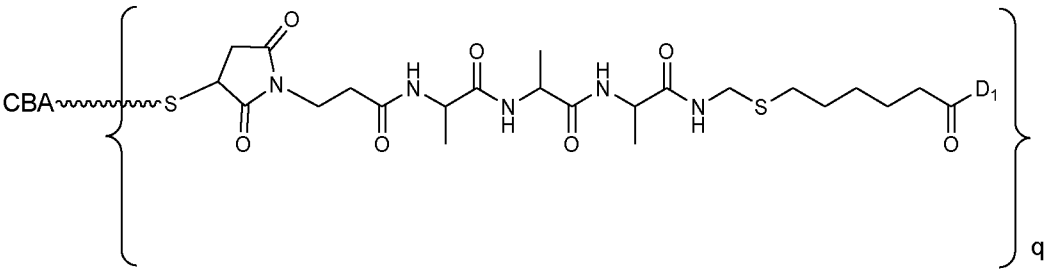
q;



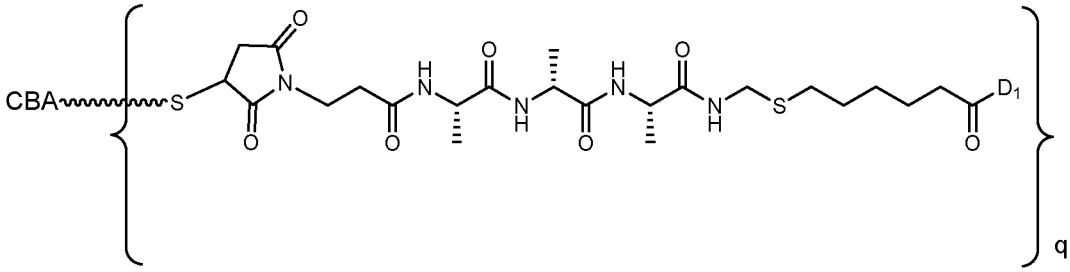
q;



q;

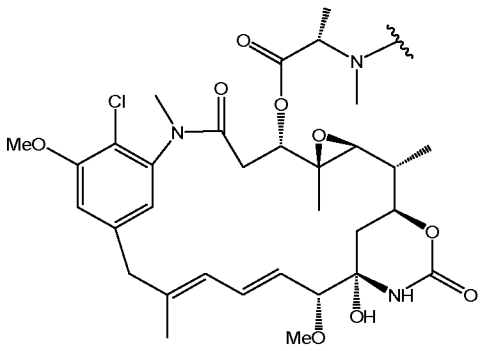


q; или

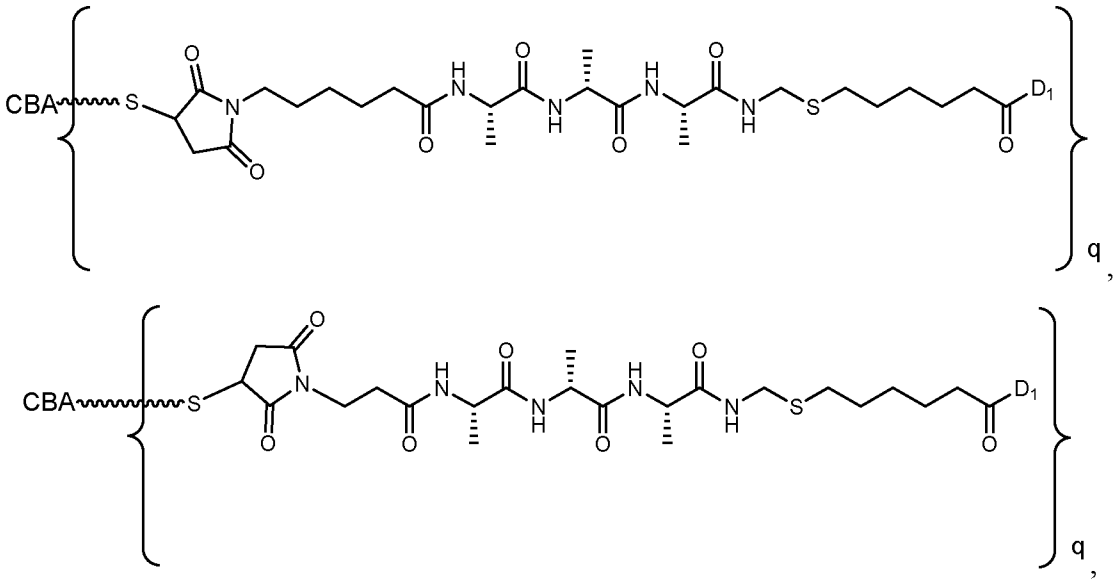


q,

где D_1 представлен следующей формулой:



[00321] В 5-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:

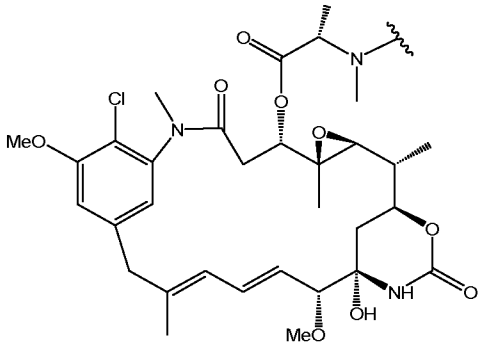


при этом:

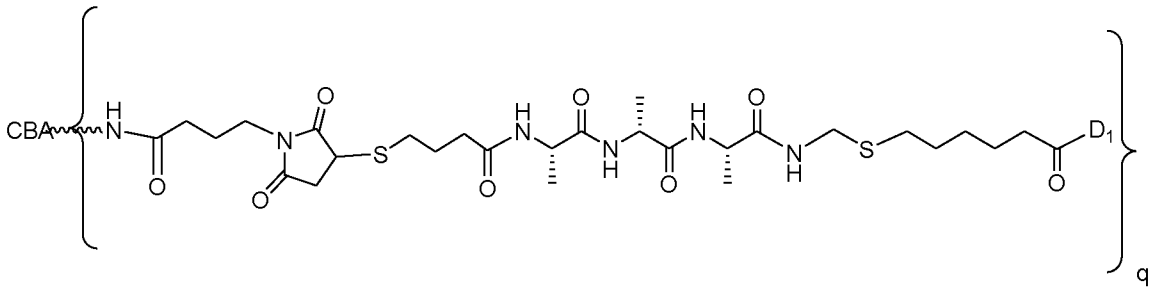
CBA представляет собой EpBA;

q равно 1 или 2;

D_1 представлен следующей формулой:



[00322] В 6-м конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:

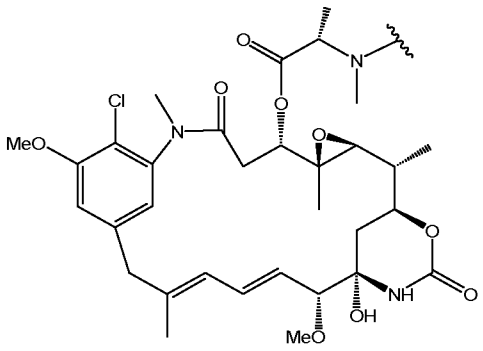


где:

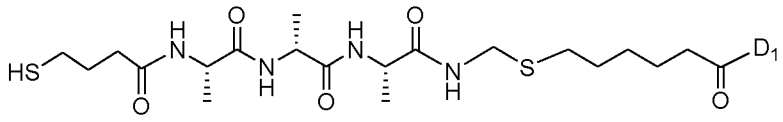
CBA представляет собой EpBA;

q равен целому числу от 1 до 10;

D_1 представлен следующей формулой:



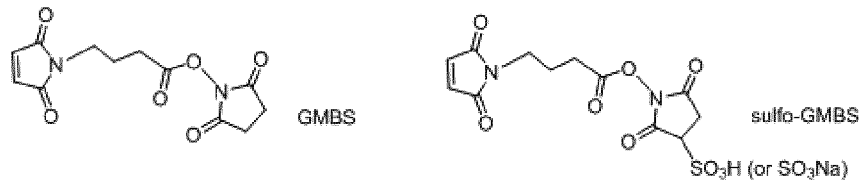
[00323] В другом конкретном варианте осуществления в изобретении предложен иммуноконъюгат EpBA, который содержит EpBA (например, антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM), связанный с соединением майтанзиноидом DM21L (также называемым LDL-DM), представленным следующей формулой:



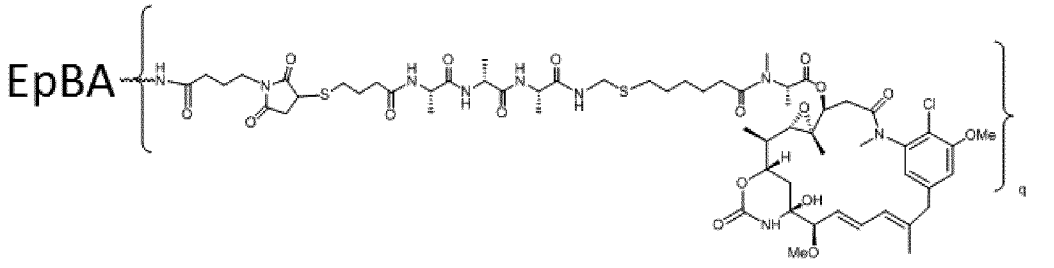
(D-2);

через линкер γ-малеимидобутирилокси N-сукцинимидный эфир (GMBS) или N-(γ-малеимидобутирилокси)сульфосукцинимидный эфир (сульфо-GMBS или sGMBS).

Линкеры GMBS и сульфо-GMBS (или sGMBS) известны в данной области техники и могут быть представлены следующей структурной формулой:



[00324] В одном варианте осуществления иммуноконъюгат представлен следующей формулой:



,

при этом:

EpBA представляет собой антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, связанное с соединением майтанзиноидом через аминогруппу Lys, где q равен целому числу от 1 до 10.

[00325] В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L содержит антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, описанные в данном документе. В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L содержит: VH-CDR1, содержащую $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5); VH-CDR2, содержащую $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7); и VH-CDR3, содержащую $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран D и E, X_3 выбран P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L содержит CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10); VL-CDR2 легкой цепи, содержащую QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и VL-CDR3, содержащую $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L, и Q, X_3 выбран из S, G, Y, и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11).

[00326] В некоторых вариантах осуществления VH-CDR1 EpBA содержит последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I и W (SEQ ID NO: 6). В некоторых вариантах осуществления VH-CDR3 EpBA содержит последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления VL-CDR3 EpBA содержит последовательность $AQX_3LELPNT$, где X_3 выбран из S, G, Y и N (SEQ ID NO: 12).

[00327] В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2, и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13-15, 42, 40 и 41, соответственно. В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89. В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, содержащие HC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

[00328] В некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее MM с SEQ ID NO: 155. В

некоторых вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L дополнительно включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее CM с SEQ ID NO: 168. В альтернативных вариантах осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее CM с SEQ ID NO: 169. В одном из вариантов осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 174. В одном варианте осуществления EpBA конъюгата EpBA-DM21L включает активируемое антитело к EpCAM, содержащее тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 179.

[00329] В определенных вариантах осуществления для композиций (например, фармацевтических композиций), содержащих иммуноконъюгаты EpBA-LDL-DM, среднее количество цитотоксического агента на молекулу антитела (т.е. среднее значение q), также известное как отношение лекарственного средства к антителу (DAR), DAR находится в диапазоне от 3,0 до 4,0, от 3,2 до 3,8 или от 3,4 до 3,7. В некоторых вариантах осуществления DAR равно 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,5, 3,7 или 3,8.

Способы получения иммуноконъюгатов

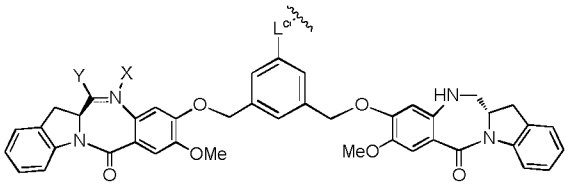
[00330] Иммуноконъюгаты, содержащие связывающий EpCAM агент (EpBA, например, антитело к EpCAM, связывающий к EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM), ковалентно связанный с цитотоксическим агентом через ε-аминогруппу одного или более остатков лизина, расположенных на EpBA. как описано выше, первый вариант осуществления или любые конкретные варианты осуществления, описанные в нем, могут быть получены в соответствии с любыми способами, известными в данной области техники, см., например, WO 2012/128868 и WO 2012/112687, полное содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

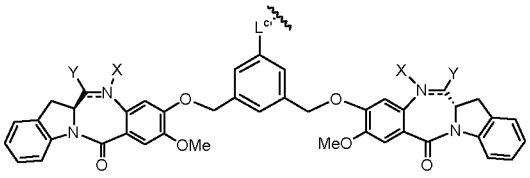
[00331] В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту осуществления получают при помощи первого способа, включающего стадии приведения в контакт EpBA (например, антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM, описанных в данном документе) с цитотоксическим агентом, имеющим реакционноспособное к амину группу.

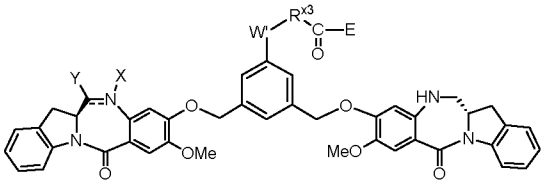
[00332] В одном варианте осуществления для первого способа, описанного выше, реакцию проводят в присутствии реакционноспособного к имину реагента, такого

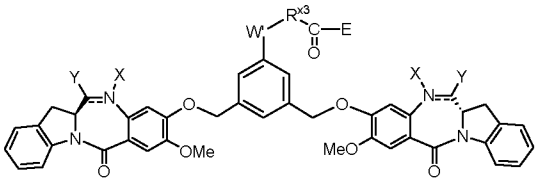
как $NaHSO_3$.

[00333] В одном варианте осуществления для первого способа, описанного выше, цитотоксический агент, содержащий реакционноспособное к амину группу, представлен следующей формулой:


(L1a'),


(L1a'1),


(L1b'), или


(L1b'1);

или его фармацевтически приемлемая соль, где определения переменных описаны выше для формул (L1a'), (L1a'1), (L1b') и (L1b'1).

[00334] В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту получают вторым способом, включающим стадии:

(a) приведения в контакт цитотоксического агента с линкерным соединением, имеющим реакционноспособную к амину группу и реакционноспособную к тиолу группу с образованием соединения цитотоксический агент-линкер, имеющего связанную с ним реакционноспособную к амину группу; и

(b) приведения в контакт EpBA с соединением цитотоксический агент-линкер.

В одном варианте осуществления реакцию на стадии (a) проводят в присутствии реакционноспособного к имину реагента (например, $NaHSO_3$). В одном варианте осуществления соединение цитотоксический агент-линкер реагирует с EpBA без очистки. Альтернативно, соединение цитотоксический агент-линкер сначала очищают перед приведением в контакт с EpBA.

[00335] В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту получают третьим способом, включающим стадии:

(a) приведения в контакт EpBA с линкерным соединением, имеющим реакционноспособную к имину группу и реакционноспособную к тиолу группу, с образованием модифицированного EpBA, имеющего связанную с ним реакционноспособную к тиолу группу; и

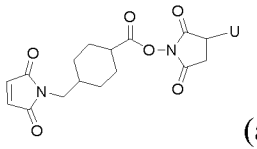
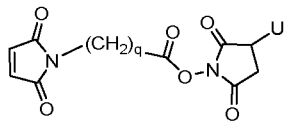
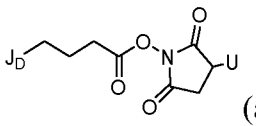
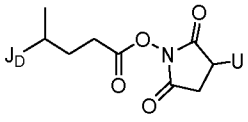
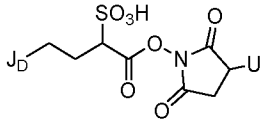
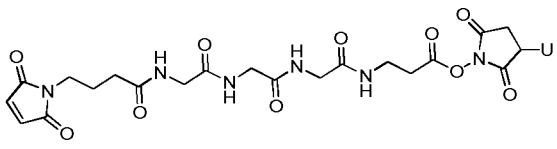
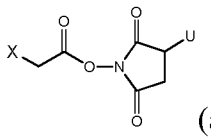
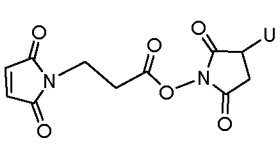
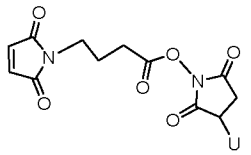
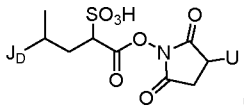
(b) приведения в контакт модифицированного EpBA с цитотоксическим агентом.

В одном варианте осуществления реакцию на стадии (b) проводят в присутствии реакционноспособного к имину реагента (например, $NaHSO_3$).

[00336] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты по первому варианту осуществления получают четвертым способом, включающим стадии приведения в контакт EpBA, цитотоксического соединения и линкерного соединения, содержащего реакционноспособную к амину группу и реакционноспособную к тиолу группу.

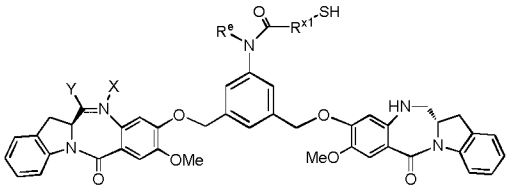
В одном варианте осуществления реакцию проводят в присутствии реакционноспособную к имину агента (например, $NaHSO_3$).

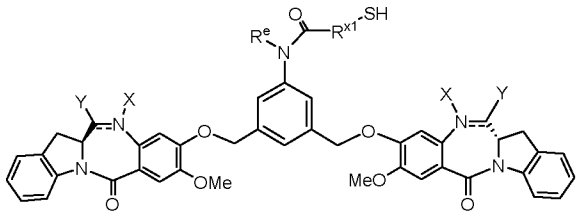
[00337] В некоторых вариантах осуществления для второго, третьего или четвертого способов, описанных выше, линкерное соединение, имеющее реакционноспособную к амину группу и реакционноспособную к тиолу группу, представлено следующей формулой:

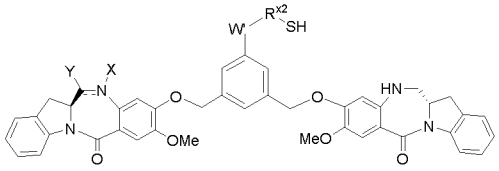

(a1L);

(a2L);

(a3L);

(a4L);

(a5L),

(a6L),

(a7L);

(a8L);

(a9L); и

(a10L),

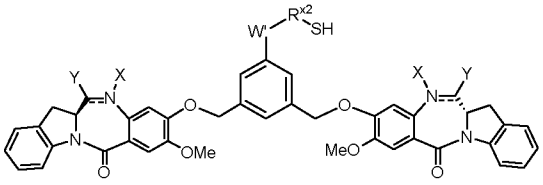
где X представляет собой галоген; J_D –SH, $–SSR^d$, или $–SC(=O)R^g$; R^d представляет собой фенил, нитрофенил, динитрофенил, карбоксинитрофенил, пиридил или нитропиридил; R^g представляет собой алкил; а остальные переменные такие, как описано

выше для формулы (a1) - (a10); а цитотоксический агент представлен следующей формулой:


(L2a');

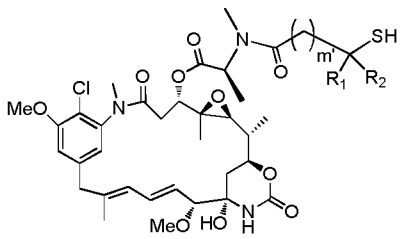

(L2a'1);


(L2b'); или


(L2b'1),

или его фармацевтически приемлемая соль, где переменные являются такими, как описано выше для формул (L1a'), (L1a'1), (L1b'), (L1b'1), (L2a'), (L2a'1), (L2b') и (L2b'1).

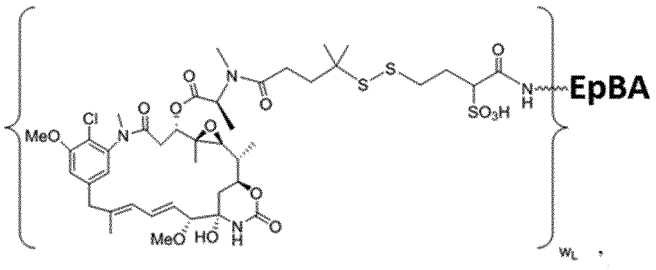
[00338] В определенных вариантах осуществления для второго, третьего или четвертого способов, описанных выше, линкерное соединение, имеющее реакционноспособную к амину группу и реакционноспособную к тиолу группу, представлено любой одной из формул (a1L) - (a10L), а цитотоксический агент представлен следующей формулой:



при этом переменные такие, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 13-го по 15-й, первого варианта осуществления, описанного выше, и любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем.

[00339] В конкретном варианте осуществления для второго, третьего или четвертого способов, описанных выше, линкер представляет собой сульфо-SPDB, цитотоксический агент представляет собой DM4, а иммуноконъюгат представлен

следующей формулой:

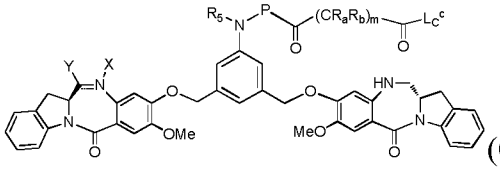


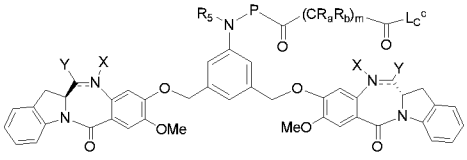
или

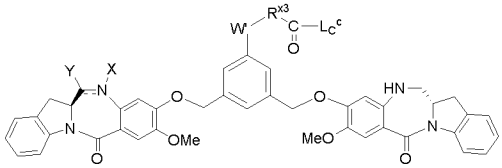
его фармацевтически приемлемая соль, где W_L равен целому числу от 1 до 10.

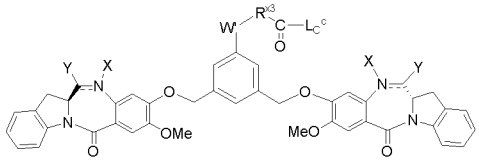
[00340] Иммуноконъюгаты, содержащие связывающий EpCAM агент, ковалентно связанный с цитотоксическим агентом через тиольную группу (-SH) одного или более остатков цистеина, расположенных на связывающем EpCAM агенте, как описано во втором варианте осуществления выше (например, иммуноконъюгаты по любому из конкретных вариантов осуществления с 1-го по 23-й или любому другому конкретному варианту осуществления, описанному в них) могут быть получены путем приведения в контакт EpBA, содержащего один или более свободных цистеинов, с цитотоксическим агентом, имеющим реакционноспособную к тиолу группу, описанную в данном документе.

[00341] В одном варианте осуществления цитотоксический агент, содержащий реакционноспособную к тиолу группу, представлен следующей формулой:

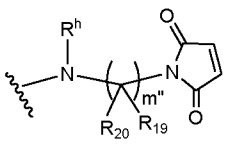

(C1a');


(C1a'1)


(C1b'); или

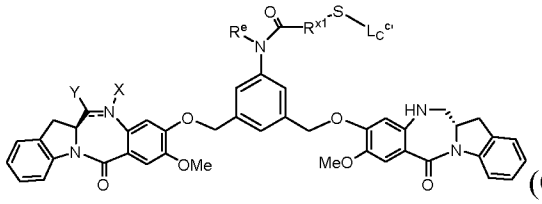

(C1b'1),

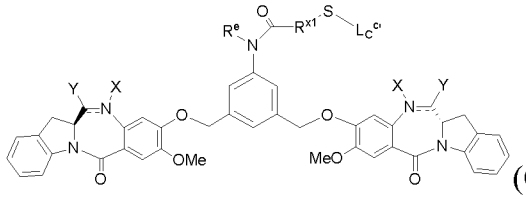
или его фармацевтически приемлемая соль, где $-L_C^c$ представлен следующей формулой:

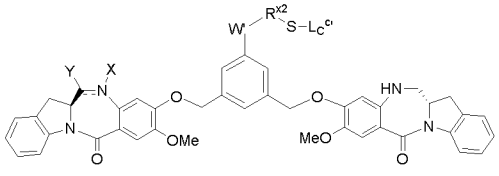


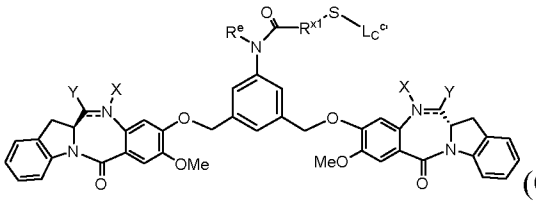
при этом переменные такие, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 1-го по 9-й и 23-й, второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем.

[00342] В еще одном варианте осуществления цитотоксический агент, содержащий реакционноспособную к тиолу группу, представлен следующей формулой:

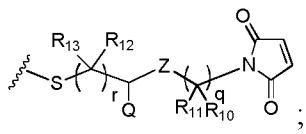
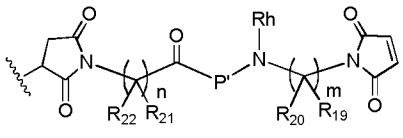

(C2a”),


(C2a”1),


(C2b”),

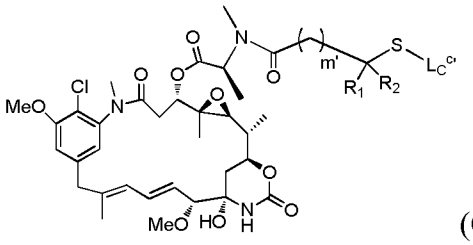

(C2b”1)

или его фармацевтически приемлемая соль, где Lcc’ представлен следующей формулой:


; или 
;

при этом переменные такие, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 10-го по 16-й и 23-й второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем.

[00343] В еще одном варианте осуществления цитотоксический агент, содержащий реакционноспособную к тиолу группу, представлен следующей формулой:

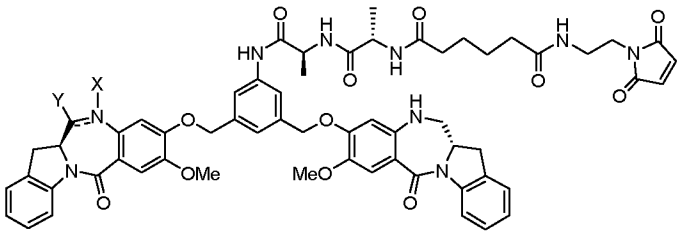


(C3a'),

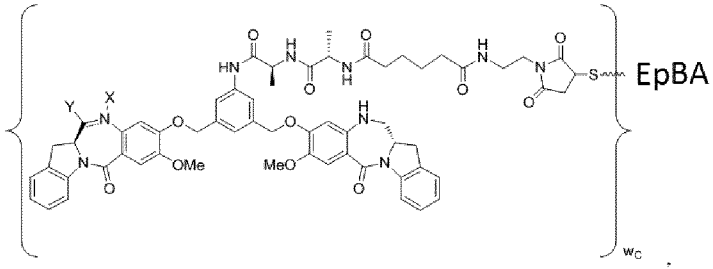
или его фармацевтически приемлемая соль, где LCc' описан выше, а остальные переменные такие, как описано выше в любом из конкретных вариантов осуществления с 17-го по 23-й второго варианта осуществления или любых более конкретных вариантов осуществления, описанных в нем.

[00344] В конкретных вариантах осуществления органические растворители используются в реакции EpBA и цитотоксического агента для солюбилизации цитотоксического агента. Примеры органических растворителей включают, но не ограничиваются ими, диметилацетамид (DMA), пропиленгликоль и т. д. В одном варианте осуществления реакцию EpBA и цитотоксического агента проводят в присутствии DMA и пропиленгликоля.

[00345] В конкретном варианте осуществления цитотоксический агент, представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемую соль приводят в контакт с EpBA (например, антителом к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемым антителом к EpCAM, описанном в данном документе) с образованием иммуноконъюгата, представленного следующей формулой:

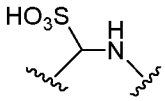


или его фармацевтически приемлемая соль, где:

двойная линия между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что, когда это двойная связь, X отсутствует, а Y представляет собой -H, а когда это одинарная связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой -SO3H, или его фармацевтически приемлемая соль; и WC¬ равен 1 или 2. В более конкретном

варианте осуществления двойная линия между N и C представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H. В другом более конкретном варианте осуществления двойная линия между N и C представляет собой одинарную связь, X представляет собой –H, а Y представляет собой -SO3H, или его фармацевтически приемлемая соль. Еще более конкретно, фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую или калиевую соль.

[00346] В некоторых вариантах осуществления, когда Y представляет собой –SO3H, или его фармацевтически приемлемая соль, иммуноконъюгаты получают путем (a) приведения в контакт иминного фрагмента в иминсодержащем цитотоксическом агенте, имеющем реакционноспособную к тиолу группу, описанную выше (т.е. формула (C1a'), (C1a'1), (C1b'), (C1b'1), (C2a"), (C2a"1), (C2b") или (C2b"1), где двойная линия между N и C представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H) с диоксидом серы, бисульфитной солью или метабисульфитной солью в водном растворе при pH от 1,9 до 5,0 с образованием модифицированного цитотоксического агента, содержащего модифицированный иминный фрагмент, представленный следующей формулой:



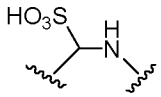
или его фармацевтически приемлемой соли; и (b) приведения в контакт модифицированного цитотоксического агента со связывающим EpCAM агентом (например, антителом к EpCAM, связывающим EpCAM фрагментом антитела или активируемым антителом к EpCAM, описанном в данном документе), описанным в данном документе, с образованием иммуноконъюгата.

[00347] В 1-м аспекте для способа, описанного выше, реакцию стадии (a) проводят при pH от 1,9 до 5,0. Более конкретно, pH составляет от 2,5 до 4,9, от 1,9 до 4,8, от 2,0 до 4,8, от 2,5 до 4,5, от 2,9 до 4,5, от 2,9 до 4,0, от 2,9 до 3,7, от 3,1 до 3,5 или от 3,2 до 3,4. В другом конкретном варианте осуществления реакцию стадии (a) проводят при pH 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 3,6, 3,7, 3,8, 3,9, 4,0, 4,1, 4,2, 4,3, 4,5, 4,6, 4,7, 4,8, 4,9 или 5,0. В еще одном конкретном варианте осуществления реакцию стадии (a) проводят при pH 3,3. В контексте настоящего документа конкретное значение pH означает конкретное значение ± 0,05.

[00348] В некоторых вариантах осуществления реакцию стадии (a) проводят в присутствии буферного раствора. В предлагаемых способах можно использовать любой подходящий буферный раствор, известный в данной области техники. Подходящие буферные растворы включают, например, но не ограничиваются ими, цитратный буфер,

ацетатный буфер, сукцинатный буфер, фосфатный буфер, глицинсодержащий буфер (например, глицин-HCl-буфер), фталатный буфер (например, буферный раствор, содержащий гидрофталат натрия или калия) и их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой сукцинатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буферный раствор представляет собой фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитрат-фосфатный буфер. В некоторых вариантах осуществления буфер представляет собой цитрат-фосфатный буфер, содержащий лимонную кислоту и Na2HPO4. В других вариантах осуществления буфер представляет собой цитрат-фосфатный буфер, содержащий лимонную кислоту и K2HPO4. В некоторых вариантах осуществления концентрация буферного раствора, описанного выше, может находиться в диапазоне от 10 до 250 мМ, от 10 до 200 мМ, от 10 до 150 мМ, от 10 до 100 мМ, от 25 до 100 мМ, от 25 до 75 мМ, от 10 до 50 мМ или от 20 до 50 мМ.

[00349] Во 2-м аспекте стадия реакции (a) проводится в отсутствие буферного раствора (например, буферов, описанных в 1-м аспекте). В некоторых вариантах осуществления настоящий способ включает стадии: (a) приведения в контакт иминного фрагмента в иминсодержащем цитотоксическом агенте, имеющем реакционноспособную к тиолу группу, описанную выше (т.е. формулы (C1a'), (C1a'1), (C1b '), (C1b'1), (C2a"), (C2a"1), (C2b") или (C2b"1), где двойная линия между N и C представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H) с диоксидом серы, бисульфитной солью или метабисульфитной солью в водном растворе с образованием модифицированного цитотоксического агента, содержащего модифицированный иминный фрагмент, представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемой соли, где водный раствор не содержит буфер; и (b) приведения в контакт модифицированного цитотоксического агента со связывающим EpCAM агентом (например, антителом к EpCAM, связывающим EpCAM фрагментом антитела или активируемым антителом к EpCAM, описанным в данном документе), описанным в данном документе, с образованием иммуноконъюгата. В некоторых вариантах осуществления реакцию стадии (a) проводят в смеси органического растворителя и воды. Более конкретно, реакцию стадии (a) проводят в смеси диметилацетамида (DMA) и воды. В некоторых вариантах осуществления смесь DMA и воды содержит менее 60% DMA по объему. Более конкретно, объемное соотношение DMA и воды составляет 1:1.

[00350] В 3-м аспекте для способов, описанных выше или в 1-м или 2-м аспекте, от 0,5 до 5,0 эквивалентов бисульфитной соли или 0,25 или 2,5 эквивалента метабисульфитной соли используют на каждый 1 эквивалент иминсодержащего цитотоксического агента в реакции стадии (a). В некоторых вариантах осуществления от 0,5 до 4,5, от 0,5 до 4,0, от 0,5 до 3,5, от 0,5 до 4,0, от 0,5 до 3,5, от 0,5 до 3,0, от 0,5 до 2,5, от 0,8 до 2,0, от 0,9 до 1,8, от 1,0 до 1,7, от 1,1 до 1,6 или от 1,2 до 1,5 эквивалента соли бисульфита или от 0,25 до 2,25, от 0,25 до 2,0, от 0,25 до 1,75, от 0,25 до 2,0, от 0,25 до 1,75, от 0,25 до 1,5, от 0,25 до 1,25, от 0,4 до 1,0, от 0,45 до 0,9, от 0,5 до 0,85, от 0,55 до 0,8 или от 0,6 до 0,75 эквивалента метабисульфитной соли используют на каждый 1 эквивалент иминсодержащего цитотоксического агента. В других вариантах осуществления 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,1, 1,2, 1,3 1,4, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, 1,9, 2,0, 2,1, 2,2, 2,3, 2,4, 2,5, 2,6, 2,7, 2,8, 2,9, 3,0, 3,1, 3,2, 3,3, 3,4, 3,5, 4,0, 4,5 или 5,0 эквивалентов соли бисульфита или 0,25, 0,3, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7, 0,75, 0,8, 0,85, 0,9, 0,95, 1,0, 1,05, 1,1, 1,15, 1,2, 1,25, 1,3, 1,35, 1,4, 1,45, 1,5, 1,55, 1,6, 1,65, 1,7, 1,75, 2,0, 2,25 или 2,5 эквивалента метабисульфитной соли используют на каждый 1 эквивалент иминсодержащего цитотоксического агента. В еще других вариантах осуществления 1,4 эквивалента бисульфитной соли или 0,7 эквивалента метабисульфитной соли используют на каждый 1 эквивалент иминсодержащего цитотоксического агента. В других вариантах осуществления 1,2 эквивалента бисульфитной соли или 0,6 эквивалента метабисульфитной соли используют на каждый 1 эквивалент иминсодержащего цитотоксического агента. Используемый в данном документе конкретный эквивалент означает конкретное значение ± 0,05.

[00351] В 4-м аспекте для способов, описанных выше, реакцию стадии (a) проводят при pH от 2,9 до 3,7, и от 1,0 до 1,8 эквивалента бисульфитной соли или от 0,5 до 0,9 эквивалента метабисульфитной соли вводят в реакцию с 1 эквивалентом иминсодержащего цитотоксического агента. В некоторых вариантах осуществления реакцию стадии (a) проводят при pH от 3,1 до 3,5 и от 1,1 до 1,6 эквивалента бисульфитной соли или от 0,55 до 0,8 эквивалента метабисульфитной соли приводят в контакт с 1 эквивалентом иминсодержащего цитотоксического агента. В других вариантах осуществления реакцию стадии (a) проводят при pH от 3,2 до 3,4 и от 1,3 до 1,5 эквивалента бисульфитной соли или от 0,65 до 0,75 эквивалента метабисульфита приводят в контакт с 1 эквивалентом иминсодержащего цитотоксического агента. В других вариантах осуществления реакцию стадии (a) проводят при pH от 3,3 и 1,4 эквивалента бисульфитной соли или 0,7 эквивалента метабисульфитной соли приводят в контакт с 1 эквивалентом иминсодержащего цитотоксического агента. В еще других вариантах

осуществления реакцию стадии (а) проводят при pH от 3,3 и 1,4 эквивалента бисульфита натрия приводят в контакт с 1 эквивалентом иминсодержащего цитотоксического агента.

[00352] В 5-м аспекте для способов, описанных выше или в 1-м, 2-м, 3-м или 4-м аспекте, реакцию стадии (а) проводят в смеси органического растворителя и воды. Можно использовать любой подходящий органический растворитель. Типичные органические растворители включают, но не ограничиваются ими, спирты (например, метанол, этанол, пропанол и т. д.), диметилформамид (ДМФА), диметилсульфоксид (ДМСО), ацетонитрил, ацетон, метиленхлорид и т. д. В некоторых вариантах осуществления органический растворитель поддается смешиванию с водой. В других вариантах осуществления органический растворитель не поддается смешиванию с водой, т. е. реакцию стадии (а) проводят в двухфазном растворе. В некоторых вариантах осуществления органический растворитель представляет собой диметилацетамид (DMA). Органический растворитель (например, DMA) может присутствовать в количестве 1-99%, 1-95%, 10-80%, 20-70%, 30-70%, 1-60%, 5-60%, 10-60%, 20-60%, 30-60%, 40-60%, 45-55%, 10-50% или 20-40% по объему от общего объема воды и органического растворителя. В некоторых вариантах осуществления реакцию стадии (а) проводят в смеси DMA и воды, где объемное соотношение DMA и воды составляет 1:1.

[00353] В 6-м аспекте для способов, описанных выше или в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м или 5-м аспекте, реакцию стадии (а) можно проводить при любой подходящей температуре. В некоторых вариантах осуществления реакцию проводят при температуре от 0 °C до 50 °C, от 10 °C до 50 °C, от 10 °C до 40 °C или от 10 °C до 30 °C. В других вариантах осуществления реакцию проводят при температуре от 15°C до 30°C, от 20°C до 30°C, от 15°C до 25°C, от 16°C до 24°C, от 17°C до 23°C, от 18°C до 22°C или от 19°C до 21°C. В еще других вариантах осуществления реакцию можно проводить при 15 °C, 16 °C, 17 °C, 18 °C, 19 °C, 20 °C, 21 °C, 22 °C, 23 °C, 24 °C или 25 °C. В некоторых вариантах осуществления реакцию можно проводить при температуре от 0 °C до 15 °C, от 0 °C до 10 °C, от 1 °C до 10 °C, от 5 °C до 15 °C или от 5 °C до 10 °C.

[00354] В 7-ом аспекте для способов, описанных выше, или в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м или 6-м аспекте, реакцию стадии (а) проводят от 1 минуты до 48 часов, от 5 минут до 36 часов, от 10 минут до 24 часов, от 30 минут до 24 часов, от 30 минут до 20 часов, от 1 часа до 20 часов, от 1 часа до 15 часов, от 1 часа до 10 часов, от 2 часов до 10 часов, от 3 часов до 9 часов, от 3 часов до 8 часов, от 4 часов до 6 часов или от 1 часа до 4 часов. В некоторых вариантах осуществления реакции позволяют продолжаться от 4 до 6 часов. В других вариантах осуществления реакции позволяют протекать в течение 10 минут, 15 минут, 20 минут, 30 минут, 1 часа, 2 часов, 3 часов, 4 часов, 5 часов, 6 часов, 7 часов, 8

часов, 9 часов, 10 часов, 11 часов, 12 часов, 13 часов, 14 часов, 15 часов и т. д. В других вариантах осуществления реакции позволяют протекать в течение 4 часов. В еще других вариантах осуществления реакции позволяют продолжаться в течение 2 часов.

[00355] В 8-м аспекте для способов, описанных в данном документе или в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м, 6-м или 7-м аспекте, реакцию стадии (b) проводят при pH от 4 до 9. В некоторых вариантах осуществления реакцию стадии (b) проводят при pH от 4,5 до 8,5, от 5 до 8,5, от 5 до 8, от 5 до 7,5, от 5 до 7, от 5 до 6,5 или от 5,5 до 6,5. В других вариантах осуществления реакцию стадии (b) проводят при pH 5,0, 5,1, 5,2, 5,3, 5,4, 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4, 6,5, 6,6, 6,7, 6,8, 6,9, 7,0, 7,1, 7,2, 7,3, 7,4, 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9, или 8,0.

[00356] В некоторых вариантах осуществления для способов, описанных выше или в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м или 8-м аспектах, реакцию стадии (b) проводят в водном растворе, содержащем смесь воды и органического растворителя. Можно использовать любой подходящий органический растворитель, описанный выше. Более конкретно, органическим растворителем является DMA. В некоторых вариантах осуществления водный раствор содержит менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 25%, менее чем 20%, менее чем 15%, менее чем 10%, менее чем 5%, менее чем 3%, менее чем 2% или менее чем 1% органического растворителя (например, DMA) по объему.

[00357] В некоторых вариантах осуществления для способов, описанных в данном документе или в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м или 8-м аспектах, бисульфитная соль представляет собой бисульфит натрия или калия, а метабисульфитная соль представляет собой метабисульфит натрия или калия. В конкретном варианте осуществления бисульфитная соль представляет собой бисульфит натрия, а метабисульфитная соль представляет собой метабисульфит натрия.

[00358] В некоторых вариантах осуществления для способов, описанных в данном документе или в 1-м, 2-м, 3-м, 4-м, 5-м, 6-м, 7-м или 8-м аспектах, модифицированный цитотоксический агент не очищается перед приведением в контакт со связывающим клетки агентом на стадии (b). В альтернативном варианте, модифицированный цитотоксический агент очищают перед реакцией со связывающим клетки агентом на стадии (b). Любые подходящие способы, описанные в данном документе, могут быть использованы для очистки модифицированного цитотоксического агента.

[00359] В некоторых вариантах осуществления для способов, описанных выше, реакция на стадии (a) не приводит к существенному сульфированию малеимидной

группы. В некоторых вариантах осуществления менее чем 50%, 40%, 30%, 20%, 10%, 9%, 8%, 7%, 6%, 5%, 4%, 3%, 2% или 1% малеимидной группы является сульфированной. Процент сульфирования малеимида равен общему количеству малеимид-сульфированного цитотоксического агента (цитотоксический агент, имеющий сульфирование только на малеимиде) и дисульфированного цитотоксического агента (цитотоксический агент, имеющий сульфирование как на малеимидной, так и на иминной составляющих), деленному на исходное количество иминсодержащего цитотоксического агента перед его реакцией с бисульфитной солью или бисульфитной солью.

[00360] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты, полученные любыми способами, описанными выше, подлежат стадии очистки. В этом отношении иммуноконъюгат может быть очищен от других компонентов смеси с использованием фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), неадсорбционной хроматографии, адсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, селективного осаждения или любого другого подходящего процесса очистки, а также их комбинации.

[00361] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат очищают с использованием одной стадии очистки (например, TFF). Предпочтительно, конъюгат очищают и заменяют на соответствующий состав, используя одну стадию очистки (например, TFF). В других вариантах осуществления иммуноконъюгат очищают с использованием двух последовательных стадий очистки. Например, иммуноконъюгат может быть сначала очищен селективным осаждением, адсорбционной фильтрацией, абсорбционной хроматографией или неабсорбционной хроматографией с последующей очисткой с помощью TFF. Специалист в данной области техники поймет, что очистка иммуноконъюгата позволяет выделить стабильный конъюгат, содержащий связывающий клетки агент, химически связанный с цитотоксическим агентом.

[00362] Для очистки могут использоваться любые подходящие системы TFF, включая систему типа Pellicon (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс), кассетную систему Sartocon (Sartorius AG, Эджвуд, штат Нью-Йорк) и систему типа Centrasette (Pall Corp., Ист-Хиллз, штат Нью-Йорк.)

[00363] Любая подходящая адсорбционная хроматографическая смола может быть использована для очистки. Предпочтительные адсорбционные хроматографические смолы включают хроматографию на гидроксиапатите, гидрофобную хроматографию с индуцированием заряда (HCIC), хроматографию с гидрофобным взаимодействием (HIC), ионообменную хроматографию, ионообменную хроматографию в смешанном режиме, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных металлов (IMAC),

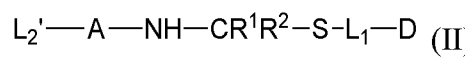
хроматографию с красителем-лигандом, аффинную хроматографию, хроматографию с обращенной фазой и их комбинации. Примеры подходящих гидроксиапатитовых смол включают керамический гидроксиапатит (CHT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния), гидроксиапатит HA Ultrogel (Pall Corp., Ист-Хиллз, штат Нью-Йорк) и керамический фторапатит (CFT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примером подходящей смолы HCIC является смола MEP Hypercel (Pall Corp., Ист-Хиллз, штат Нью-Йорк). Примеры подходящих смол HIC включают бутилсефарозу, гексилсефарозу, фенилсефарозу и октилсефарозу (все от GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), а также макропрепараты метиловых и макропрепараты трет-бутиловых смол (Biorad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих ионообменных смол включают SP-сефарозу, CM-сефарозу и Q-сефарозу (все от GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и смолу Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих ионообменников смешанного режима включают смолу Bakerbond CBAx (JT Baker, Филлипсбург, штат Нью-Джерси). Примеры подходящих смол IMAC включают хелатообразующую сефарозную смолу (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и смолу Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих смол на основе красителей-лигандов включают смолу Blue Sepharose (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и смолу Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих аффинных смол включают протеин A-сефарозную смолу (например, MabSelect, GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), когда связывающий клетки агент, представляет собой антитело, и лектиновые аффинные смолы, например, смолу Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), когда связывающий клетки агент, несет соответствующие сайты связывания лектина. В альтернативном варианте можно использовать антитело, специфичное к связывающему клетки агенту. Такое антитело может быть иммобилизовано, например, на смоле Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, N.J.). Примеры подходящих смол с обращенной фазой включают смолы C4, C8 и C18 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.).

[00364] Любая подходящая неадсорбционная хроматографическая смола может быть использована для очистки. Примеры подходящих смол для неадсорбционной хроматографии включают, но не ограничиваются ими, смолы SEPHADEX™ G-25, G-50, G-100, SEPHACRYL™ (например, S-200 и S-300), смолы SUPERDEX™ (например, SUPERDEX™ 75 и SUPERDEX™ 200), смолы BIO-GEL® (например, P-6, P-10, P-30, P-60 и P-100) и другие, известные специалистам в данной области техники.

[00365] Иммуноконъюгаты, содержащие EpBA, ковалентно связанный с

соединением майтанзиноидом, описанным в 3-м варианте осуществления, могут быть получены любыми подходящими способами, известными в данной области техники.

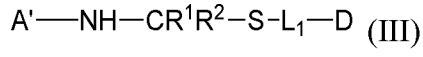
[00366] В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгаты могут быть получены первым способом, включающим стадии приведения в контакт EpBA с соединением майтанзиноидом формулы (II):



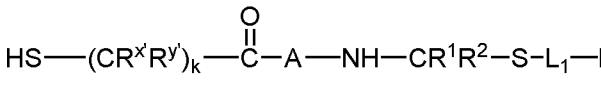
(II).

[00367] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты можно получить вторым способом, включающим стадии:

(a) приведения в контакт соединения майтанзиноида формулы (III) или (IV) с линкерным соединением, описанным в данном документе, с образованием соединения цитотоксический агент-майтанзиноид, имеющего реакционноспособную к амину группу или связанную с ним реакционноспособную к тиолу группу, которая может быть ковалентно связана с EpBA, где формулы (III) и (IV) представлены:



(III)



(IV); и

(b) приведения в контакт EpBA с соединением майтанзиноид-линкер с образованием иммуноконъюгата.

[00368] В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгаты можно получить третьим способом, включающим стадии:

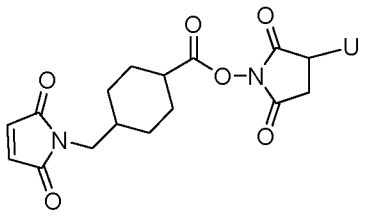
(a) приведения в контакт EpBA с линкерным соединением, описанным в данном документе, с образованием модифицированного анти-EpBA, имеющего реакционноспособную к амину группу или реакционноспособную к тиолу группу, связанную с ним (например, соединение формулы (II)), которое может быть ковалентно связана с соединением майтанзиноидом формулы (III) или (IV); и

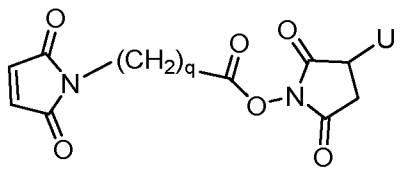
(b) приведения в контакт модифицированного EpBA с соединением майтанзиноидом формулы (III) или (IV) с образованием иммуноконъюгата.

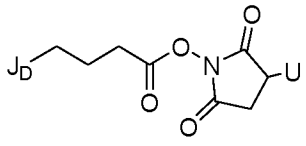
[00369] В определенных вариантах осуществления иммуноконъюгаты могут быть получены третьим способом, включающим приведение в контакт EpBA, линкерного соединения и соединения майтанзиноида формулы (III) или (IV) с образованием иммуноконъюгатов. В одном варианте осуществления сначала смешивают EpBA и соединение майтанзиноид формулы (III) или (IV) с последующим добавлением линкерного соединения.

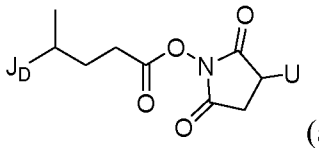
[00370] В определенных вариантах осуществления для второго, третьего или

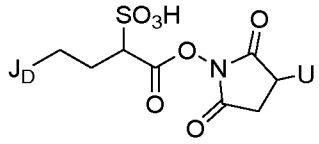
четвертого способов, описанных выше, линкерное соединение представлено любой одной из формул (a1L) - (a10L):

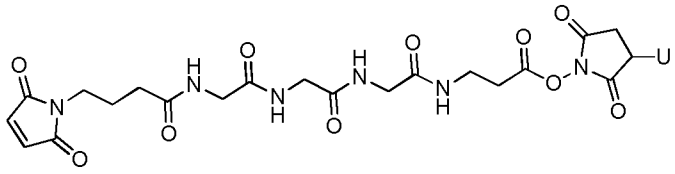

(a1L);

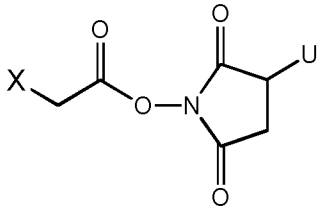

(a2L);

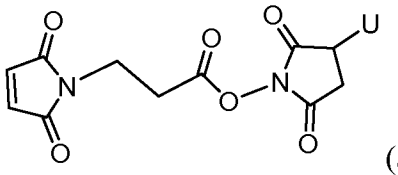

(a3L);

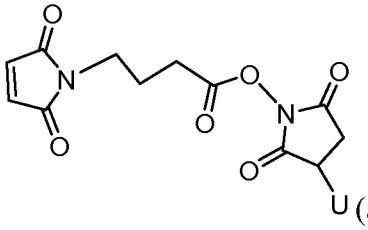

(a4L);

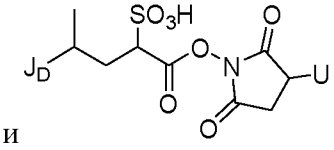

(a5L),


(a6L),


(a7L);


(a8L);

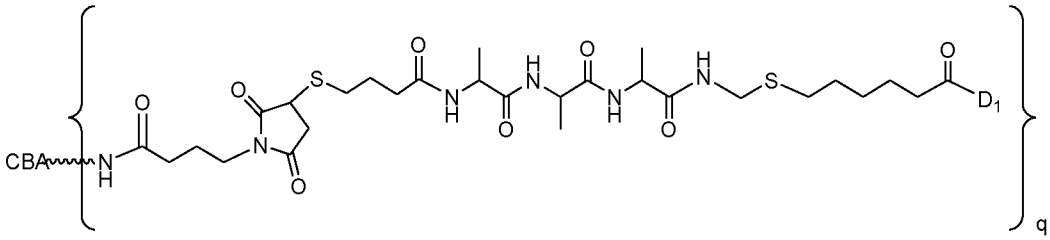

(a9L); и


(a10L),

где X представляет собой галоген; J_D –SH, или –SSR^d; R^d представляет собой фенил, нитрофенил, динитрофенил, карбоксинитрофенил, пиридил или нитропиридил; R^g представляет собой алкил; и U представляет собой –H или SO_3H или его фармацевтически приемлемая соль.

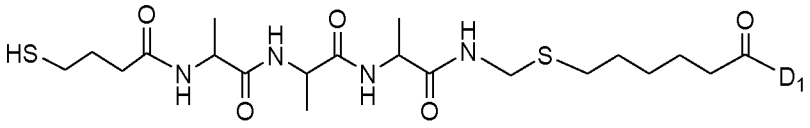
[00371] В одном варианте осуществления линкерное соединение представляет собой GMBS или сульфо-GMBS, представленные формулой (a9L), где U представляет собой –H или SO_3H, или его фармацевтически приемлемая соль.

[00372] В конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат по настоящему изобретению представлен следующей формулой:



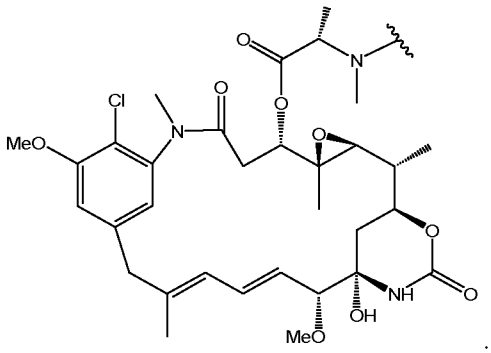
(I-1); и

иммуноконъюгат может быть получен вторым, третьим или четвертым способом, описанным выше, где линкерное соединение представляет собой GMBS или сульфо-GMBS, представленный формулой (a9L), где U представляет собой –H или SO_3H, или его фармацевтически приемлемая соль; и соединение майтанзиноид представлено формулой (D-1):



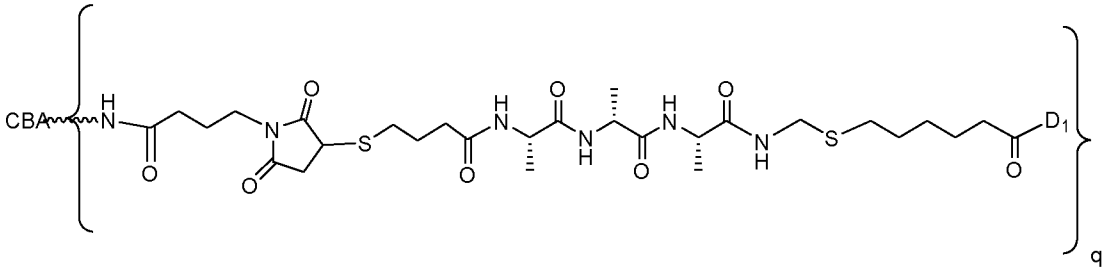
(D-1),

где D_1 представлен следующей формулой:



В более конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат формулы (I-1) получают приведением в контакт соединения майтанзиноида формулы (D-1) с линкерным соединением GMBS или сульфо-GMBS с образованием соединения майтанзиноид-линкер с последующим приведением в контакт EpBA с соединением майтанзиноид-линкер. В еще более конкретном варианте осуществления соединение майтанзиноид-линкер не очищают перед приведением в контакт с EpBA.

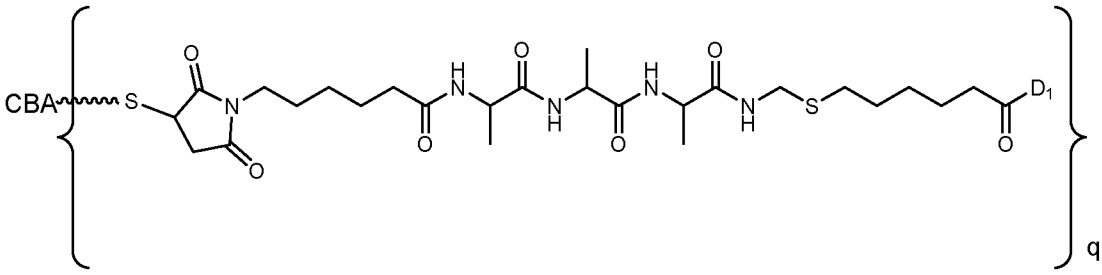
[00373] В более конкретном варианте осуществления модифицированный цитотоксический агент представлен следующей формулой:



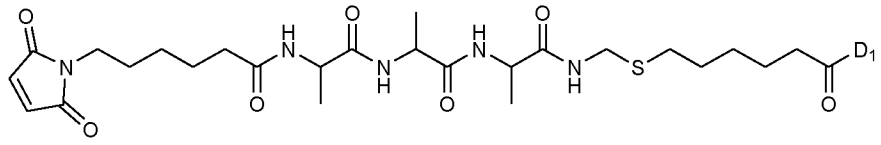
(I-2); и иммуноконъюгат может быть получен вторым, третьим или четвертым способом,

описанным выше, где линкерное соединение представляет собой GMBS или сульфо-GMBS, представленный формулой (a9L), где U представляет собой –H или SO_3H, или его фармацевтически приемлемая соль; и соединение майтанзиноид представлено формулой (D-2), описанной выше. В более конкретном варианте осуществления иммуноконъюгат формулы (I-2) получают приведением в контакт соединения майтанзиноида формулы (D-2) с линкерным соединением GMBS или сульфо-GMBS с образованием соединения майтанзиноид-линкер с последующим приведением в контакт EpBA с соединением майтанзиноид-линкер. В еще более конкретном варианте осуществления соединение майтанзиноид-линкер не очищают перед приведением в контакт с EpBA.

[00374] В более конкретном варианте осуществления модифицированный цитотоксический агент представлен следующей формулой:

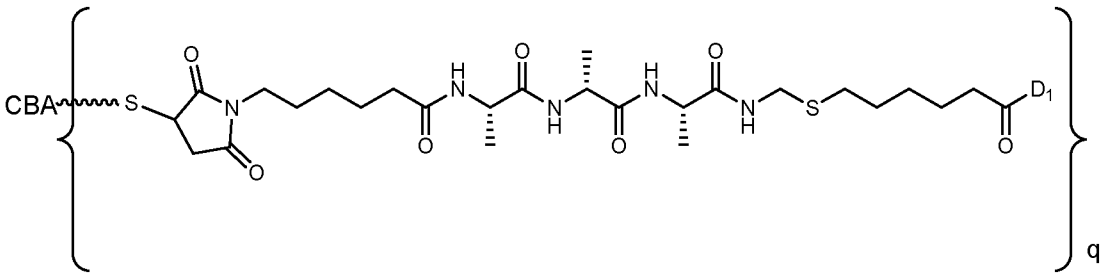


(I-3); и иммуноконъюгат получают согласно первому способу, описанному выше, путем приведения в контакт EpBA с соединением майтанзиноидом формулы (D-3):

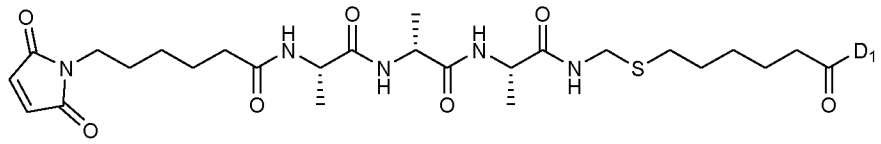


(D-3).

[00375] В более конкретном варианте осуществления модифицированный цитотоксический агент представлен следующей формулой:

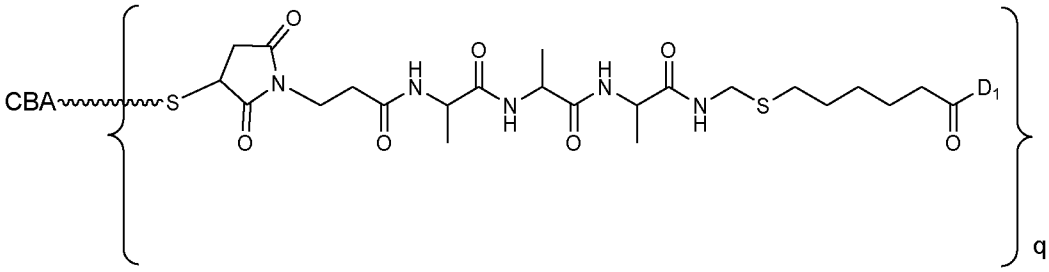


(I-4); и иммуноконъюгат получают согласно первому способу, описанному выше, путем приведения в контакт EpBA с соединением майтанзиноидом формулы (D-4):



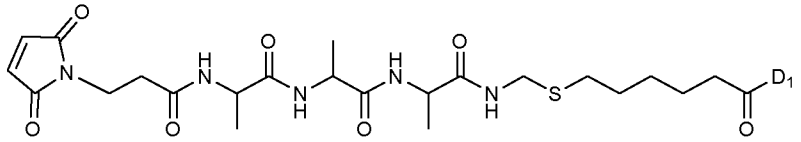
(D-4).

[00376] В более конкретном варианте осуществления модифицированный цитотоксический агент представлен следующей формулой:



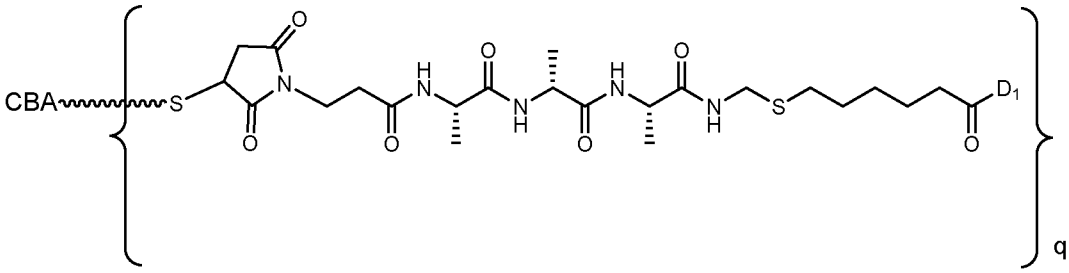
(I-5); и

иммуноконъюгат получают согласно первому способу, описанному выше, путем приведения в контакт EpBA с соединением майтанзиноидом формулы (D-5):



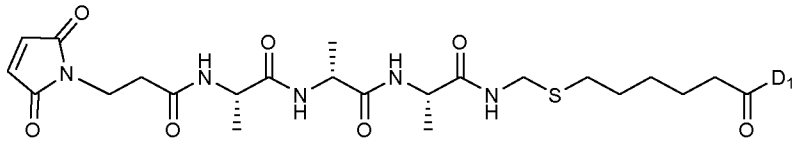
(D-5).

[00377] В более конкретном варианте осуществления модифицированный цитотоксический агент представлен следующей формулой:



(I-6);

и иммуноконъюгат получают согласно первому способу, описанному выше, путем приведения в контакт EpBA с соединением майтанзиноидом формулы (D-6):



(D-6).

[00378] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгаты, полученные любыми способами, описанными выше, подлежат стадии очистки. В этом отношении иммуноконъюгат может быть очищен от других компонентов смеси с использованием фильтрации в тангенциальном потоке (TFF), неадсорбционной хроматографии, адсорбционной хроматографии, адсорбционной фильтрации, селективного осаждения или любого другого подходящего процесса очистки, а также их комбинации.

[00379] В некоторых вариантах осуществления иммуноконъюгат очищают с использованием одной стадии очистки (например, TFF). Предпочтительно, конъюгат очищают и заменяют на соответствующий состав, используя одну стадию очистки

(например, TFF). В других вариантах осуществления изобретения иммуноконъюгат очищают с использованием двух последовательных стадий очистки. Например, иммуноконъюгат может быть сначала очищен селективным осаждением, адсорбционной фильтрацией, абсорбционной хроматографией или неабсорбционной хроматографией с последующей очисткой с помощью TFF. Специалист в данной области техники поймет, что очистка иммуноконъюгата позволяет выделить стабильный конъюгат, содержащий связывающий клетки агент, химически связанный с цитотоксическим агентом.

[00380] Для очистки могут использоваться любые подходящие системы TFF, включая систему типа Pellicon (Millipore, Биллерика, штат Массачусетс), кассетную систему Sartocon (Sartorius AG, Эджвуд, штат Нью-Йорк) и систему типа Centrasette (Pall Corp., Ист-Хиллз, штат Нью-Йорк.)

[00381] Любая подходящая адсорбционная хроматографическая смола может быть использована для очистки. Предпочтительные адсорбционные хроматографические смолы включают хроматографию на гидроксиапатите, гидрофобную хроматографию с индуцированием заряда (HCIC), хроматографию с гидрофобным взаимодействием (HIC), ионообменную хроматографию, ионообменную хроматографию в смешанном режиме, аффинную хроматографию с использованием иммобилизованных металлов (IMAC), хроматографию с красителем-лигандом, аффинную хроматографию, хроматографию с обращенной фазой и их комбинации. Примеры подходящих гидроксиапатитовых смол включают керамический гидроксиапатит (CHT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния), гидроксиапатит HA Ultrogel (Pall Corp., Ист-Хиллз, штат Нью-Йорк) и керамический фторапатит (CFT типа I и типа II, Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примером подходящей смолы HCIC является смола MEP Hypercel (Pall Corp., Ист-Хиллз, штат Нью-Йорк). Примеры подходящих смол HIC включают бутилсефарозу, гексилсефарозу, фенилсефарозу и октилсефарозу (все от GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), а также макропрепараты метиловых и макропрепараты трет-бутиловых смол (Biorad Laboratories, штат Калифорния). Примеры подходящих ионообменных смол включают SP-сефарозу, CM-сефарозу и Q-сефарозу (все от GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и смолу Unosphere S (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих ионообменников смешанного режима включают смолу Bakerbond ABx (JT Baker, Филлипсбург, штат Нью-Джерси). Примеры подходящих смол IMAC включают хелатообразующую сефарозную смолу (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси) и смолу Profinity IMAC (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих смол на основе красителей-лигандов включают смолу Blue Sepharose (GE Healthcare, Пискатауэй, штат

Нью-Джерси) и смолу Affi-gel Blue (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, штат Калифорния). Примеры подходящих аффинных смол включают протеин А-сефарозную смолу (например, MabSelect, GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), когда связывающий клетки агент, представляет собой антитело, и лектиновые аффинные смолы, например, смолу Lentil Lectin Sepharose (GE Healthcare, Пискатауэй, штат Нью-Джерси), когда связывающий клетки агент, несет соответствующие сайты связывания лектина. В альтернативном варианте можно использовать антитело, специфичное к связывающему клетки агенту. Такое антитело может быть иммобилизовано, например, на смоле Sepharose 4 Fast Flow (GE Healthcare, Piscataway, N.J.). Примеры подходящих смол с обращенной фазой включают смолы C4, C8 и C18 (Grace Vydac, Hesperia, Calif.).

[00382] Любая подходящая неадсорбционная хроматографическая смола может быть использована для очистки. Примеры подходящих смол для неадсорбционной хроматографии включают, но не ограничиваются ими, смолы SEPHADEXTM G-25, G-50, G-100, SEPHACRYLTM (например, S-200 и S-300), смолы SUPERDEXTM (например, SUPERDEX TM 75 и SUPERDEXTM 200), смолы BIO-GEL® (например, P-6, P-10, P-30, P-60 и P-100) и другие, известные специалистам в данной области техники.

Применение в диагностических и исследовательских целях

[00383] В дополнение к терапевтическим применениям антител, обсуждаемых в данном документе, фрагменты антител и активируемые антитела, представленные в данном документе, могут быть использованы во многих известных применениях в диагностических и исследовательских целях. Предложенные антитела к EpCAM и/или связывающие EpCAM фрагменты антител можно использовать, например, для очистки, обнаружения и нацеливания на EpCAM, включенных в диагностические методы как in vitro и in vivo. Например, антитела и/или фрагменты можно использовать в иммуноанализах для качественного и количественного измерения уровней EpCAM (например, EpCAM человека или EpCAM яванского кролика), экспрессируемых клетками в биологических образцах. См., например, Harlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988), полное содержание которого включено в данный документ посредством ссылки.

[00384] Предложенные антитела к EpCAM и/или связывающие EpCAM фрагменты антител могут использоваться, например, в анализах конкурентного связывания, прямых и непрямых сэндвич-анализах и анализах иммунопреципитации (Zola, Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

[00385] Обнаруживаемое мечение антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела и/или активируемого антитела к EpCAM может осуществляться путем

связывания с ферментом для использования в иммуноферментном анализе (EIA) или твердофазном иммуноферментном анализе (ИФА). Связанный фермент реагирует с обнаженным субстратом с образованием химического фрагмента, который может быть обнаружен, например, спектрофотометрическими, флуориметрическими или визуальными методами. Ферменты, которые можно использовать для детектируемого мечения, например, описанных антител к EpCAM, связывающих EpCAM фрагментов антител и активируемых антител к EpCAM, включают, но не ограничиваются ими, малатдегидрогеназу, стафилококковую нуклеазу, дельта-5-стероид-изомеразу, дрожжевую алкогольдегидрогеназу, альфа-глицерофосфатдегидрогеназу, триозофосфат-изомеразу, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу, аспарагиназу, глюкозооксидазу, бета-галактозидазу, рибонуклеазу, уреазу, каталазу, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназу, глюкоамилазу и ацетилхолинэстеразу.

[00386] Путем радиоактивного мечения антител к EpCAM, связывающих EpCAM фрагментов антител и активируемых антител к EpCAM можно обнаружить EpCAM с помощью радиоиммуноанализа (РИА) (см., например, Work, et al., Laboratory Techniques and Biochemistry in Molecular Biology, North Holland Publishing Company, N.Y. (1978)). Радиоактивный изотоп может быть обнаружен с помощью таких средств, как использование гамма-счетчика или сцинтилляционного счетчика или авторадиографии. Изотопами, которые особенно полезны для целей настоящего изобретения, являются: ^{3}H, ^{125}I, ^{131}I, ^{35}S, ^{14}C, и, предпочтительно, ^{125}I.

[00387] Также возможно пометить антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела к EpCAM флуоресцентным соединением. Когда флуоресцентно меченное антитело, фрагмент антитела или активируемое антитело подвергается воздействию света с соответствующей длиной волны, его присутствие затем может быть обнаружено по флуоресценции. К наиболее часто используемым флуоресцентным метящим соединениям относятся изотиоцианат флуоресцеина, родамин, фикоэритрин, фикоцианин, аллофикоцианин, о-фтальдегид и флуорескамин.

[00388] Антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела к EpCAM также могут быть помечены детектируемой меткой с использованием излучающих флуоресценцию металлов, таких как 125Eu или других металлов из ряда лантанидов. Эти металлы могут быть присоединены к антителам к EpCAM, связывающим EpCAM фрагментам антител и активируемым антителам к EpCAM с использованием таких хелатирующих металлы групп, как диэтилентриаминпентауксусная кислота (DTPA) или этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА).

[00389] В дополнительных вариантах осуществления антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела к EpCAM обнаруживаемо метят путем связывания с хемилюминесцентным соединением. Присутствие хемилюминесцентно меченного антитела или фрагмента антитела затем определяют путем обнаружения люминесценции, возникающей в ходе химической реакции. Примерами особенно полезных хемилюминесцентных метящих соединений являются люминол, изолюминол, терематический сложный эфир акридиния, имидазол, соль акридиния и сложный эфир щавелевой кислоты. Аналогичным образом, биолюминесцентное соединение можно использовать для мечения антител к EpCAM, связывающих EpCAM фрагментов антител, активируемых антител к EpCAM или их производных. Биолюминесценция - это тип хемилюминесценции, обнаруживаемый в биологических системах, в которых каталитический белок увеличивает эффективность хемилюминесцентной реакции. Присутствие биолюминесцентного белка определяется путем обнаружения люминесценции. Важными биолюминесцентными соединениями для целей мечения являются люциферин, люцифераза и экворин.

[00390] Антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител и активируемые антитела к EpCAM полезны для визуализации in vivo, где антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM, меченные детектируемым фрагментом, таким как рентгеноконтрастный агент или радиоизотоп, вводят субъекту, предпочтительно в кровоток, и исследуют наличие и расположение меченого антитела или фрагмента антитела в организме хозяина. Этот метод визуализации полезен для определения стадии и лечения злокачественных новообразований. Антитело к EpCAM, связывающий EpCAM фрагмент антитела или активируемое антитело к EpCAM могут быть помечены любым фрагментом, который может быть обнаружен в организме хозяина с помощью ядерного магнитного резонанса, радиологии или других способов обнаружения, известных в данной области техники.

[00391] Метка, используемая согласно описанным способам, может быть любым детектируемым фрагментом, который способен прямо или косвенно продуцировать детектируемый сигнал. Например, метка может быть биотиновой меткой, ферментной меткой (например, люциферазой, щелочной фосфатазой, бета-галактозидазой и пероксидазой хрена), радио-меткой (например, ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S, и ^{125}I), флуорофор, такой как флуоресцентное или хемилюминесцентное соединение (например, изотиоцианат флуоресцеина, родамин), визуализирующий агент (например, Tc-m^{99} и индий (^{111}In)) и ион металла (например, галлий и европий).

[00392] Можно использовать любой известный в данной области техники

способ конъюгирования антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM с меткой, включая те иллюстративные способы, которые описаны Hunter et al., Nature 144:945 (1962); David et al., Biochemistry 13:1014 (1974); Pain et al., J. Immunol. Meth. 40:219 (1981); Nygren, Histochem. and Cytochem. 30:407 (1982).

Применение в терапевтических целях

[00393] Также включены способы ингибирования роста клеток, экспрессирующих EpCAM (например, EpCAM человека или EpCAM яванского макака). Как предложено в данном документе, описанные антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител, активируемые антитела к EpCAM и/или их конъюгаты обладают способностью связывать EpCAM, присутствующий на поверхности клетки (например, клетки человека или клетки яванского макака) и опосредуют уничтожение клеток. В конкретных вариантах осуществления иммуноконъюгаты содержат цитотоксическую полезную нагрузку, например, индолинобензодиазепиновый алкилирующий ДНК агент, интернализуются и опосредуют уничтожение клеток посредством активности цитотоксической полезной нагрузки, например, бензодиазепина, например, индолинобензодиазепинового алкилирующего ДНК агента. Такая активность по уничтожению клеток может быть усилена иммуноконъюгатом, индуцирующим антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (АЗКЦ) и/или комплемент-зависимую цитотоксичность (КЗЦ).

[00394] Используемые в данном документе термины «ингибировать» и «ингибирование» включают любое ингибирующее действие на рост клеток, включая гибель клеток. Ингибирующие эффекты включают временные эффекты, устойчивые эффекты и постоянные эффекты.

[00395] Предлагаемые в данном документе применения в терапевтических целях включают способы лечения субъекта, имеющего заболевание. Заболевания, которые лечат предложенными способами, характеризуются экспрессией (например, сверхэкспрессией EpCAM). Такие заболевания включают, например, злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное новообразование яичников, колоректальный рак, злокачественное новообразование толстой кишки, злокачественное новообразование пищевода, злокачественное новообразование трахеи, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование мочевого пузыря, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование прямой кишки или

злокачественное новообразование тонкой кишки, злокачественное новообразование поджелудочной железы или другое злокачественное эпителиальное новообразование или связанные с ними метастазы. Квалифицированный специалист поймет, что способы по настоящему изобретению могут также использоваться для лечения других заболеваний, которые еще не описаны, но характеризуются экспрессией EpCAM.

[00396] В других конкретных вариантах осуществления описанные антитела к EpCAM, связывающие EpCAM фрагменты антител, активируемые антитела к EpCAM и/или их конъюгаты полезны при лечении злокачественных новообразований, экспрессирующих EpCAM. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное эпителиальное новообразование или плоскоклеточный рак. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное новообразование яичников, колоректальный рак, злокачественное новообразование толстой кишки, злокачественное новообразование пищевода, злокачественное новообразование трахеи, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование мочевого пузыря, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование прямой кишки, злокачественное новообразование поджелудочной железы или злокачественное новообразование тонкой кишки.

[00397] Предлагаемые в данном документе применения в терапевтических целях также могут применяться in vitro и ex vivo.

[00398] В изобретении также предложены применения в терапевтических целях описанных антител к EpCAM, связывающих EpCAM фрагментов антител, активируемых антител к EpCAM и/или их конъюгатов, причем антитела, фрагменты антител, активируемые антитела или конъюгаты вводят субъекту в фармацевтической приемлемой дозированной форме. Их можно вводить внутривенно в виде болюса или путем непрерывной инфузии в течение определенного периода времени, внутримышечным, подкожным, парентеральным, внутрисуставным, интрасиновиальным, интратекальным, пероральным, местным или ингаляционным путями. Их также можно вводить внутриопухолевым, перитуморальным, внутриочаговым путями или вводить в области, окружающие очаг поражения, для оказания местных, а также системных терапевтических эффектов.

[00399] Также предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с

аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM у субъекта с использованием активируемых антител к EpCAM, которые связывают EpCAM, в частности активируемых антител к EpCAM, которые связывают и нейтрализуют или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность EpCAM и/или EpCAM-опосредованный сигналинг.

[00400] В некоторых вариантах осуществления в изобретении предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые экспрессируют EpCAM или аберрантно экспрессируют EpCAM у субъекта с использованием активируемых антител к EpCAM, которые связывают EpCAM, в частности активируемых антител к EpCAM, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, которые экспрессируют или аберрантно экспрессируют EpCAM. В изобретении также представлены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования, или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые экспрессируют EpCAM, у субъекта с использованием активируемого антитела к EpCAM, которые связывают EpCAM, особенно активируемые антитела к EpCAM, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, экспрессирующих EpCAM.

[00401] В изобретении также предложены способы лечения, предотвращения и/или отсрочки появления или прогрессирования или облегчения симптома, связанного с присутствием, ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью клеток, которые аберрантно экспрессируют EpCAM, у субъекта с использованием активируемых антител к EpCAM, которые связывают EpCAM, в частности активируемых антител к EpCAM, которые связывают, нацелены, нейтрализуют, уничтожают или иным образом ингибируют по меньшей мере одну биологическую активность клеток, которые аберрантно экспрессируют EpCAM.

[00402] В изобретении предложены способы предотвращения, отсрочки прогрессирования, лечения, облегчения симптомов или иного облегчения опосредованного EpCAM заболевания у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM, описанных в данном документе, субъекту, нуждающемуся в этом.

[00403] В изобретении также предложены способы предотвращения, задержки прогрессирования, лечения, облегчения симптомов или иного улучшения состояния злокачественного новообразования (например, злокачественного эпителиального новообразования и его метастазов) у субъекта путем введения терапевтически эффективного количества антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM, описанного в данном документе, для субъекта, нуждающегося в этом. Известно, что EpCAM экспрессируется при различных формах злокачественных новообразований, включая большинство злокачественных новообразований (и метастазов) эпителиального происхождения.

[00404] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное эпителиальное новообразование или плоскоклеточный рак.

[00405] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное новообразование яичников, колоректальный рак, злокачественное новообразование толстой кишки, злокачественное новообразование пищевода, злокачественное новообразование трахеи, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование мочевого пузыря, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование прямой кишки, злокачественное новообразование поджелудочной железы или злокачественное новообразование тонкой кишки.

[00406] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование желудка, колоректальный рак, злокачественное новообразование толстой кишки, злокачественное новообразование прямой кишки, злокачественное новообразование тонкой кишки, злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование желудка или злокачественное новообразование пищевода.

[00407] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование поджелудочной железы или колоректальный рак.

[00408] В некоторых вариантах осуществления злокачественное

новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников.

[00409] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование матки.

[00410] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование желудка.

[00411] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование поджелудочной железы.

[00412] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак.

[00413] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование молочной железы. В определенных вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

[00414] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование легкого. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого представляет собой неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого.

[00415] Антитело к EpCAM, конъюгированное антитело к EpCAM, активируемое антитело к EpCAM и/или конъюгированное активируемое антитело к EpCAM, используемые в любом из вариантов осуществления этих способов и применений, можно вводить на любой стадии заболевания. Например, такое антитело к EpCAM, конъюгированное антитело к EpCAM, активируемое антитело к EpCAM и/или конъюгированное активируемое антитело к EpCAM можно вводить пациенту, страдающему злокачественным новообразованием любой стадии, от ранней до метастатической. Термины «субъект» и «пациент» используются в данном документе взаимозаменяемо.

[00416] В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой млекопитающее, такое как человек, отличный от человека примат, животное-компаньон (например, кошка, собака, лошадь), сельскохозяйственное животное, рабочее животное или животное из зоопарка. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой человека. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой домашнее животное. В некоторых вариантах осуществления субъект представляет собой

животное, находящееся на попечении ветеринара.

[00417] Антитело к EpCAM, конъюгированное антитело к EpCAM, активируемое антитело к EpCAM и/или конъюгированное активируемое антитело к EpCAM и их терапевтические композиции вводят субъекту, имеющему или подверженному заболеванию или нарушению, связанному с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM, такому как злокачественное новообразование. Субъекта, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, связанному с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, страдающих от злокачественного новообразования или от другого неопластического состояния, идентифицируют с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, имеющие воспаление и/или воспалительное заболевание, идентифицируются с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и/или анализ физиологических жидкостей, например, анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояние здоровья.

[00418] Введение антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM (например, злокачественное новообразование, такой как карцинома) считается успешным, если достигается какая-либо из множества лабораторных или клинических задач. Например, введение антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM, считается успешным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, облегчаются, уменьшаются, ингибируются или не прогрессируют дальше, т. е. до худшего, состояния. Введение антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM, считается успешным, если заболевание или нарушение переходит в стадию ремиссии или не прогрессирует дальше, т. е., до худшего состояния.

[00419] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM,

конъюгированное антитело EpCAM, активируемое антитело к EpCAM и/или конъюгированное активируемое антитело к EpCAM и их терапевтические композиции вводят субъекту, имеющему или подверженному заболеванию или нарушению, например, субъектам, имеющим злокачественное новообразование или другое неопластическое состояние, при котором пораженные клетки субъекта экспрессируют EpCAM. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью EpCAM. Субъекта, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, при котором больные клетки субъекта экспрессируют EpCAM, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, имеющих злокачественное или другое неопластическое состояние, идентифицируют с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, имеющие воспаление и/или воспалительное заболевание, идентифицируются с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и/или анализ физиологических жидкостей, например, анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояние здоровья.

[00420] В некоторых вариантах осуществления антитело к EpCAM, конъюгированное антитело к EpCAM, активируемое антитело к EpCAM и/или конъюгированное активируемое антитело к EpCAM и их терапевтические композиции вводят субъекту, имеющему или предрасположенному к заболеванию или нарушению, связанному с клетками, экспрессирующими EpCAM, или ростом, пролиферацией, метастазированием и/или активностью таких клеток, например, у субъектов, имеющих злокачественное новообразование или другие неопластические состояния. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью EpCAM. Субъекта, имеющего или предрасположенного к заболеванию или нарушению, связанным с клетками, экспрессирующими EpCAM, идентифицируют с использованием любого из множества способов, известных в данной области техники. Например, субъектов, имеющих злокачественного новообразования или другое неопластическое состояние, идентифицируют с помощью любого из множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояния здоровья. Например, субъекты, имеющие воспаление и/или воспалительное заболевание, идентифицируются с помощью любого из

множества клинических и/или лабораторных тестов, таких как физикальное обследование и/или анализ физиологических жидкостей, например, анализ крови, мочи и/или кала для оценки состояние здоровья.

[00421] Введение антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими EpCAM (например, злокачественное новообразование, такое как карцинома), считается успешным, если достигается любая из множества лабораторных или клинических задач. Например, введение антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими EpCAM, считается успешным, если один или более симптомов, связанных с заболеванием или нарушением, облегчаются, уменьшаются, ингибируются или не прогрессирует дальше, то есть до более худшего, состояния. Введение антитела к EpCAM, конъюгированного антитела к EpCAM, активируемого антитела к EpCAM и/или конъюгированного активируемого антитела к EpCAM пациенту, имеющему заболевание или нарушение, связанное с клетками, экспрессирующими EpCAM, считается успешным, если заболевание или нарушение переходит в стадию ремиссии или не прогрессирует дальше, т. е., до худшего, состояния.

[00422] В изобретении предложены антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с EpCAM человека, активируемые антитела к EpCAM и конъюгированные антитела к EpCAM, фрагменты антител или активируемые антитела, которые применимы в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптомов заболевания или нарушения, связанного с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM. Например, активируемые антитела к EpCAM используются в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния.

[00423] В изобретении предложены антитела и фрагменты антител, которые специфически связываются с EpCAM человека, активируемые антитела к EpCAM и конъюгированные антитела к EpCAM, фрагменты антител или активируемые антитела, которые применимы в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптомов заболевания или нарушения, связанного с клетками, экспрессирующими EpCAM. В некоторых вариантах осуществления клетки связаны с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM. В некоторых вариантах

осуществления клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью EpCAM. Например, активируемые антитела к EpCAM можно использовать в способах лечения, предотвращения, отсрочки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния.

[00424] В изобретении предложены антитела и фрагменты антител, которые специфически связывают EpCAM человека, активируемые антитела к EpCAM, конъюгированные антитела и фрагменты антител к EpCAM и/или конъюгированные активируемые антитела к EpCAM, которые полезны в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома заболевания или нарушения, при котором пораженные клетки экспрессируют EpCAM. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с аберрантной экспрессией и/или активностью EpCAM. В некоторых вариантах осуществления пораженные клетки связаны с нормальной экспрессией и/или активностью EpCAM. Например, активируемые антитела к EpCAM используются в способах лечения, предотвращения, задержки прогрессирования, ослабления и/или облегчения симптома злокачественного новообразования или другого неопластического состояния.

Фармацевтические композиции

[00425] Предлагаемые композиции включают нерасфасованные лекарственные композиции, которые можно использовать при производстве фармацевтических композиций (например, нечистых или нестерильных композиций) и фармацевтических композиций (т.е. композиций, которые подходят для введения субъекту или пациенту), которые можно использовать при приготовлении единичных дозированных форм. Такие композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество предложенных иммуноконъюгатов и фармацевтически приемлемый носитель.

[00426] Предпочтительно предлагаемые композиции содержат профилактически или терапевтически эффективное количество описанного иммуноконъюгата и фармацевтически приемлемый носитель.

[00427] В конкретном варианте осуществления термин «фармацевтически приемлемый» обозначает одобренный регуляторным ведомством Федерального правительства или правительством штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения для животных, а более конкретно для человека. Термин «носитель» относится к разбавителю, адъюванту (например, адъюванту Фрейнда (полному и неполному), эксципиенту или носителю, с которым вводят терапевтическое средство. Как правило, ингредиенты предложенных в данном

документе композиций поставляются либо по отдельности, либо в смеси в единичной дозированной форме, например, в виде сухого лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере, таком как ампула или саше, с указанием количества действующего вещества. Когда предполагается введение композиции путем инфузии, ее можно наливать в бутылку для инфузий, содержащую воду или солевой раствор фармацевтического качества. Когда композицию вводят путем инъекции, то может прилагаться ампула стерильной воды для инъекций или солевой раствор, чтобы ингредиенты можно было смешивать перед введением.

[00428] В изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных иммуноконъюгатом, предложенным в данном документе, отдельно или с таким фармацевтически приемлемым носителем. В изобретении также предложена фармацевтическая упаковка или набор, содержащий один или более контейнеров, заполненных одним или более ингредиентами фармацевтических композиций, предложенных в данном документе. При необходимости, могут предоставляться связанные с таким контейнером(ами) уведомление в форме, предписанной правительственным агентством, регулирующим производство, применение или продажу фармацевтических препаратов или биологических продуктов, которое отражает утвержденное агентством по производству, применение или продажу для введения человеку.

[00429] В изобретении предложены наборы, которые можно использовать в вышеуказанных способах. Набор может включать любой из иммуноконъюгатов, описанных в данном документе.

Способы введения

[00430] Описанные композиции могут быть предложены для лечения, профилактики и облегчения одного или более симптомов, связанных с заболеванием, нарушением, путем введения субъекту терапевтически эффективного количества иммуноконъюгата, предложенного в данном документе. В предпочтительном аспекте такие композиции являются по существу очищенными (т.е. практически не содержат веществ, которые ограничивают их действие или вызывают нежелательные побочные эффекты). В конкретном варианте осуществления субъект представляет собой животное, предпочтительно млекопитающее, например, отличное от примата млекопитающее (например, крупный рогатый скот, лошадь, кошку, собаку, грызуна и т. д.) или примат (например, обезьяну, такую как яванский макак, человек и так далее). В предпочтительном варианте субъект представляет собой человека.

[00431] Способы введения иммуноконъюгата, предложенного в данном

документе, включают, но не ограничиваются ими, парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное и слизистое (например, интраназальный и пероральный пути). В конкретном варианте осуществления предлагаемые в данном документе иммуноконъюгаты вводят внутримышечно, внутривенно или подкожно. Композиции можно вводить любым удобным путем, например, инфузией или болюсной инъекцией, и можно вводить вместе с другими биологически активными агентами. Введение может быть системным или местным.

[00432] В изобретении также предусматривается, что препараты описанных иммуноконъюгатов упакованы в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества молекулы. В одном варианте осуществления такие молекулы поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметично закрытом контейнере и могут быть восстановлены, например, водой или физиологическим раствором до подходящей концентрации для введения субъекту. Предпочтительно иммуноконъюгаты поставляются в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере.

[00433] Лиофилизированные препараты иммуноконъюгатов, предложенных в данном документе, следует хранить при температуре от 2 °C до 8 °C в их исходном контейнере, и молекулы следует вводить в течение 12 часов, предпочтительно в течение 6 часов, в течение 5 часов, в течение 3 часов или в течение 1 часа после восстановления. В альтернативном варианте осуществления такие молекулы поставляются в жидкой форме в герметично закрытом контейнере, указывающем количество и концентрацию молекулы, слитого белка или конъюгированной молекулы. Предпочтительно такие иммуноконъюгаты в жидкой форме поставляются в герметично закрытом контейнере.

[00434] Используемый в данном документе термин «терапевтически эффективное количество» фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для достижения положительных или желаемых результатов, включая, без ограничения, клинические результаты, такие как уменьшение симптома злокачественного новообразования (например, пролиферация раковых клеток, наличие опухоли, метастазы опухоли и т. д.), тем самым повышая качество жизни тех, кто страдает этим заболеванием, уменьшая дозу других лекарственных препаратов, необходимых для лечения заболевания, усиливая эффект другого лекарственного препарата, например, посредством нацеливания и/или интернализации, задерживая прогрессирование заболевания и/или увеличивая продолжительность жизни людей.

[00435] Терапевтически эффективное количество можно вводить за одно или более введений. В целях настоящего изобретения терапевтически эффективное количество лекарственного средства, соединения или фармацевтической композиции представляет собой количество, достаточное для уменьшения размножения (или эффекта) вирусов и для уменьшения и/или задержки развития вирусного заболевания, или прямо или косвенно.

Примеры

Пример 1. Получение мышиных моноклональных антител против антигена EpCAM (CD326) человека и яванского макака

[00436] Для создания моноклональных антител против EpCAM человека и яванского макака (cyno) использовали три различных протокола иммунизации. В первом протоколе иммунизации самкам мышей BALB/c дикого типа трижды вводили подкожно линию клеток 300-19, экспрессирующую EpCAM яванского макака, которая является B-клеткой-предшественником, полученной от BALB/c, а затем им дважды вводили линию клеток 300-19, экспрессирующую EpCAM человека. Во втором протоколе иммунизации самкам мышей BALB/c дикого типа четыре раза вводили подкожно линию клеток НМРЛ H1568, а затем четыре раза вводили первичные эпителиальные клетки почки яванского макака. В третьем протоколе иммунизации самкам мышей FcgammaR2b ko/ko BALB/c (модель № 579, Taconic) трижды вводили подкожно клетки 300-19, экспрессирующие EpCAM человека, а затем вводили два раза клетки 300-19, экспрессирующие EpCAM яванского макака. Во всех трех протоколах клетки готовили в PBS и вводили мышам в дозе 5×10^6 клеток/мышь/инъекция с двухнедельным интервалом между инъекциями. Для усиления иммунного ответа антитела против GITR (клон DTA-1) вводили через одну неделю после первой иммунизации. За три дня до умерщвления для получения гибридомы иммунизированные мыши получали внутрибрюшинную инъекцию еще одной дозы клеток 300-19, экспрессирующих EpCAM человека. Селезенки мышей собирали в соответствии со стандартными протоколами для животных и измельчали между двумя стерильными матовыми предметными стеклами для микроскопии для получения суспензии отдельных клеток в среде RPMI-1640. После лизирования эритроцитов лизирующим буфером ACK клетки селезенки затем смешивали с клетками мышиной миеломы P363Ag8.653 (клетки P3) в соотношении 1 клетка P3: 3 клетки селезенки. Смесь клеток селезенки и клеток P3 промывали и обрабатывали проназой в среде для слияния (0,3 M маннит/D-сорбит, 0,1 мМ CaCl2, 0,5 мМ MgCl2 и 1 мг/мл BSA) при комнатной температуре в течение 3 мин. Реакцию останавливали добавлением фетальной бычьей сыворотки (FBS), а затем клетки промывали, ресуспендировали в 2 мл среды для холодного слияния и сливали с

использованием аппарата для электрослияния BTX ECM 2001. Слитые клетки осторожно добавляли в среду для селекции RPMI-1640, содержащую гипоксантин-аминоптерин-тимидин (HAT), инкубировали в течение 20 минут при 37 °C, а затем высевали в десять плоских 96-луночных планшетов по 200 мкл/лунка. Затем планшеты инкубировали в инкубаторе с 5% CO2 при 37 °C до тех пор, пока клоны гибридомы не были готовы для скрининга антител. Также можно использовать другие методы иммунизации и получения гибридом, включая те, которые описаны в J. Langone and H. Vunakis (Eds., Methods in Enzymology, Vol. 121, Immunochemical Techniques, Part I, Academic Press, Florida); and E. Harlow and D. Lane (Antibodies: A Laboratory Manual, 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, NY).

Скрининг и субклонирование гибридом

[00437] Скрининг гибридом выполняли с использованием анализа связывания на основе проточной цитометрии с клетками 300-19, экспрессирующими EpCAM человека, клетками 300-19 клеток дикого типа. Вкратце, клетки 300-19 дикого типа сначала метили CELLTRACE™ далеким красным DDAO-SE, смешивали с необработанными клетками в соотношении 1: 1 и инкубировали с супернатантом гибридомы в течение 2 часов на льду. Затем клетки промывали, инкубировали с меченным ФЭ антителом к IgG мыши, промывали, фиксировали формалином и анализировали с использованием FACS Array. Гибридомы со специфической реактивностью к антигену EpCAM человека размножали, а супернатанты повторно подвергали скринингу с помощью анализа связывания на основе проточной цитометрии с использованием трех отдельных линий клеток: клетки 300-19, экспрессирующие EpCAM человека, клетки 300-19, экспрессирующие EpCAM яванского макака, и клетки 300-19 дикого типа. Гибридомы, положительные по связыванию с антигенами EpCAM человека и яванского макака, но отрицательные по связыванию с клетками 300-19 дикого типа, дополнительно субклонировали путем предельного разведения. Для последующего анализа отбирали по одному субклону от каждой гибридомы, которая показала специфическое связывание с антигенами EpCAM человека и яванского макака.

[00438] Всего в ходе исследования было проведено 20 слияний. Было создано 63 гибридомы, специфичные для антигенов EpCAM человека и яванского макака, а 29 гибридом были субклонированы. Стабильные субклоны культивировали и изотип моноклонального антитела идентифицировали с использованием коммерческих реагентов для изотипирования мышиного IgG.

Очистка мышиных антител

[00439] Отфильтрованный супернатант гибридомных субклонов очищали с

использованием схемы, которая по существу состоит из двух стадий хроматографии: аффинная хроматография на основе белка А и хроматография на керамическом гидроксиапатите (CHT). Вкратце, отфильтрованный супернатант нейтрализовали добавлением 1:10 объема 1 М буфера Трис-HCl (pH 8,0). Нейтрализованный супернатант наносили на колонку с белком А (HiTrap Protein A HP, 1 мл), которую предварительно уравновешивали 1 PBS (pH 7,3 ± 0,1). Колонку промывали 1X PBS (pH 7,3 ± 0,1) для уменьшения неспецифических белков клетки-хозяина. Затем связанное антитело элюировали 25 мМ уксусной кислоты, содержащей 50 мМ хлорида натрия (pH 3,2), и немедленно нейтрализовали 1 М Трис-основания до pH 7,0 ± 0,2. Нейтрализованный пул разбавляли 1:10 в буфере для связывания CHT (15 мМ натрий фосфата, pH 7,0 ± 0,1) и наносили на колонку CHT типа II (размер частиц 40 мкм), предварительно уравновешенную буфером для связывания CHT. Связанный белок затем элюировали с использованием линейного градиента (от 15 мМ до 160 мМ натрий фосфата в 10 объемах колонки), и представляющие интерес фракции (высокий процент мономеров по эксклюзионной хроматографии, ЭХ) объединяли, диализовали против 1X PBS (pH 7,3 ± 0,1), и стерилизовали посредством фильтрации. Конечную концентрацию антител определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм и коэффициента экстинкции 1,44 мл $мг^{-1}$ $см^{-1}$.

[00440] Все эксперименты по очистке проводили в системе для очистки AKTA, которая была оборудована встроенными УФ-датчиками, датчиками проводимости и pH. Анализ методом ЭХ проводили с использованием системы Agilent HPVL 1100 путем инъекции 40 мкг образца в колонку TSKgel G3000SWXL (7,8 x 300 мм), которая также имела встроенную защитную колонку (6,0 x 40 мм) для продления срока службы колонки. Подвижная фаза содержала 50 мМ натрий-фосфатного буфера и 400 мМ перхлората натрия, скорость потока составляла 1,0 мл/мин, а элюирование изократично.

Пример 2: Аффинность связывания мышиных антител к EpCAM

[00441] Аффинность связывания анализировали с помощью анализа связывания на основе проточной цитометрии с использованием очищенного антитела mEpCAM23 (полученного с использованием третьего протокола иммунизации, описанного в Примере 1) и выполняли с клетками HSC2 (Фиг. 1A) или с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака (Фиг. 1B). В анализе связывания 2×10^4 клеток на образец инкубировали с различными концентрациями mEpCAM23 в 200 мкл буфера для FACS (среда RPMI 1640, дополненная 2% нормальной козьей сывороткой) на льду в течение 2 часов. Затем клетки осаждали, дважды промывали и инкубировали в течение 30 мин со 100 мкл козьего антитела к IgG мыши, конъюгированного с ALexa Fluor

Plus 488. Клетки снова осаждали, промывали буфером для FACS и ресуспендировали в 200 мкл PBS, содержащего 1% формальдегида. Образцы получали с помощью проточного цитометра FACSCalibur™ с многолуночным пробоотборником HTS и анализировали с помощью CellQuest™ Pro. Для каждого образца рассчитывали среднюю интенсивность флуоресценции для FL1 и наносили на полулогарифмический график зависимости от концентрации антител. Кривая доза-ответ была построена с помощью нелинейной регрессии, и значение EC_{50} для каждой кривой, которое соответствует кажущейся константе диссоциации (K_d) каждого антитела, было рассчитано с использованием GraphPad Prism v4.

[00442] Как показано на Фиг. 1A и 1B, кажущаяся K_d антитела mEpCAM23 варьировала от $3,8 \times 10^{-10}$ до $7,9 \times 10^{-10}$. Была идентифицирована последовательность mEpCAM23, а клон mEpCAM23 был выбран для химеризации, гуманизации и дальнейшей оценки.

Пример 3. Клонирование и секвенирование VL и VH антител к EpCAM

Клонирование областей V_L и V_H

[00443] Общую клеточную РНК получали из 5×10^6 клеток гибридом EpCAM с использованием набора Quick-RNA® Miniprep в соответствии с протоколом производителя. Затем кДНК синтезировали из общей РНК с использованием набора для синтеза кДНК SuperScript III® в соответствии с инструкциями производителя.

[00444] Процедуры ПЦР для амплификации кДНК вариабельной области антитела, полученных из клеток гибридомы, были основаны на способах, описанных в Wang et al. (J. Immunol. Methods 233:167-177 (2000)) and Co et al. (J. Immunol. 148:1149-54 (1992)). Вкратце, последовательности V_L и V_H амплифицировали вырожденными праймерами на 5’-конце и праймерами, специфичными для константной области каппа или IgG_1 мыши, соответственно, на 3’-конце. Очищенные ампликоны отправляли в Genewiz для секвенирования по Сэнгеру.

[00445] Поскольку вырожденные праймеры, используемые для клонирования последовательностей кДНК V_L и V_H, могут изменять 5’-конец, потребовались дополнительные усилия по секвенированию для проверки полных последовательностей кДНК. Предварительные последовательности вводили в поисковый запрос сайта NCBI IgBlast для идентификации последовательностей зародышевой линии мыши, из которых были получены последовательности антител. Затем конструировали праймеры для ПЦР для отжига с связанной с зародышевой линией лидерной последовательностью мышиного антитела, так, чтобы новая реакция ПЦР давала полную последовательность кДНК вариабельной области, не измененную праймерами для ПЦР.

Определение массы для подтверждения последовательности

[00446] Последовательности кДНК вариабельной области, полученные для каждого из антител к EpCAM, объединяли с последовательностями константной области зародышевой линии для получения последовательностей кДНК полноразмерного антитела. Для подтверждения этих результатов секвенирования молекулярные массы полноразмерных последовательностей кДНК тяжелой и легкой цепей сравнивали с молекулярными массами, полученными с помощью анализов методом ЖХ/МС очищенных мышиных антител к EpCAM.

Экспрессия и очистка химерных антител

[00447] Аминокислотные последовательности вариабельной области для мышиных антител к EpCAM были кодон-оптимизированы, синтезированы и клонированы в рамке считывания с константными областями IgG1 человека с помощью GenScript (Нью-Джерси) для создания химерных версий антител к EpCAM. Вкратце, вариабельную область легкой цепи клонировали в сайты EcoRI и BsiWI плазмиды pAbKZeo собственной разработки, а вариабельную область тяжелой цепи клонировали в сайты HindIII и Apa1 плазмиды pAbG1Neo собственной разработки. Эти экспрессирующие конструкции временно получали в адаптированных к суспензии клетках HEK-293T с использованием PEI в качестве реагента для трансфекции во встряхиваемых колбах. Временные трансфекции PEI выполняли, как описано ранее (см. Durocher et al., Nucleic Acids Res. 30(2):E9 (2002)), за исключением того, что клетки HEK-293T выращивали во Freestyle 293 (Invitrogen), а объем культуры был оставлен неразбавленным после добавления комплексов PEI-ДНК. Трансфицированные клетки инкубировали в течение недели, собирали и отфильтрованные супернатанты затем очищали, используя комбинацию хроматографии на белке А и CHT, используя процедуры, описанные в Примере 1.

Пример 4. Гуманизация антител

[00448] Гуманизацию антител проводили с использованием процедур прививания определяющей комплементарность области (CDR), по существу, как описано в Jones et al., Nature 321: 604-608 (1986), Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536 (1988), патенты США №№ 5225539 и 5585089. Прививание CDR, как правило, включает замену каркасных областей Fv (FR) мышиного антитела на каркасные области Fv антитела человека при сохранении остатков CDR мыши, критических для специфических антигенсвязывающих свойств исходного антитела. Иллюстративные CDR мышиного антитела EpCAM-23, следующие за определениями CDR по Kabat, показаны в таблице 13 ниже.

Таблица 13.

CDR мышиного EpCAM-23
Тяжелая цепь
CDR-H1: NYYIH (SEQ ID NO: 13) CDR-H2: WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14) CDR-H3: DGPWFAY (SEQ ID NO: 15
Легкая цепь
CDR-L1: RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39) CDR-L2: QTSNLAS (SEQ ID NO: 40) CDR-L3: AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41)

[00449] Процесс прививания CDR начинается с выбора подходящих человеческих акцепторных каркасных областей, как правило, происходящих из генов человеческих антител, имеющих наивысшую гомологию последовательностей с исходным мышиным антителом. Эти акцепторные каркасные области, как правило, идентифицируются с использованием интерактивного инструмента DomainGapAlign Международной информационной системы ImMunoGeneTics ®(IMGT (http://imgt.cines.fr/)), как описано в Ehrenmann et al., Nucleic Acids Res. 38: D301-307 (2010). После селекции последовательностей V_L и V_H зародышевой линии человека, которые имеют наивысшую идентичность последовательностей с последовательностями мыши, получают гуманизированную версию антитела путем прививания CDR мыши в последовательности зародышевой линии человека. Снижение или устранение антигенсвязывающей аффинности после прививания CDR часто наблюдается как следствие несовместимости между мышиными CDR и человеческими каркасными областями, Foote and Winter, J. Mol. Biol. 224:487-499 (1992); однако платформа остатков непосредственно под CDR, называемая остатками зоны Вернье, может помочь сохранить конформацию петель CDR, которые определяют специфичность и аффинность антитела. Следовательно, для восстановления аффинности связывания часто необходимы обратные мутации этих остатков зоны Вернье в мышиные остатки.

[00450] На Фиг. 2A и 2B показаны выравнивания последовательностей между вариабельными областями исходных последовательностей легкой и тяжелой цепи muEpCAM-23 и их наиболее близкие совпадения с последовательностями зародышевой линии человека. На основании результатов выравнивания последовательности зародышевой линии человека, выбранные в качестве акцепторных каркасных областей для доменов V_L и V_H антитела EpCAM-23, представляли собой IGKV2D-29*02 (Фиг. 2A) и IGHV1-3*01 (Фиг. 2B), соответственно.

[00451] Первоначальную прививку CDR muEpCAM-23 проводили путем встраивания положений 24-34 (CDR-L1), 50-56 (CDR-L2) и 89-97 (CDR-L2) VL по Kabat и положений 31-35 (CDR-H1), 50-65 (CDR-H2) и 95-102 (CDR-H3) VH по Kabat в соответствующие каркасные области человеческой зародышевой линии IGKV2D-29*01 и IGHV1-3*01. Первоначальная версия с привитой CDR содержала 12 замен остатков каркасных областей в V_L и 27 замен остатков каркасных областей в V_H. Кроме того, были также получены варианты, содержащие одну или более обратных мутаций остатков зоны Вернье, и впоследствии их оценивали на связывание с EpCAM. Протестированные обратные мутации остатков зоны Вернье включали 3 остатка в V_L (положение 4 в FW-L1 и положения 36, 64 в FW-L2) и 6 остатков в V_H (положения 47, 48 в FW-H2, положения 67, 69, 71 и 73 в FW-H3). Кроме того, чтобы минимизировать потенциальное влияние конъюгированных остатков лизина, которые попадают в CDR, остатки лизина были заменены на аргинин в областях CDR некоторых версий. Кроме того, в некоторых привитых версиях некоторые остатки CDRH2 были заменены на остатки зародышевой линии IGHV1-3*01 для повышения степени человечности. В таблице 14 и таблице 15 перечислены все изменения остатков между различными гуманизированными версиями VL и VH, соответственно. Гуманизированные конструкции ДНК синтезировали, экспрессировали, и рекомбинантные антитела очищали по существу с использованием процедур, описанных в Примере 2, для последующего анализа связывания EpCAM человека и EpCAM яванского макака.

Таблица 14. Прививание CDR V_L антитела EpCAM-23

		EpCAM-23-V_L			
Положение по Kabat	Мышиный остаток	Остатки VL Gv1	Остатки VL Gv2	Остатки VL Gv3	Остатки VL Gv4
L4	L	M	L	M	L
L9	F	L	L	L	L
L11	N	L	L	L	L
L12	P	S	S	S	S
L15	L	P	P	P	P
L17	T	Q	Q	Q	Q

		EpCAM-23-V_L			
L18	S	P	P	P	P
L27	K	R	K	K	R
L36	F	Y	F	F	F
L45	H	Q	Q	Q	Q
L64	S	G	S	G	S
L74	R	K	K	K	K
L100	G	Q	Q	Q	Q

Таблица 15. Прививание CDR V_H антитела EpCAM-23

	EpCAM-23-V_H				
Положение по Kabat	Мышиный остаток	Остатки VH Gv1	Остатки VH Gv2	Остатки VH Gv3	Остатки VH Gv4
H1	E	Q	Q	Q	Q
H3	K	Q	Q	Q	Q
H5	E	V	V	V	V
H6	E	Q	Q	Q	Q
H9	P	A	A	A	A
H10	A	E	E	E	E
H11	L	V	V	V	V
H12	V	K	K	K	K
H19	R	K	K	K	K
H20	I	V	V	V	V
H38	K	R	R	R	R
H40	R	A	A	A	A

	EpCAM-23-V_H				
H44	G	R	R	R	R
H46	D	E	E	E	E
H47	Y	W	Y	W	Y
H48	I	M	I	M	I
H60	N	S	N	N	S
H61	E	Q	E	E	Q
H64	K	Q	K	K	Q
H66	K	R	R	R	R
H67	A	V	A	V	V
H69	L	I	L	I	I
H71	A	R	A	R	A
H73	K	T	K	T	K
H75	S	A	A	A	A
H79	F	Y	Y	Y	Y
H81	Q	E	E	E	E
H83	T	R	R	R	R
H87	S	T	T	T	T
H91	F	Y	Y	Y	Y

Аффинность связывания химеризованных/гуманизированных антител к EpCAM

[00452] Анализы связывания на основе проточной цитометрии проводили и анализировали, как описано в Примере 2, с использованием вторичных козьих античеловеческих антител, конъюгированных с Alexa Fluor Plus 488, (Invitrogen).

[00453] Химеризованное антитело chEpCAM23 было проанализировано на его аффинность связывания с клетками HSC2 (Фиг. 3A) и первичными эпителиальными клетками почки яванского макака (Фиг. 3B).

[00454] Несколько гуманизированных версий EpCAM23 сохранили связывание с человеческими клетками HSC2 (Фиг. 3C). Однако только версия Gv2.2 (VL Gv2 и VH Gv2) и версия Gv4.2 (VL Gv4 и VH Gv2) также сохранили связывание с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака (Фиг. 3D). Кроме того, была создана и оценена другая версия Gv4.2 с сайтами конъюгации, специфичными для цистеина, huEpCAM23Gv4.2-C442. Как показано на Фиг. 3E и 3F, это антитело связывается с HSC2 и первичными эпителиальными клетками почки яванского макака с Kd, подобной таковой у huEpCAM23Gv4.2. На Фиг. 4A и 4B показано выравнивание последовательностей вариабельных областей исходного мышиного антитела EpCAM-23, привитой версии Gv 2.2 и привитой версии Gv 4.2. Полезные нагрузки обычно конъюгированы с антителом с использованием остатков лизина или цистеина, а привитая версия Gv4.2 отличалась от версии Gv2.2 только одной аминокислотой (лизин на аргинин в положении 23). Поэтому для облегчения конъюгации Gv4.2 был выбран для дальнейшей оценки.

Пример 5: Модуляция аффинности антитела huEpCAM-23Gv4.2

[00455] Для длительного удержания в опухоли моноклональные антитела должны связываться с антигенами с высокой аффинностью. Однако была выдвинута гипотеза, что если взаимодействие между антителом и опухолевым антигеном слишком велико, эффективное проникновение моноклональных антител в опухоль может быть нарушено, что приведет к снижению эффективности in vivo. Оптимальная аффинность, вероятно, является функцией многих переменных, таких как экспрессия антигена и гетерогенность; размер опухоли; скорость интернализации и рециклинга рецепторов; сосудистая сеть; активность неспецифического цитолиза; и отношение лекарственного средства к антителу (DAR) (Vasalou et al., PLoS ONE 10(3):e0118977(2015) doi:10.1371/journal.pone. 0118977). Поэтому, чтобы лучше понять взаимодействие всех этих переменных, были созданы аффинные варианты гуманизированного антитела Gv4.2. Варианты были созданы либо путем мутагенеза контактирующих с растворителем остатков CDR, или остатков каркасной области VH/VL, которые редко встречаются в мышином/человеческом естественном репертуаре (частота <5%). Контактирующие с растворителем положения были идентифицированы путем создания модели гомологии антитела Gv4.2 с использованием функции моделирования антител коммерческим программным обеспечением MOE (Chemical Computing Group). В таблице 16 перечислены все положения, которые были исследованы, а в таблице 17 показано связывание KD различных вариантов с клетками HSC2 человека и первичными эпителиальными клетками почек яванского макака. Все варианты были экспрессированы, очищены и

охарактеризованы в отношении связывания FACS по существу с использованием процедур, описанных в Примерах 2 и 4.

Таблица 16. Контактирующие с растворителем положения антитела Gv4.2.

Название	Вариабельная область	Исходный остаток	Мутированный остаток	Положение по Kabat
huEpCAM23HCGv2a	V_H	Q	E	6
huEpCAM23HCGv2b	V_H	N	S	31
huEpCAM23HCGv2c	V_H	Y	N	33
huEpCAM23HCGv2d	VH	N	D	54
huEpCAM23HCGv2e	V_H	Y	F	33
huEpCAM23HCGv2f	VH	Y	S	33
huEpCAM23HCGv2g	V_H	Y	W	33
huEpCAM23HCGv2h	V_H	I	F	51
huEpCAM23HCGv2i/2o	V_H	Y	W	47
huEpCAM23HCGv2j	V_H	Y	N	52
huEpCAM23HCGv2k	V_H	D	E	95
huEpCAM23HCGv2l	V_H	W	Y	98
huEpCAM23HCGv2m	V_H	P	A	97
huEpCAM23HCGv2n	V_H	I	M	34
huEpCAM23HCGv2p	V_H	I	V	51
huEpCAM23HCGv2q	V_H	L	I	69
huEpCAM23HCGv2r	V_H	A	R	71
huEpCAM23HCGv2s	V_H	A	V	67
huEpCam23HG2-1361-H	V_H	Y	H	33
huEpCam23HG2-1361-D	V_H	Y	D	33
huEpCam23HG2-1361-I	V_H	Y	I	33
huEpCam23HG2-1361-L	V_H	Y	L	33
huEpCam23HG2-1565-Y	V_H	P	Y	97
huEpCam23HG2-1565-S	V_H	P	S	97
huEpCam23HG2-1565-A	V_H	P	A	97
huEpCam23HG2-1565-F	V_H	P	F	97
huEpCam23HG2-1565-G	V_H	P	G	97
huEpCam23HG2-1565-T	V_H	P	T	97

Название	Вариабельная область	Исходный остаток	Мутированный остаток	Положение по Kabat
huEpCam23HG2-1565-V	V_H	P	V	97
huEpCAM23LCGv4a	V_L	D	N	30c
huEpCAM23LCGv4b	V_L	F	I	30e
huEpCAM23LCGv4c	V_L	N	W	96
huEpCAM23LCGv4e	V_L	Y	S	34
huEpCAM23LCGv4f	V_L	F	Y	36
huEpCAM23LCGv4g	V_L	A	Q	89
huEpCAM23LCGv4h	V_L	A	L	89
huEpCAM23LCGv4i	V_L	N	Y	91
huEpCAM23LCGv4j	V_L	N	G	91
huEpCAM23LCGv4k	V_L	N	S	91

Таблица 17. Связывание выбранных аффинных вариантов с клетками HSC2 человека и первичными

эпителиальными клетками почки яванского макака.

Название варианта	Тяжелая цепь	Легкая цепь	KD на клетках HSC2 (нМ) (NS для ненасыщенных)	KD на первичных эпителиальных клетках почки яванского макака (нМ) (NS для ненасыщенных)
huEpCAM23 Gv4.2a	huEpCAM23 HCGv2a	huEpCAM23 LCGv4	Не тестировали	Не тестировали
huEpCAM23 Gv4.2b	huEpCAM23 HCGv2b	huEpCAM23 LCGv4	Не тестировали	Не тестировали
huEpCAM23 Gv4.2c	huEpCAM23 HCGv2c	huEpCAM23	NS	NS

		LCGv4		
huEpCAM23 Gv4.2d	huEpCAM23 HCGv2d	huEpCAM23 LCGv4	Не тестировали	Не тестировали
huEpCAM23Gv4a.2	huEpCAM23HCGv2	huEpCAM23 LCGv4a	0,1	1,1
huEpCAM23Gv4b.2	huEpCAM23HCGv2	huEpCAM23 LCGv4b	Не тестировали	Не тестировали
huEpCAM23Gv4c.2	huEpCAM23HCGv2	huEpCAM23 LCGv4c	Не тестировали	Не тестировали
huEpCAM23Gv4a.2a	huEpCAM23HCGv2a	huEpCAM23 LCGv4a	NS	NS
huEpCAM23Gv4a.2b	huEpCAM23HCGv2b	huEpCAM23 LCGv4a	0,5	8
huEpCAM23Gv4a.2d	huEpCAM23HCGv2d	huEpCAM23 LCGv4a	0,6	NS
huEpCAM23Gv4b.2a	huEpCAM23HCGv2a	huEpCAM23 LCGv4b	NS	NS
huEpCAM23Gv4b.2b	huEpCAM23HCGv2b	huEpCAM23 LCGv4b	0,7	6,6
huEpCAM23Gv4b.2d	huEpCAM23HCGv2d	huEpCAM23 LCGv4b	1,4	NS
huEpCAM23Gv4b.2a	huEpCAM23HCGv2a	huEpCAM23 LCGv4b	NS	NS
huEpCAM23Gv4b.2b	huEpCAM23HCGv2b	huEpCAM23 LCGv4b	1,3	46
huEpCAM23Gv4b.2d	huEpCAM23HCGv2d	huEpCAM23 LCGv4b	2,5	NS
huEpCAM23Gv4.2f	huEpCAM23HCGv2f	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS

huEpCAM23Gv4.2g	huEpCAM23HCGv2g	huEpCAM23 LCGv4	0,94	NS
huEpCAM23Gv4.2h	huEpCAM23HCGv2h	huEpCAM23 LCGv4	2,5	NS
huEpCAM23Gv4.2i	huEpCAM23HCGv2i	huEpCAM23 LCGv4	0,95	~15
huEpCAM23Gv4.2j	huEpCAM23HCGv2j	huEpCAM23 LCGv4	0,6	NS
huEpCAM23Gv4.2k	huEpCAM23HCGv2k	huEpCAM23 LCGv4	0,59	6,3
huEpCAM23Gv4.2l	huEpCAM23HCGv2l	huEpCAM23 LCGv4	2,7	NS
huEpCAM23Gv4.2m	huEpCAM23HCGv2m	huEpCAM23 LCGv4	2,1	NS
huEpCAM23Gv4.2o	huEpCAM23HCGv2o	huEpCAM23 LCGv4	1,0	11,4
huEpCAM23Gv4.2p	huEpCAM23HCGv2p	huEpCAM23 LCGv4	1,1	8,6
huEpCAM23Gv4.2q	huEpCAM23HCGv2q	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2r	huEpCAM23HCGv2r	huEpCAM23 LCGv4	NS	7,3
huEpCAM23Gv4.2s	huEpCAM23HCGv2s	huEpCAM23 LCGv4	0,6	4,7
huEpCAM23Gv4.2-1361A	huEpCam23HG2-1361-A	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361D	huEpCam23HG2-1361-D	huEpCAM23 LCGv4	~6	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361G	huEpCam23HG2-1361-G	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361H	huEpCam23HG2-1361-H	huEpCAM23 LCGv4	1,3	NS
huEpCAM23Gv4.2-	huEpCam23HG2-1361-	huEpCAM23	NS	NS

1361I	I	LCGv4		
huEpCAM23Gv4.2-1361L	huEpCam23HG2-1361-L	huEpCAM23 LCGv4	0,75	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361N	huEpCam23HG2-1361-N	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361P	huEpCam23HG2-1361-P	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361R	huEpCam23HG2-1361-R	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1361V	huEpCam23HG2-1361-V	huEpCAM23 LCGv4	1,7	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565A	huEpCam23HG2-1565-A	huEpCAM23 LCGv4	1,5	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565F	huEpCam23HG2-1565-A	huEpCAM23 LCGv4	1,5	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565G	huEpCam23HG2-1565-G	huEpCAM23 LCGv4	1,1	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565H	huEpCam23HG2-1565-H	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565L	huEpCam23HG2-1565-L	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565R	huEpCam23HG2-1565-R	huEpCAM23 LCGv4	NS	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565S	huEpCam23HG2-1565-S	huEpCAM23 LCGv4	4,2	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565T	huEpCam23HG2-1565-T	huEpCAM23 LCGv4	1,6	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565V	huEpCam23HG2-1565-V	huEpCAM23 LCGv4	1,3	NS
huEpCAM23Gv4.2-1565T	huEpCam23HG2-1565-T	huEpCAM23 LCGv4	1,2	~5,2

* NS = ненасыщенный

Пример 6. Аффинность связывания аффинных вариантов гуманизированного антитела анти-EpCAM23Gv4.2

[00456] Первоначальный набор гуманизированных аффинных вариантов анти-EpCAM23Gv4.2 тестировали в иммуноферментном анализе (ИФА) с использованием mFc-меченного белка huEpCAM или cynoEpCAM. Вкратце, каждый меченный mFc белок EpCAM разбавляли до 0,5 мкг/мл в 50 мМ буфер на основе бикарбоната натрия, pH 9,6, и добавляли 100 мкл в каждую лунку. После 16-часовой инкубации при 4 °C планшеты промывали трис-буферным солевым раствором с 0,1% Твин-20 (TBST), затем блокировали 200 мкл блокирующего буфера (TBS с 1% BSA). Затем 100 мкл первичного антитела, аффинного варианта, серийно разведенного в блокирующем буфере, добавляли в двух экземплярах в лунки для ИФА и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты промывали 3 раза TBST перед добавлением 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к человеческому IgG (H + L) в каждую лунку. Планшеты снова инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, а затем трижды промывали TBST. Наконец, 100 мкл TMB однокомпонентного субстрата для микролунок ПХ добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 5 мин. Реакцию останавливали, добавляя 100 мкл стоп-раствора, а оптическую плотность считывали при 450 нм на многолуночном ридере для планшетов. ОП450 наносили против концентрации антитела на полулогарифмическом графике. Кривую доза-ответ строили с помощью нелинейной регрессии, а значение EC50 для каждой кривой рассчитывали с использованием GraphPad Prism v6.

[00457] Результаты анализа на основе ИФА показаны на Фиг. 5A и 5B (для вариантов, содержащих мутацию в легкой цепи) и на Фиг. 5C и 5D (для вариантов, содержащих мутацию в тяжелой цепи). Семь вариантов, приведенных на Фиг. 5A-5D, демонстрируют разные профили связывания, при этом особенно отчетливое связывание проявляет вариант Gv4c.2 с мутацией в легкой цепи и вариант Gv4.2c с мутацией в тяжелой цепи. Вариант Gv4c.2 продемонстрировал самое слабое связывание с белком cynoEpCAM-mFc среди трех вариантов с мутацией в легкой цепи, с примерно в 3 раза более слабой аффинностью, чем его исходное антитело (Фиг. 5B). Однако вариант Gv4c.2 показал сходную KD с huEpCAM-mFc в качестве исходного антитела (Фиг. 5A). Среди четырех вариантов с мутацией в тяжелой цепи вариант Gv4.2c продемонстрировал значительно сниженное связывание с cynoEpCAM-mFc (Фиг. 5D), но продемонстрировал аналогичное связывание с huEpCAM-mFc (Фиг. 5C) по сравнению с исходным антителом. Используя различные комбинации этих вариантов с мутациями в тяжелой цепи и легкой цепи, были получены варианты с двойной мутацией в дополнение к указанным выше вариантам с одной мутацией.

[00458] Аффинность связывания дополнительных гуманизированных

аффинных вариантов анти-EpCAM23Gv4.2 с клетками HSC2 и с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака сравнивали с таковой у исходного антитела. Анализы связывания на основе проточной цитометрии проводили и анализировали, как описано в Примерах 2 и 4, и всего оценивали 60 вариантов. На Фиг. 5E-5H показаны кривые связывания для вариантов с двойной мутацией, а на Фиг. 5I-5K показаны кривые связывания некоторых аффинных вариантов, содержащих одиночные мутации в тяжелой цепи huEpCAM23Gv4.2. Как показано на Фиг. 5E-5K были созданы варианты с различными профилями связывания. В частности, варианты с двойной мутацией Gv4a.2a, Gv4b.2a и Gv4c.2a показали очень высокую интенсивность флуоресценции и не смогли насытить оба типа клеток: HSC2 (Фиг. 5E) и первичные эпителиальные клетки почки (Фиг. 5F). Кроме того, варианты Gv4a.2b и Gv4b.2b демонстрировали примерно 4-кратное снижение аффинности по сравнению с исходным антителом к первичным эпителиальным клеткам почки яванского макака (Фиг. 5H), но демонстрировали аналогичное связывание с клетками HSC2 (Фиг. 5G). Варианты с двойной мутацией Gv4b.2d, Gv4c.2b и Gv4c.2d имели очень слабое связывание с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака, но сходное связывание с клетками HSC2 по сравнению с исходным антителом. Как показано на Фиг. 5I-5K кажущаяся константа диссоциации (K_d) вариантов аффинности с одной мутацией варьировала от 0,8 нМ до около 6 нМ, что представляет собой увеличение в 2-15 раз по сравнению с исходным антителом huEpCAM23Gv4.2 (K_d 0,4 нМ) на клетках HSC2. Эти варианты с единственной мутацией были также протестированы на первичных эпителиальных клетках почки яванского макака, данные показаны на Фиг. 5L-5N.

[00459] В частности, huEpCAM23Gv4.2Q проявлял высокую интенсивность флуоресценции как на клетках HSC2, так и на первичных клетках почки яванского макака, тогда как huEpCAM23Gv4.2R проявляло высокую интенсивность флуоресценции только на клетках HSC2 (Фиг. 5I и 5L). huEpCAM23Gv4.2H и huEpCAM23Gv4.2L показали аналогичные значения K_d, но были связаны с очень плохим связыванием с первичными эпителиальными клетками почки яванского макака. Другие клоны, приведенные на Фиг. 5I и 5L насыщены для обоих типов клеток и были связаны с различными значениями K_d.

[00460] На Фиг. 5J и 5M показаны характеристики связывания для аффинных вариантов, содержащих конкретную аминокислотную замену в том же положении CDR1 (т.е. замену исходного остатка Y в положении 33 на другую аминокислоту). Все варианты, приведенные на Фиг. 5J и 5M имели пониженные значения K_d на клетках HSC2 по сравнению с исходным антителом и демонстрировали очень слабое связывание (за исключением huEpCAM23Gv4.2-1361-I) с первичными эпителиальными клетками почки

яванского макака. На Фиг. 5K и 5N показаны характеристики связывания для аффинных вариантов, содержащих конкретную аминокислотную замену в том же положении CDR3 (т.е. замену исходного остатка P в положении 97 на другую аминокислоту). Вариант huEpCAM23Gv4.2-1565-Y насыщал как клетки HSC2, так и первичные эпителиальные клетки яванского макака с пониженным значением K_d по сравнению с таковым у исходного антитела, в то время как остальные варианты насыщали только клетки HSC2, а не первичные эпителиальные клетки почки яванского макака.

[00461] В совокупности эти данные демонстрируют, что аффинные варианты были созданы с различными средними геометрическими интенсивности флуоресценции связывания и с диапазоном K_d. На основании этих результатов для дальнейшей оценки были отобраны два аффинных варианта, huEpCAM23Gv4.2-1361-H и huEpCAM23Gv4.2-1565-Y. В частности, эти варианты были отобраны из-за их несколько более низкой аффинности связывания с клетками HSC2 по сравнению с исходным антителом (т.е. примерно в 3 раза ниже K_d по сравнению с исходным антителом на клетках HSC2) и их различных сайтов мутаций.

Пример 7: Обнаружение маски

[00462] Представленные в данном документе исследования были разработаны для идентификации и характеристики маскирующих фрагментов (MM или «масок») для применения в активируемых антителах к EpCAM («активируемых антителах»).

[00463] Гуманизированное моноклональное антитело к EpCAM человека (EpCAM23Gv4.2), которое перекрестно реагирует с EpCAM человека и яванского макака, использовали для скрининга случайной библиотеки пептидов X_{15}, где X представляет собой любую аминокислоту, с использованием метода, аналогичного описанному в международной публикации PCT WO 2010/081173, опубликованный 15 июля 2010 г. Скрининг состоял из одного раунда MACS и трех раундов сортировки методом FACS. Первоначальную сортировку по MACS проводили с помощью Dynabead с белком A (Invitrogen) с антителом к EpCAM. Для MACS антитело к EpCAM конъюгировали с DyLight-488 (ThermoFisher), подтверждали связывающую активность EpCAM, и анти-EpCAM-488 использовали в качестве флуоресцентного зонда для всех раундов FACS. Отдельные пептидные клоны идентифицировали при помощи секвенирования из каждого раунда FACS.

[00464] Были созданы два варианта с мутацией в тяжелой цепи для гуманизированного моноклонального антитела к EpCAM человека (EpCAM23 (1361-H) и EpCAM23 (1565-Y)), которые использовали для скрининга случайной библиотеки

пептидов X_{15}, где X представляет собой любую аминокислоту, с использованием метода, аналогичного описанному в международной публикации PCT WO 2010/081173, опубликованной 15 июля 2010 г. Маски с EP101 по EP 104 были идентифицированы с использованием варианта с мутацией в тяжелой цепи EpCAM23(1565-Y). Маски с EP105 по EP 110 были идентифицированы с использованием варианта с мутацией в тяжелой цепи EpCAM23(1361-H). Также были получены мутации остатка лизина в маскирующем фрагменте Ep107

[00465] Последовательности выбранных маскирующих фрагментов анти-EpCAM перечислены в таблице 18.

Таблица 18. Маскирующие фрагменты для активируемых антител к EpCAM.

Маскирующий фрагмент анти-EpCAM	Аминокислотная последовательность
Маски для гуманизированных антител Gv4.2	
EP01	PLMTCSDYYTCKNNL (SEQ ID NO: 218)
EP01-1	PLMTCSDYYTCHNNL (SEQ ID NO: 219)
EP01-2	PLMTCSDYYTCLNNL (SEQ ID NO: 151)
EP01-3	PLMTCSDYYTCRNNL (SEQ ID NO: 220)
EP02	LSCTHSRYDMHCPHM (SEQ ID NO: 152)
EP03	HYCHSRTDTITHCNA (SEQ ID NO: 153)
EP04	WCPRLFDRPSMGCPT (SEQ ID NO: 154)
EP05	WWPPCQGGAWCEQRI (SEQ ID NO: 155)
EP06	KFSCTTMPHKNCMKP (SEQ ID NO: 221)
EP07	HSGCPRLFDRCSAPA (SEQ ID NO: 156)
EP08	PLMTCTKYNNCINNL (SEQ ID NO: 222)
EP09	PNYMCKLNTCTHHIA (SEQ ID NO: 223)
EP10	AACAGGVLFDRCSVD (SEQ ID NO: 224)
EP11	FICPTLYDRPHCMHT (SEQ ID NO: 157)
EP12	NMPACQGGSWCRPGY (SEQ ID NO: 225)
EP13	TLCARPPSYQLCSHV (SEQ ID NO: 226)
EP14	NLCPPGETRTQCQIT (SEQ ID NO: 227)
EP15	LYCALYSVQLFCVDL (SEQ ID NO: 228)
EP16	KMAPCDAWYCHQQTA (SEQ ID NO: 229)

EP17	QDECSNKEAENCSDV (SEQ ID NO: 230)
EP18	QTCYGWSWSGSCLWY (SEQ ID NO: 231)
EP19	SNPCISTGHTHCQKI (SEQ ID NO: 232)
EP20	QICFGGSKNRYDCFM (SEQ ID NO: 233)
EP21	PTAPCHFNPPCRNTG (SEQ ID NO: 234)
EP22	VCSGSSPGHPRVCGD (SEQ ID NO: 235)
EP23	LLPCPTSMPSYCFNY (SEQ ID NO: 236)
EP24	RGTPCTINTCTHHFS (SEQ ID NO: 237)
EP25	KNGGCKVPIPCKSWS (SEQ ID NO: 238)
Маски для аффинных вариантов 1361-H и 1565-Y	
EP101	SWCHSATDTILPCSN (SEQ ID NO: 158)
EP102	SPACSDRYYQTCVLN (SEQ ID NO: 159)
EP103	MSCVVDRFDRQCPHL (SEQ ID NO: 160)
EP104	TTRCEHYWFTCPLSP (SEQ ID NO: 161)
EP105	DCTGYSPSVLPACRV (SEQ ID NO: 162)
EP106	FCSGYSPSVLPSCLM (SEQ ID NO: 163)
EP107	SKPCSYMHPYCFYNS (SEQ ID NO: 164)
EP107-1	SRPCSYMHPYCFYNS (SEQ ID NO: 239)
EP107-2	SHPCSYMHPYCFYNS (SEQ ID NO: 240)
EP107-3	SLPCSYMHPYCFYNS (SEQ ID NO: 241)
EP108	LTRCTIAHPYCYYNY (SEQ ID NO: 165)
EP109	PNTCMSERRICSLTY (SEQ ID NO: 166)
EP110	PRPHCAILRQCLAAT (SEQ ID NO: 167)

[00466] Эти маскирующие пептиды использовали для создания активируемых антител к EpCAM по изобретению. Аминокислотные последовательности некоторых из этих активируемых антител к EpCAM показаны ниже в таблице 19. В некоторых вариантах осуществления эти активируемые антитела к EpCAM по изобретению включают: ISSGLLSGRSDNH (SEQ ID NO: 242), AVGLLAPPGGLSGRSDNH (SEQ ID NO: 243), ISSGLLSGRSDIH (SEQ ID NO: 244), ISSGLLSGRSDQH (SEQ ID NO: 245), ISSGLLSGRSDNP (SEQ ID NO: 246), ISSGLLSGRSANP (SEQ ID NO: 247), ISSGLLSGRSANI(SEQ ID NO: 248), ISSGLLSGRSDNI (SEQ ID NO: 169), AVGLLAPPGGLSGRSDIH (SEQ ID NO: 249), AVGLLAPPGGLSGRSDQH (SEQ ID NO: 250), AVGLLAPPGGLSGRSDNP(SEQ ID NO:

251), AVGLLAPPGGLSGRSANP (SEQ ID NO: 252), AVGLLAPPGGLSGRSANI (SEQ ID NO: 253), или AVGLLAPPGGLSGRSDNI (SEQ ID NO: 168). В некоторых вариантах осуществления некоторые активируемые антитела к EpCAM по изобретению содержат нерасщепляемый фрагмент «NSUB», отщепление которого не ожидается.

[00467] Хотя определенные последовательности легкой цепи активируемых антител по изобретению, показанные ниже, включают N-концевую спейсерную последовательность QGQSGQG (SEQ ID NO: 254), специалисты в данной области техники понимают, что активируемые антитела к EpCAM по изобретению могут включают любую подходящую спейсерную последовательность, такую как, например, спейсерную последовательность, выбранную из группы, состоящей из QGQSGQ (SEQ ID NO: 255), QGQSG (SEQ ID NO: 256), QGQS (SEQ ID NO: 257), QGQ, QG, GQSGQG (SEQ ID NO: 258), QSGQG (SEQ ID NO: 259), SGQG (SEQ ID NO: 260), GQG, G или Q. В некоторых вариантах осуществления легкие цепи активируемых антител к EpCAM по изобретению могут не иметь спейсерную последовательность, присоединенную к N-концу.

Таблица 19. Аминокислотные последовательности вариабельных областей легкой цепи активируемых антител по изобретению.

Вариабельный домен легкой цепи активируемого антитела	Аминокислотная последовательность
EP01-2014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCKNNLGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 261)
EP01-1-2014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCHNNLGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 262)
EP01-2-2014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCLNNLGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 263)

EP01-3-2014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCRNNLGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 264)
EP02-2014-Gv4	QGQSGQGLSCTHSRYDMHCPHMGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 265)
EP03-2014-Gv4	QGQSGQGHYCHSRTDTITHCNAGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 266)
EP04-2014-Gv4	QGQSGQGWCPRLFDRPSMGCPTGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 267)
EP05-2014-Gv4	QGQSGQGWWPPCQGGAWCEQRIGGGSSGGSISSGLL SGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 268)
EP06-2014-Gv4	QGQSGQGKFSCTTMPHKNCMKPGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 269)
EP07-2014-Gv4	QGQSGQGHSGCPRLFDRCSAPAGGGSSGGSISSGLLSG RSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHS DGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 270)

EP08-2014-Gv4	QGQSGQGPLMTCTKYNNCINNLGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 271)
EP09-2014-Gv4	QGQSGQGPNYMCKLNTCTHHIAGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 272)
EP10-2014-Gv4	QGQSGQGAACAGGVLFDRCSVDGGGSSGGSISSGLLS GRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 273)
EP11-2014-Gv4	QGQSGQGFICPTLYDRPHCMHTGGGSSGGSISSGLLSG RSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHS DGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRFSSS GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGT KLEIK (SEQ ID NO: 274)
EP12-2014-Gv4	QGQSGQGNMPACQGGSWCRPGYGGGSSGGSISSGLL SGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLL HSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGVPDRF SSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFG QGTKLEIK (SEQ ID NO: 275)
EP01-3014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCKNNLGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 276)
EP01-1-3014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCHNNLGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 277)

EP01-2-3014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCLNNLGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 278)
EP01-3-3014-Gv4	QGQSGQGPLMTCSDYYTCRNNLGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 279)
EP02-3014-Gv4	QGQSGQGLSCTHSRYDMHCPHMGGGSSGGAVGLLA PPGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 280)
EP03-3014-Gv4	QGQSGQGHYCHSRTDTITHCNAGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 281)
EP04-3014-Gv4	QGQSGQGWCPRLFDRPSMGCPTGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 282)
EP05-3014-Gv4	QGQSGQGWWPPCQGGAWCEQRIGGGSSGGAVGLLA PPGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 283)
EP06-3014-Gv4	QGQSGQGKFSCTTMPHKNCMKPGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 284)

EP07-3014-Gv4	QGQSGQGHSGCPRLFDRCSAPAGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 285)
EP08-3014-Gv4	QGQSGQGPLMTCTKYNNCINNLGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 286)
EP09-3014-Gv4	QGQSGQGPNYMCKLNTCTHHIAGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 287)
EP10-3014-Gv4	QGQSGQGAACAGGVLFDRCSVDGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 288)
EP11-3014-Gv4	QGQSGQGFICPTLYDRPHCMHTGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 289)
EP12-3014-Gv4	QGQSGQGNMPACQGGSWCRPGYGGGSSGGAVGLLA PPGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCR SSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 290)
Вариабельные области легких цепей для аффинных вариантов 1361-H и 1565-Y	
EP101-3014-Gv4	QGQSGQGSWCHSATDTILPCSNGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV

	PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 291)
EP102-3014-Gv4	QGQSGQGSPACSDRYYQTCVLNGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 292)
EP103-3014-Gv4	QGQSGQGMSCVVDRFDRQCPHLGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 293)
EP104-3014-Gv4	QGQSGQGTTRCEHYWFTCPLSPGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 294)
EP105-3014-Gv4	QGQSGQGDCTGYSPSVLPACRVGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 295)
EP106-3014-Gv4	QGQSGQGFCSGYSPSVLPSCLMGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 296)
EP107-3014-Gv4	QGQSGQGSKPCSYMHPYCFYNSGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 297)
EP108-3014-Gv4	QGQSGQGLTRCTIAHPYCYYNYGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS

	SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 298)
EP109-3014-Gv4	QGQSGQGPNTCMSERRICSLTYGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 299)
EP110-3014-Gv4	QGQSGQGPRPHCAILRQCLAATGGGSSGGAVGLLAPP GGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSS RSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASGV PDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPN TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 300)
EP107-1-3014-Gv4	QGQSGQGSRPCSYMHPYCFYNSGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 301)
EP107-2-3014-Gv4	QGQSGQGSHPCSYMHPYCFYNSGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 302)
EP107-3-3014-Gv4	QGQSGQGSLPCSYMHPYCFYNSGGGSSGGAVGLLAP PGGLSGRSDNIGGSDIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRS SRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLASG VPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELP NTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 303)

[00468] Иллюстративные активируемые антитела к EpCAM, имеющие следующие тяжелые и легкие цепи, показаны ниже в таблице 20.

Таблица 20. Активируемые антитела к EpCAM.

Активируемые Антитела к EpCAM	Тяжелая цепь	Легкая цепь

EP01-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-2014
EP02-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP02-2014
EP03-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP03-2014
EP04-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP04-2014
EP05-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP05-2014
EP06-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP06-2014
EP07-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP07-2014
EP08-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP08-2014
EP09-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP09-2014
EP10-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP10-2014
EP11-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP11-2014
EP12-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP12-2014
EP01-1-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-1-2014
EP01-2-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-2-2014
EP01-3-2014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-3-2014
EP01-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-3014
EP02-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP02-3014
EP03-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP03-3014
EP04-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP04-3014
EP05-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP05-3014
EP06-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP06-3014
EP07-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP07-3014
EP08-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP08-3014
EP09-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP09-3014
EP10-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP10-3014
EP11-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP11-3014
EP12-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP12-3014
EP01-1-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-1-3014
EP01-2-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-2-3014
EP01-3-3014	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-3-3014
EP01-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-NSUB
EP02-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP02-NSUB
EP03-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP03-NSUB

EP04-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP04-NSUB
EP05-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP05-NSUB
EP06-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP06-NSUB
EP07-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP07-NSUB
EP08-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP08-NSUB
EP09-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP09-NSUB
EP10-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP10-NSUB
EP11-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP11-NSUB
EP12-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP12-NSUB
EP01-1-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-1-NSUB
EP01-2-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-2-NSUB
EP01-3-NSUB	HC EpCAM23Gv4.2	LC EP01-3-NSUB
EP101-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP101-3014
EP102-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP102-3014
EP103-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP103-3014
EP104-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP104-3014
EP105-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP105-3014
EP106-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP106-3014
EP107-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP107-3014
EP108-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP108-3014
EP109-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP109-3014
EP110-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP110-3014
EP107-1-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP107-1-3014
EP107-1-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP107-2-3014
EP107-1-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP107-3-3014
EP01-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP01-3014
EP02-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP02-3014
EP03-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP03-3014
EP04-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP04-3014
EP05-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP05-3014
EP06-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP06-3014
EP07-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP07-3014
EP08-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP08-3014
EP09-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP09-3014

EP10-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP10-3014
EP11-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP11-3014
EP12-3014 (1565-Y)	HC EpCAM23(1565-Y)	LC EP12-3014
EP01-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP01-3014
EP02-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP02-3014
EP03-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP03-3014
EP04-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP04-3014
EP05-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP05-3014
EP06-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP06-3014
EP07-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP07-3014
EP08-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP08-3014
EP09-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP09-3014
EP10-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP10-3014
EP11-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP11-3014
EP12-3014 (1361-H)	HC EpCAM23(1361-H)	LC EP12-3014

[00469] Твердофазный анализ связывания использовали для демонстрации связывания антител к EpCAM человека по изобретения. Вкратце, рекомбинантный белок EpCAM-mFC человека (Immunogen) наносили на планшеты для ИФА (50 мкл, 1 мкг/мл), а затем инкубировали с серийно разведенными антителами к EpCAM (начиная с 62,5 нМ) или активируемыми антителами к EpCAM (начиная с 1 мкМ), где активируемые антитела анализировали в нерасщепленной форме. Количество связанного антитела определяли с использованием конъюгированного с пероксидазой хрена антитела к IgG человека (анти-Fab) (Sigma) с реагентом Ultra TMB-ELISA (Thermo Fisher Scientific), и измеряли ОП при 450 нМ. K_D измеряли для каждого антитела и активируемого антитела, и рассчитывали эффективность маскировки по ИФА (ME) для каждого активируемого антитела относительно немаскированного антитела, иллюстративные результаты показаны в таблицах 21 и 22. В совокупности эти данные демонстрируют, что активируемые антитела к EpCAM человека по настоящему изобретению демонстрируют смещенную аффинность связывания с рекомбинантным белком EpCAM по сравнению с исходным антителом к EpCAM по настоящему изобретению.

Таблица 21. Эффективность маскировки активируемых антител к EpCAM.

Активируемое антитело к EpCAM	K_D для ИФА (нМ)	Эффективность маскировки по ИФА

EP01-2014	36	99
EP02-2014	7	21
EP03-2014	11	31
EP04-2014	12	34
EP05-2014	17	50
EP06-2014	1	3
EP07-2014	12	38
EP08-2014	15	48
EP09-2014	22	67
EP10-2014	15	42
EP11-2014	21	59
EP12-2014	16	46
EP01-1-2014	53	81
EP01-2-2014	46	100
EP01-3-2014	52	86
EP01-3014	35	100
EP02-3014	7	19
EP03-3014	9	25
EP04-3014	11	31
EP05-3014	16	44
EP06-3014	1	4
EP07-3014	10	27
EP08-3014	13	37
EP09-3014	18	52
EP10-3014	13	35
EP11-3014	20	53
EP12-3014	14	38
EP01-1-3014	59	76
EP01-2-3014	46	102
EP01-3-3014	64	80
EP101-3014 (1565-Y)	389	930
EP102-3014 (1565-Y)	72	173

EP103-3014 (1565-Y)	140	335
EP104-3014 (1565-Y)	126	302
EP105-3014 (1361-H)	201	343
EP106-3014 (1361-H)	348	592
EP107-3014 (1361-H)	147	250
EP108-3014 (1361-H)	58	99
EP109-3014 (1361-H)	512	872
EP110-3014 (1361-H)	336	571

Таблица 22. Эффективность маскировки активируемых антител к EpCAM.

Активируемое антитело к EpCAM	K_D для ИФА (нМ)	Эффективность маскировки по ИФА
EP01-3014 (1565-Y)	0,66	1
EP02-3014 (1565-Y)	34,5	67
EP03-3014 (1565-Y)	64,4	125
EP04-3014 (1565-Y)	26,9	52
EP05-3014 (1565-Y)	8,6	17
EP07-3014 (1565-Y)	37,6	73
EP11-3014 (1565-Y)	38,0	74
EP101-3014 (1565-Y)	388,8	756
EP102-3014 (1565-Y)	72,5	141
EP103-3014 (1565-Y)	140,2	272
EP104-3014 (1565-Y)	126,4	246
EP01-3014 (1361-H)	18,2	32
EP02-3014 (1361-H)	0,44	1
EP03-3014 (1361-H)	4,0	7
EP04-3014 (1361-H)	1,9	3
EP05-3014 (1361-H)	0,46	1
EP07-3014 (1361-H)	1,5	3
EP11-3014 (1361-H)	30,5	54
EP105-3014 (1361-H)	201	358

EP106-3014 (1361-H)	348	619
EP107-3014 (1361-H)	147	261
EP108-3014 (1361-H)	58	103
EP109-3014 (1361-H)	512	911
EP110-3014 (1361-H)	336	597
EP107-1-3014 (1361-H)	31	87
EP107-2-3014 (1361-H)	44	122
EP107-3-3014 (1361-H)	44	123

[00470] Как показано в таблицах 21 и 22, эти иллюстративные результаты продемонстрировали, что активируемые антитела к EpCAM человека показали диапазон маскирующей эффективности по сравнению с немаскированными антителами к EpCAM.

Пример 8. Аффинность связывания активируемых антител анти-EpCAM23Gv4.2, конъюгатов антитело-лекарственное средство и конъюгатов активируемое антитело-лекарственное средство

[00471] Аффинность связывания активируемых антител и конъюгатов активируемое антитело-лекарственное средство («AADC»), содержащих huEpCAM23Gv4.2 и одну из 7 различных масок, оценивали с помощью проточной цитометрии. В частности, активируемые антитела и конъюгаты активируемых антител и лекарственных средств были получены с использованием антитела huEpCAM23Gv4.2, чувствительного к ферменту субстрата 3014 и маски, выбранной из Ep1-2, Ep-2, Ep03, Ep04, Ep05, Ep07 и Ep11. Активируемые антитела, содержащие маску, связанную с антителом нерасщепляемым пептидным фрагментом («NSUB» или «Несубстратный фрагмент»), также были созданы для использования в качестве отрицательного контроля. NSUB не является субстратом для протеаз, и маски не могут быть удалены с активируемого антитела, содержащего NSUB. Соответственно, ожидалось, что активируемые антитела, содержащие NSUB, останутся неактивными даже после обработки uPA.

In vitro активация активируемых антител к EpCAM / AADC

[00472] Для активации активируемые содержащие субстрат антитела к EpCAM in vitro, желаемое количество активируемого антитела было приготовлено в PBS в концентрации 1 мг/мл, и uPA был добавлен к раствору до конечной концентрации 1 мкМ (исходя из концентрации белка). Затем раствор инкубировали при 37 °C в увлажненном инкубаторе с 5% CO2 в течение ночи.

Аффинность связывания активируемых антител к EpCAM

[00473] Аффинность связывания активируемых антител к EpCAM с клетками HSC2 сравнивали с аффинностью связывания исходного антитела huEpCAM23Gv4.2 и между активируемыми антителами в активированной и неактивированной формах. Активируемые антитела активировали, как описано выше. Анализы связывания на основе проточной цитометрии проводили и анализировали, как описано в Примере 2, с использованием вторичных козьих античеловеческих антител, конъюгированных с Alexa Fluor plus 488. Как показано на Фиг. 6A, активируемые антитела без активации имели очень плохое связывание с клетками с кажущимся Kd > $1X10^{-7}$ M, в то время как активированные активируемые антитела сохраняли аффинность связывания на уровне, аналогичном таковому у исходного антитела. Дальнейшие тесты были выполнены для 5 активируемых антител с использованием первичных клеток почки яванского макака, и наблюдались аналогичные результаты (см. Фиг. 6B). Кажущиеся значения Kd активированных и неактивированных активируемых антител различались более чем в 10 раз как в HSC2, так и в первичных эпителиальных клетках почки яванского макака.

Аффинность связывания sSPDB-DM4 и DGN549, конъюгированных с антителом анти-huEpCAM23Gv4.2 и с активируемым антителом анти-huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014.

[00474] Аффинность связывания конъюгатов sSPDB-DM4 и DGN549 ADC с huEpCAM23Gv4.2 и активированных AADC huEpCAM23Gv4.2, содержащих субстрат 3014/NSUB и различные маски, анализировали с использованием клеток HSC2. Активируемые антитела активировали, как описано выше. Анализы связывания на основе проточной цитометрии проводили и анализировали, как описано в Примере 2, с использованием вторичных козьих античеловеческих антител, конъюгированных с Alexa Fluor plus 488. В частности, аффинности связывания активированных AADC DGN549, содержащих субстрат 3014, сравнивали с аффинностью связывания с ADC DGN549, а активированные AADC sSPDB-DM4, содержащие субстраты 3014, сравнивали с ADC sSPDB-DM4 и их аналогами в форме с NSUB. Кривые связывания конъюгатов sSPDB-DM4 представлены на Фиг. 7A, а кривые связывания для конъюгатов DGN549 представлены на Фиг. 7B. Как показано на Фиг. 7A и 7B, активированные AADC имели такое же связывание с клетками HSC2, как и соответствующие ADC. Напротив, AADC, содержащие NSUB, демонстрировали плохое связывание с клетками. Эти данные демонстрируют, что связывающая способность активируемого антитела с клетками может быть восстановлена обработкой uPA, которая удаляет маску с активируемого антитела через субстрат 3014, но не через субстрат NSUB.

Пример 9. Аффинность связывания sSPDB-DM4, DM21 и DGN549,

конъюгированных с huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014 и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014

[00475] Дополнительные активируемые антитела, содержащие huEpCAM23Gv4.2 с маской Ep05, были получены с другим субстратом, 2014. AADC были созданы для дальнейшей оценки путем конъюгирования sSPDB-DM4, DM21L и DGN549 с huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014 и путем конъюгирования sSPDB-DM4 и DM21L с huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014. Аффинность связывания конъюгатов с клетками HSC2 исследовали как в активированных, так и в неактивированных формах, и аффинность AADC сравнивали как с соответствующими активируемыми антителами, так и с антителами дикого типа. Анализы связывания на основе проточной цитометрии проводили и анализировали, как описано в Примере 2, с использованием вторичных конъюгированных с ФЭ козьих античеловеческих антител. Активируемые антитела и AADC активировали, как описано в Примере 8. Аффинность связывания huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-sSPDB-DM4, huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-sSPDB-DM4 и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DGN549 показана на Фиг. 8A, 8B и 8C, соответственно. Аффинность связывания huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L показана на Фиг. 8D. Активированные активируемые антитела и AADC имели аффинность связывания с клетками HSC2, подобную антителу дикого типа, в то время как инактивированные формы плохо связывались с клетками. Эти результаты согласуются с результатами, описанными в Примерах 4-6 и 8.

Пример 10. Картирование эпитопов

[00476] Антиген CD326 человека, EpCAM (адгезивная молекула эпителиальных клеток), состоит из 314 аминокислот, содержащих внеклеточный домен из 265 аминокислот, трансмембранный домен из 23 аминокислот и цитоплазматический хвост из 26 аминокислот. Внеклеточный домен можно дополнительно разделить на три домена (D1, D2 и D3). Внеклеточный домен содержит два богатых лейцином (ЭФР-подобных) повтора эпидермального фактора роста, которые включают первый домен, содержащий область от глутамина в положении 24 зрелого белка (т.е. до расщепления сигнального пептида) до цистеина в положении 59 (см. SEQ ID NO: 2), и второй домен, содержащий область от цистеина в положении 66 до цистеина в положении 135 (см. SEQ ID NO: 3). Затем, в тандеме с первыми двумя доменами, имеется также третий свободный от цистеина домен (D3), который содержит аминокислотные остатки 136-243 (см. SEQ ID NO: 4).

>NP_002345.2 EpCAM, домен D1	QEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVIC (SEQ ID NO: 2)

EpCAM, домен D2	CLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYDAADCDESGLFK AKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITC (SEQ ID NO: 3)
EpCAM, домен D3	SERVRTYWIIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFI TSILYENNVITIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGESLF HSKKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLK (SEQ ID NO: 4)

[00477] Эпитопы для гуманизированного антитела Gv4.2 к EpCAM были картированы путем конструирования химерных белков с использованием комбинаций внеклеточных доменов EpCAM человека и мыши. Поскольку EpCAM человека и мыши имеет более 82% идентичности аминокислотной последовательности и 85% сходства (см. Фиг. 9), топология химерных белков должна оставаться неизменной.

Клонирование и экспрессия химерных вариантов EpCAM

[00478] Внеклеточная область EpCAM человека (остатки 1-265) была кодон-оптимизирована, синтезирована и клонирована в рамке считывания в вектор (pGSmuFc2ANL), содержащий область Fc мышиного IgG2a с использованием сайтов рестрикции HindIII и BamHI в Genscript. Аналогичным образом, другие векторы экспрессии, содержащие различные химерные варианты внеклеточного домена EpCAM человека/мыши, были синтезированы путем замены остатков, соответствующих домену D1 (24-59), домену D2 (66-135), домену D3 (136-265) EpCAM человека или их комбинации с соответствующими мышиными остатками. На Фиг. 10A и 10B показано выравнивание внеклеточной области различных химеризованных вариантов. Эти экспрессирующие конструкции временно получали в адаптированных к суспензии клетках HEK-293T с использованием PEI в качестве реагента для а трансфекции во встряхиваемых колбах. Трансфицированные клетки инкубировали в течение одной недели, собирали и отфильтрованные супернатанты очищали, используя комбинацию хроматографии на белке A и CHT, по существу, используя процедуры, описанные в Примере 1.

Связывание антител с различными конструкциями EpCAM

[00479] Гуманизированное антитело к EpCAM huEpCAM23Gv4.2 тестировали в формате иммуноферментного анализа (ИФА) на связывание с белками EpCAM, описанными выше. Вкратце, каждый белок EpCAM, меченный mFc, очищали с использованием комбинации хроматографии на белке A и CHT, по существу, как описано в Примере 1. Каждый белок EpCAM, меченный mFc, разбавляли до 0,5 мкг/мл в 50 мМ буфере на основе бикарбоната натрия, pH 9,6 и в каждую лунку добавляли 100 мкл. После 16-часовой инкубации при 4°C планшеты промывали трис-буферным солевым раствором с 0,1% Твин-20 (TBST), затем блокировали 200 мкл блокирующего буфера (TBS с 1%

BSA). Затем 100 мкл первичного антитела huEpCAM23Gv4.2, серийно разведенного в блокирующем буфере, добавляли в двух экземплярах в лунки для ИФА и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. Затем планшеты промывали 3 раза TBST перед добавлением 100 мкл конъюгированного с ПХ антитела к человеческому IgG (H + L) в каждую лунку. Планшеты снова инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре а затем трижды промывали TBST. Наконец, 100 мкл TMB однокомпонентного субстрата для микролунок ПХ добавляли в каждую лунку и инкубировали в течение 5 мин. Реакцию останавливали, добавляя 100 мкл стоп-раствора, а оптическую плотность считывали при 450 нм на многолуночном ридере для планшетов. ОП450 наносили против концентрации антитела на полулогарифмическом графике. Кривую доза-ответ строили с помощью нелинейной регрессии, а значение EC_{50} для каждой кривой рассчитывали с использованием GraphPad Prism v6.

[00480] Связывание антитела huEpCAM23Gv4.2 с химерными белками EpCAM оценивали по сравнению с EpCAM дикого типа. На Фиг. 11 показано, что антитело huEpCAM23Gv4.2 связывается как с EpCAM-D2 (66-135), так и с EpCAM-D3 (136-265) с аффинностью, аналогичной аффинности EpCAM дикого типа. Напротив, антитело huEpCAM23Gv4.2 не связывается с конструкциями EpCAM-D1 и D1/D2, а связывание с конструкцией химерного белка EpCAM-D1 (24-59) практически отсутствует. Эти результаты демонстрируют, что эпитоп антитела huEpCAM23Gv4.2 расположен в основном в домене D1 (24-59) EpCAM.

Пример 11. Получение конъюгатов антитело к EpCAM - лекарственное средство и конъюгатов активируемое антитело - лекарственное средство

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-сульфо-SPDB-DM4

[00481] Молярную концентрацию huEpCAM23Gv4.2, сульфо-SPDB и DM4 рассчитывали согласно закону Бера с использованием значений поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра при 280, 343 и 412 нм и коэффициентов экстинкции, соответственно. Концентрацию линкера определяли взаимодействием линкера с 50 мМ DTT в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,5 и измерением высвобождения тиопиридина при 343 нм. Концентрацию лекарственного средства определяют путем приведения в контакт DM4 с 10 мМ DTNB [5,5-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты)] в 50 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7,5 и измерением оптической плотности при 412 нм.

[00482] Перед конъюгацией антител смесь сульфо-SPDB-DM4 in situ была приготовлена путем взаимодействия 5,0 мМ сульфо-SPDB с 6,3 мМ DM4 в 30% водном [50 мМ EPPS pH 8,0 (4-(2-гидроксилэтил)-пиперазинпропансульфоновая кислота)] и 70% органических [(N-N-диметилацетамид, DMA, SAFC)] при 20ºC в течение 90 минут. Во

время реакции конъюгации раствор 8-10 мг/мл антитела приводили в контакт с 5-6-кратным молярным избытком сульфо-SPDB-DM4 относительно антитела в 50 мМ EPPS pH 8,0 с 8% DMA (об./об.), в течение 15-20 часов при 25 °C. Реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, буфера для состава, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через шприц-фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм.

[00483] Молярное соотношение DM4, конъюгированного с антителом (DAR), и процент неконъюгированных молекул майтанзиноида определяли, как описано ниже. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,7 моль DM4/моль антитела по данным спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 95% мономера по данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

[00484] DAR определяли путем измерения поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра при 252 и 280 нм и вычисления [AT] и [DM4] с использованием биномиальных уравнений, которые учитывают вклад каждого компонента. Количество несвязанного майтанзиноида, присутствующего в конечных конъюгатах huEpCAM23Gv4.2-сульфо-SPDB-DM4, рассчитывали из суммарных площадей пиков, наблюдаемых для образцов, проанализированных с помощью колонки HISEP (25 см x 4,6 мм, 5 мкм). Процент свободного майтанзиноида (% FM), присутствующего в образце конъюгата, был рассчитан с использованием следующего уравнения: % свободного майтанзиноида = (PA 252 в обратной фазе из DM4) / (PA 252 в обратной фазе из DM4 + поток через PA 252 из DM4) x 100%.

Получение конъюгата AADC huEpCAM23Gv4.2 - Ep05-3014-сульфо-SPDB-DM4

[00485] Перед конъюгацией антител смесь сульфо-SPDB-DM4 in situ была приготовлена путем взаимодействия 5,0 мМ сульфо-SPDB с 6,3 мМ DM4 в 30% водном [50 мМ EPPS pH 8,0 (4-(2-гидроксилэтил)-пиперазинпропансульфоновая кислота)] и 70% органических [(N-N-диметилацетамид, DMA, SAFC)] при 20°C в течение 90 минут. Во время реакции конъюгации раствор 8-10 мг/мл антитела приводили в контакт с 5-6-кратным молярным избытком сульфо-SPDB-DM4 относительно антитела в 50 мМ EPPS pH 8,0 с 8% DMA (об./об.), в течение 4-5 часов при 25 °C. Реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, буфера для состава, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через шприц-фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,6 моль DM4/моль активируемого антитела по данным спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 98% мономера по

данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

Получение конъюгата AADC huEpCAM23Gv4.2 - Ep05-2014-сульфо-SPDB-DM4

[00486] Перед конъюгацией антител смесь сульфо-SPDB-DM4 in situ была приготовлена путем взаимодействия 5,0 мМ сульфо-SPDB с 6,3 мМ DM4 в 30% водном [50 мМ EPPS pH 8,0 (4-(2-гидроксилэтил)-пиперазинпропансульфоновая кислота)] и 70% органических [(N-N-диметилацетамид, DMA, SAFC)] при 20ºC в течение 90 минут. Во время реакции конъюгации раствор 8-10 мг/мл антитела приводили в контакт с 5-6-кратным молярным избытком сульфо-SPDB-DM4 относительно антитела в 50 мМ EPPS pH 8,0 с 8% DMA (об./об.), в течение 4-5 часов при 25 °C. Реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, буфера для состава, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через шприц-фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,6 моль DM4/моль активируемого антитела по данным спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 98% мономера по данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

Получение конъюгата AADC huEpCAM23Gv4.2 Ep05-NSUB-sulfo-SPDB-DM4

[00487] Перед конъюгацией антител смесь сульфо-SPDB-DM4 in situ была приготовлена путем взаимодействия 5,0 мМ сульфо-SPDB с 6,3 мМ DM4 в 30% водном [50 мМ EPPS pH 8,0 (4-(2-гидроксилэтил)-пиперазинпропансульфоновая кислота)] и 70% органических [(N-N-диметилацетамид, DMA, SAFC)] при 20ºC в течение 90 минут. Во время реакции конъюгации раствор 8-10 мг/мл антитела приводили в контакт с 5-6-кратным молярным избытком сульфо-SPDB-DM4 относительно антитела в 50 мМ EPPS pH 8,0 с 8% DMA (об./об.), в течение 4-5 часов при 25 °C. Реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, буфера для состава, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через шприц-фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,8 моль DM4/моль активируемого антитела по данным спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 99% мономера по данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-GMBS-DM21L

[00488] Молярную концентрацию huEpCAM23Gv4.2, сульфо-GMBS и DM21 рассчитывали согласно закону Бера с использованием значений поглощения в видимой и

ультрафиолетовой областях спектра при 280, 343 и 412 нм и коэффициентов экстинкции, соответственно. Концентрацию линкера определяли взаимодействием линкера с 50 мМ DTT в 50 мМ калий-фосфатном буфере pH 7,5 и измерением высвобождения тиопиридина при 343 нм. Концентрацию лекарственного средства определяют путем приведения в контакт DM21 с 10 мМ DTNB [5,5-дитиобис-(2-нитробензойной кислоты)] в 50 мМ калий-фосфатном буфере при pH 7,5 и измерением оптической плотности при 412 нм.

[00489] Перед конъюгацией получали смесь сульфо-GMBS-DM21 in situ путем приведения в контакт 3 мМ сульфо-GMBS с 3,9 мМ DM21 в 60/40 (об./об.) DMA и сукцинатном буфере, pH 5,0, соответственно. Конъюгацию проводили с 6-7-кратным избытком линкера сульфо-GMBS-DM21 относительно антитела при 5 мг/мл в 60 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновой кислоты (EPPS), pH 8,5, с 15% DMA (об./об.). После 4-5 часов инкубации при 25 °C реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм.

[00490] Молярное соотношение DM21, конъюгированного с антителом (DAR), и процент неконъюгированных молекул майтанзиноида определяли, как описано ниже. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,7 моль DM21/моль антитела по данным спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 95% мономера по данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

[00491] Молярное соотношение DM21, конъюгированного с антителом, (DAR) определяли путем измерения поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра при 252 и 280 нм и вычисления [AT] и [DM21] с использованием биномиальных уравнений, которые учитывают вклад каждого компонента. Количество несвязанного майтанзиноида, присутствующего в конечных конъюгатах huEpCAM23Gv4.2-GMBS-DM21, рассчитывали из суммарных площадей пиков, наблюдаемых для образцов, проанализированных с помощью колонки HISEP (25 см x 4,6 мм, 5 мкм). Процент свободного майтанзиноида (% FM), присутствующего в образце конъюгата, был рассчитан с использованием следующего уравнения: % свободного майтанзиноида = (PA 252 в обратной фазе из DM21) / (PA 252 в обратной фазе из DM21 + поток через PA 252 из DM21) x 100%.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2 Ep05-3014-GMBS-DM21L

[00492] Перед конъюгацией получали смесь сульфо-GMBS-DM21 in situ путем приведения в контакт 3 мМ сульфо-GMBS с 3,9 мМ DM21 в 60/40 (об./об.) DMA и

сукцинатном буфере, pH 5,0, соответственно. Конъюгацию проводили с 6-7-кратным избытком линкера сульфо-GMBS-DM21 относительно активируемого антитела при 5 мг/мл в 60 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновой кислоты (EPPS), pH 8,5, с 15% DMA (об./об.). После 4-5 часов инкубации при 25 °C реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,6 моль DM21/моль активируемого антитела по спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 99% мономера по данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2 Ep05-2014-GMBS-DM21L

[00493] Перед конъюгацией получали смесь сульфо-GMBS-DM21 in situ путем приведения в контакт 3 мМ сульфо-GMBS с 3,9 мМ DM21 в 60/40 (об./об.) DMA и сукцинатном буфере, pH 5,0, соответственно. Конъюгацию проводили с 6-7-кратным избытком линкера сульфо-GMBS-DM21 относительно активируемого антитела при 5 мг/мл в 60 мМ 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинпропансульфоновой кислоты (EPPS), pH 8,5, с 15% DMA (об./об.). После 4-5 часов инкубации при 25 °C реакционную смесь очищали в 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, pH 5,0, используя колонки для обессоливания NAP, и фильтровали через фильтр с мембраной из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Было обнаружено, что очищенный конъюгат содержит 3,6 моль DM21/моль активируемого антитела по спектроскопии в видимой и ультрафиолетовой областях спектра, 99% мономера по данным ЭХ и менее 1% свободного лекарственного средства по данным анализа ВЭЖХ на колонке Hisep.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-DGN549 (связанных через лизин)

[00494] Молярные концентрации huEpCAM23Gv4.2 и SO_3-DGN549-NHS были рассчитаны в соответствии с законом Бера с использованием значений поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра при 280 и 330 нм и их коэффициентов экстинкции, соответственно. Исходный раствор лекарственного средства DGN549-NHS был приготовлен в DMA и разбавлен этанолом для измерения поглощения при 330 нм. Реакцию сульфирования DGN549-NHS проводили путем добавления 5-10-кратного молярного избытка $NaHSO_3$ относительно DGN549-NHS в 90% DMA и 10% 50 мМ сукцината, pH 5,0, при комнатной температуре в течение 3-4 часов.

[00495] Конъюгаты huEpCAM23Gv4.2-DGN549 получали путем взаимодействия 4-5-кратного молярного избытка сульфированного реагента DGN549-NHS (D2) относительно антитела при 2 мг/мл в 50 мМ EPPS pH 8,0, 15% DMA (об./об.).

Реакцию проводили при 25ºC в течение 3-5 часов. Реакционную смесь очищали на колонках с сефадексом G-25, уравновешенных в буфере, содержащем 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 5,0, и фильтровали через 0,22 мкм фильтр из ПВДФ. Молярное соотношение DGN549 на антитело (DAR) и процент от общего количества свободных частиц DGN549 определяли, как описано ниже. Конъюгат huEpCAM23Gv4.2-DGN549 с 2,7 молекулами DGN549 на антитело был получен с <1% присутствия в виде неконъюгированного DGN549.

[00496] Для конъюгатов DGN DAR определяли путем измерения поглощения в видимой и ультрафиолетовой областях спектра при 280 и 330 нм и вычисления [Ат] и [DGN549] в соответствии с законом Бера. Для определения количества неконъюгированного DGN549 конъюгат пропускали через систему с двумя колонками (колонки TOSOH SEC QC-PAK GFC 300 и Agilent Zorbax C18) для расчета общей AUC для свободного DGN549. Сообщалось, что свободный DGN549 представляет собой отношение неконъюгированного DGN549 к общему количеству DGN549.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DGN549 (связанных через лизин)

[00497] Конъюгаты huEpCAM23Gv4.2-DGN549 получали путем взаимодействия 4-5-кратного молярного избытка сульфированного реагента DGN549-NHS (D2) относительно активируемого антитела при 2 мг/мл в 50 мМ EPPS pH 8,0, 15% DMA (об./об.). Реакцию проводили при 25ºC в течение 3-5 часов. Реакционную смесь очищали на колонках с сефадексом G-25, уравновешенных в буфере, содержащем 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 5,0, и фильтровали через 0,22 мкм фильтр из ПВДФ. Конъюгаты с 2,6 молекулами DGN549 на активируемое антитело были получены с <1% присутствия в виде неконъюгированного DGN549.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DGN549 (связанных через лизин)

[00498] Конъюгаты huEpCAM23Gv4.2-DGN549 получали путем взаимодействия 4-5-кратного молярного избытка сульфированного реагента DGN549-NHS (D2) относительно активируемого антитела при 2 мг/мл в 50 мМ EPPS pH 8,0, 15% DMA (об./об.). Реакцию проводили при 25ºC в течение 3-5 часов. Реакционную смесь очищали на колонках с сефадексом G-25, уравновешенных в буфере, содержащем 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 5,0, и фильтровали через 0,22 мкм фильтр из ПВДФ. Конъюгаты с 2,8 молекулами DGN549 на активируемое антитело были получены с <1% присутствия в виде

неконъюгированного DGN549.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-Ep05-NSUB-DGN549 (связанных через лизин)

[00499] Конъюгаты huEpCAM23Gv4.2-DGN549 получали путем взаимодействия 4-5-кратного молярного избытка сульфированного реагента DGN549-NHS (D2) относительно активируемого антитела при 2 мг/мл в 50 мМ EPPS pH 8,0, 15% DMA (об./об.). Реакцию проводили при 25°C в течение 3-5 часов. Реакционную смесь очищали на колонках с сефадексом G-25, уравновешенных в буфере, содержащем 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы и 0,01% Твин-20, 50 мкМ бисульфита натрия, pH 5,0, и фильтровали через 0,22 мкм фильтр из ПВДФ. Конъюгаты с 2,9 молекулами DGN549 на активируемое антитело были получены с <1% присутствия в виде неконъюгированного DGN549.

Получение конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-C442-DGN549

[00500] Антитело huEpCAM23Gv4.2-C442, несущее два неспаренных остатка цистеина в восстановленном состоянии, получали с использованием стандартных процедур. Реакцию конъюгации проводили с использованием этого промежуточного продукта при конечной концентрации антител 1 мг/мл в PBS, содержащем 5 мМ ЭДТА, pH 6,0 и 10 молярных эквивалентах Mal-DGN549 (или D5, в виде 8,2 мМ исходного раствора в DMA) с 2% об. DMA и 38% об. пропиленгликоля. Реакцию конъюгации проводили в течение 15-20 часов на водяной бане при 25 °C. Конъюгат очищали в буфере, содержащем 10 мМ гистидина, 250 мМ глицина, 1% сахарозы, 0,01% Твин-20 и 50 мкМ бисульфита натрия, pH 5,0, через колонки с сефадексом G-25 и фильтровали через шприц-фильтр из ПВДФ с размером пор 0,22 мкм. Конъюгаты с 2,0 молекулами DGN549 на антитело были получены с <1% присутствия в виде неконъюгированного DGN549.

Пример 12. Цитотоксичность in vitro конъюгатов антител к EpCAM и активируемых антител к EpCAM

[00501] Способность нацеленных на EpCAM конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) и активируемых конъюгатов антитело-лекарственное средство (AADC) уничтожать опухолевые клетки измеряли с использованием анализов цитотоксичности in vitro. Для оценки специфического уничтожения измеряли активность ADC к EpCAM с блокирующим антителом и без него. Вкратце, клетки-мишени высевали из расчета 2000 клеток на лунку в 100 мкл полной среды для культивирования клеток, рекомендованной ATCC. К раствору добавляли 50 мкл/лунку только среды (неблокирующее состояние) или голого антитела к EpCAM (для блокирования) при 500 нМ. Конъюгаты серийно разводили в полной среде для культивирования клеток и

добавляли по 50 мкл каждого разведения на лунку. Конечная концентрация конъюгатов, как правило, составляла от 1,5 x 10^{-13} М до 5 x 10^{-8} М. Затем клетки инкубировали при 37 °С в увлажненном инкубаторе с 5% CO2 в течение 5-6 дней, и жизнеспособность оставшихся клеток определяли колориметрическим анализом WST-8. WST-8 восстанавливается дегидрогеназами в живых клетках до оранжевого формазана, который растворим в среде для культивирования тканей, и количество продуцируемого формазана прямо пропорционально количеству живых клеток. WST-8 добавляли к 10% от конечного объема, и планшеты инкубировали при 37 °С в увлажненном инкубаторе с 5% CO2 в течение дополнительных 2-4 часов. Планшеты анализировали путем измерения оптической плотности при 450 нм (A450) в многолуночном ридере для планшетов, и фоновую оптическую плотность A450 лунок со средой и только WST-8 вычитали из всех значений. Процент жизнеспособности рассчитывали путем деления значения каждого обработанного образца на среднее значение лунок с необработанными клетками. Процент жизнеспособности = 100* (обработанный образец при A450 - фон при A450) / (необработанный образец при A450 - фон A450). Процентное значение жизнеспособности наносили на график зависимости от концентрации антитела на полулогарифмическом графике для каждой обработки, кривую доза-ответ строили с помощью нелинейной регрессии, а значение EC_{50} для каждой кривой рассчитывали с использованием GraphPad Prism 6.

Цитотоксическая активность ADC к EpCAM in vitro при НМРЛ, КРР и ЗНГШ

[00502] Цитотоксичность in vitro конъюгата huEpCAM23Gv4.2-sSBDP-DM4 оценивали с блокированием антителом EpCAM и без него в экспрессирующих EpCAM линиях клеток НМРЛ H1568, H292 и H2110, линии клеток КРР LoVo и линии клеток ЗНГШ Detroit562. Результаты анализов цитотоксичности показаны на Фиг. 12A-12E. В частности, huEpCAM23Gv4.2-sSBDP-DM4 имел специфическое уничтожение клеток во всех пяти протестированных линиях клеток. Значения EC50 для конъюгата huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4 без блокирования составляли 0,06 нМ на клетках H1568, 0,07 нМ на клетках H292, 0,09 нМ на клетках H2110, 0,02 нМ на клетках Lovo и 0,03 нМ на клетках Detroit562. Напротив, блокирование того же конъюгата антителом к EpCAM приводило к гибели клеток со значением EC50 3,9 нМ на клетках H1568, 2,2 нМ на клетках H292, 2,8 нМ на клетках H2110, 20 нМ на клетках Lovo и 1,4 нМ на клетках Detroit562.

[00503] Кроме того, DGN549 был конъюгирован с huEpCAM23Gv4.2 по Lys и сайт-специфичным сайтам C442, соответственно. Конъюгаты оценивали и сравнивали с ненацеленным конъюгатом изотипического контроля IgG1, chKTI-DGN549, с клетками

H2110. Как показано на Фиг. 12F, оба конъюгата, huEpCAM23Gv4.2-lys-DGN549 и –C442-DGN549, имели аналогичную EC50 и были более чем в 100 раз эффективнее, чем chKTI-DGN549.

[00504] В дополнительных экспериментах DM21 конъюгировали с huEpCAM23Gv4.2. Активность конъюгата huEpCAM23Gv4.2-DM21L оценивали с блокированием huEpCAM23Gv4.2 и без него на четырех линиях клеток НМРЛ и одной линии клеток злокачественного новообразования головы и шеи. Результаты, приведенные на Фиг. 12G-12K, указывают на то, что конъюгат huEpCAM23Gv4.2-DM21L является активным по отношению ко всем пяти тестируемым линиям клеток и что цитотоксичность может быть заблокирована добавлением исходного антитела.

Цитотоксическая активность AADC к EpCAM in vitro в линиях клеток НМРЛ и злокачественного новообразования яичников

[00505] Для увеличения цитотоксической активности in vitro, наблюдаемой для конъюгатов huEpCAM23Gv4.2-sSPDB-DM4, DM21 и DGN549, были получены AADC к EpCAM с теми же полезными нагрузками. В частности, sSPDB-DM4 и DM21L были конъюгированы с активируемыми антителами huEpCAM-Ep05-3014 и huEpCAM-Ep05-2014, а DGN549 был конъюгирован с huEpCAM23Gv4.2-3014. Активность конъюгатов DM4, DM21 и DGN549 анализировали на линиях клеток НМРЛ Calu3, EBC-1 и H2110. Кроме того, AADC DM21L были протестированы на клетках Detroit562, а AADC DM4 и DGN549 на клетках OV90, соответственно. Активность AADC оценивали в активированной и неактивированной формах и сравнивали с их аналогом, нацеленным на EpCAM ADC, или с конъюгатом ненацеленного изотипического контроля IgG1, chKTI ADC. Активацию AADC in vitro проводили, как описано в Примере 8. Результаты иллюстративных анализов цитотоксичности показаны на Фиг. 13-15. В частности, активность конъюгатов DM4 in vitro показана на Фиг. 13A-13D, активность конъюгатов DM21L in vitro показана на Фиг. 14A-14D, а активность конъюгатов DGN549 in vitro показана на Фиг. 15A-15D. Как и ожидалось, активированные AADC обладали такой же активностью, что и специфичные для ADC к EpCAM, а неактивированные AADC гораздо менее эффективны для клеток. Значения EC50 варьировались от 0,06 до 0,46 нМ для ADC sSPDB-DM4 и от 0,08 до 1,4 нМ для активированного AADC sSPDB-DM4 (см. таблицу 23). EC50 для активированных AADC DM21 варьировала от 0,3 до 2 нМ (см. таблицу 24). Кроме того, ADC huEpCAM-DGN549 и активированный AADC huEpCAM-Ep05-3014-DGN549 были очень эффективными со значениями EC50 в диапазоне от 0,006 до 0,02 нМ для ADC и от 0,017 до 0,06 нМ для AADC (см. таблицу 25). Эти результаты демонстрируют, что хорошее окно специфичности наблюдается как для конъюгатов ADC,

так и для конъюгатов AADC, предполагая, что цитотоксичность является результатом связывания антител к EpCAM с клетками-мишенями.

Таблица 23. EC_{50} и окно специфичности для цитотоксичности sSPDB-DM4, конъюгированного с антителом huEpCAM23Gv4.2, и активируемыми антителами в линиях клеток НМРЛ, Calu3, EBC-1 и H2110, а также в линии клеток злокачественного новообразования яичников OV90.

Клетки	huEpCAM-sSPDB-DM4 ADC IC50 нМ	chKTI-sSPDB-DM4 IC50 нМ	окно специфичности	EP05-2014-DM4 + uPA IC50 нМ	EP05-2014-DM4 без uPA IC50 нМ	окно специфичности	EP05-3014-DM4 IC50 нМ	EP05-3014-DM4 IC50 нМ	окно специфичности
				uPA	без uPA		uPA	без uPA	
Calu3	**0.46**	**25.3**	**55**	**0.31**	**5.6**	**18**	**1.4**	**34**	**24**
EBC-1	**0.08**	**2.1**	**26**	**0.15**	**3.3**	**22**	**0.1**	**3.6**	**36**
H2110	**0.094**	**1.3**	**13**	**0.13**	**2.9**	**22**	**0.14**	**3.5**	**25**
OV90	**0.06**	**2.5**	**42**	**0.08**	**1.4**	**18**	**0.1**	**2.6**	**26**

Таблица 24. EC_{50} и окно специфичности для цитотоксичности huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21 и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21 в линиях клеток НМРЛ, Calu3, EBC-1 и H2110 и линии раковых клеток ЗНГШ Detroit562.

Клетки	EpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21		окно специфичности	EpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21		окно специфичности
	Неактивирован	Активирован		Неактивирован	Активирован	
Calu3	39	2	20	33	0.8	41
EBC-1	11	0.6	18	12	0.4	30
H2110	27	1.1	25	26	0.4	65
Detroit562	40	0.8	50	34	0.29	117

Таблица 25. EC_{50} и окно специфичности для цитотоксичности ADC huEpCAM23Gv4.2-DGN549 и huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DGN549 в линиях клеток НМРЛ, Calu3, EBC-1 и H2110 и линии клеток злокачественного новообразования яичников OV90.

Клетки	EpCAM-DGN549 ADC EC50 нМ	chKTI-DGN549 EC50 нМ	окно специфичности	Ep05-3014-DGN549 EC50 нМ	Ep05-3014-DGN549 EC50 нМ	окно специфичности
Lot#E				uPA	без uPA	
Calu3	**0.01**	**3.6**	360	**0.04**	**0.91**	**23**
EBC-1	**0.004**	**13.1**	3275	**0.01**	**0.68**	**68**
H2110	**0.02**	**21.1**	1055	**0.06**	**2**	**33**
OV90	**0.006**	**6.3**	1050	**0.017**	**0.59**	**35**

[00506] Активность in vitro AADC huEpCAM23Gv4.2-DGN549, содержащих дополнительные маски, также оценивалась и сравнивалась с эффективностью отдельных масок. Как показано в таблице 26, окно активности in vitro AADC huEpCAM23Gv4.2

хорошо коррелирует с эффективностью маски.

Таблица 26. Активность AADC к EpCAM in vitro по сравнению с эффективностью маски (ME).

ADC/AADC	ME	Конъюгаты DGN549		
		IC50 (нМ)		Окно специфичности
huEpCAMGv4.2-DGN549	-	0,025		176
Ненацеленный ADC DGN549	-	4,4		
		Активирован	Интактный	Окно специфичности
huEpCAM23Gv4.2-Ep01-2-3014-DGN549	100	0,019	2,5	132
huEpCAM23Gv4.2-Ep11-3014-DGN549	53	0,018	1,6	89
huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DGN549	44	0,056	1,3	23
huEpCAM23Gv4.2-Ep04-3014-DGN549	31	0,076	1,7	23
huEpCAM23Gv4.2-Ep07-3014-DGN549	27	0,043	1	23
huEpCAM23Gv4.2-Ep03-3014-DGN549	25	0,04	0,61	15
huEpCAM23Gv4.2-Ep02-3014-DGN549	19	0,039	0,2	5

Пример 13. Активность ADC и AADC к EpCAM у мышей SCID CB17, несущих ксенотрансплантаты человеческого НМРЛ NCI-H2110

[00507] Противоопухолевая активность различных доз конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC) EpCAMG23v4.2-DGN549 и huEpCAMG23v4.2-s-SPDB-DM4, а также их производных активируемых конъюгатов антитело-лекарственное

средство (AADC), состоящих из замаскированных антител, содержащих субстраты или 3014 или 2014, была оценена в серии исследований in vivo. Исследования проводили на самках мышей SCID CB17 в возрасте 6-8 недель (CB17/lcr-PrdxSCID), несущих опухоли NCI-H2110, на модели подкожного ксенотрансплантата НМРЛ человека. Животные были получены из лабораторий Charles River и не демонстрировали признаков заболевания в течение 5-дневного периода наблюдения перед введением их в исследование.

[00508] Клетки NCI-H2110 собирали из культуры ткани с устойчивой жизнеспособностью >98%, определяемой при помощи вытеснения трипанового синего. Каждой мыши инокулировали 10^7 клеток NCI-H2110 в 0,1 мл раствора 1: 1 бессывороточной среды и матригеля (SFM: Mat) путем подкожной инъекции в правый бок с использованием иглы 27-го размера. Мышей рандомизировали в группы лечения перед введением препаратов (тестируемые агенты и контрольный носитель) на основе объема их опухоли (ОО). На следующий день животным вводили препарат в зависимости от индивидуальной массы тела (BW). Препараты вводили в виде одиночного в/в болюса, используя шприц объемом 1,0 мл, снабженный иглой 27-го размера.

[00509] Объем опухоли (ОО) и массу тела (BW) регистрировали в программе StudyDirector два раза в неделю. Объем опухоли ($мм^3$) оценивали с помощью штангенциркуля по формуле для объема цилиндра, как: ОО ($мм^3$) = (Д x Ш x В) / 2, где Д, Ш и В - соответствующие ортогональные размеры длины, ширины и высоты опухоли (в мм). Массу тела (г) мышей использовали для отслеживания изменения массы тела (BWC) у получавших лечение животных, которую выражали в процентах от массы тела в заданное время измерения (BWt) по сравнению с исходной массой тела до лечения (BWi), рассчитанного следующим образом: % BWC = [(BWt / BWi) - 1] x 100.

[00510] Основными конечными точками, используемыми для оценки эффективности лечения, были ингибирование роста опухоли и регрессия опухоли. Ингибирование роста опухоли (ИРО) представляет собой отношение медианного ОО получавшей лечение группы (Т) к медианному ОО контрольной группы, получавшей плацебо, (С), когда она достигает размера, близкого 1000 $мм^3$, и выражается в процентах от исходного ОО во время рандомизации, используя формулу: ИРО = Т / С x 100. Согласно стандартам NCI, ИРО $\leq$ 42% представляет собой минимальный уровень противоопухолевой активности (обозначен А для активного), ИРО <10% считается высоким уровнем противоопухолевой активности (обозначен НА для высокоактивного), в то время как лечение с ИРО >42% считается неактивным (IA). Было определено, что мышь имеет частичную регрессию (ЧР), когда ее ОО снижается на 50% или больше по сравнению с ОО во время лечения, полную регрессию опухоли (ПР), когда пальпируемая

опухоль не может быть обнаружена, и имеет безопухолевую выживаемость (БОВ), если опухоль отсутствует в конце исследования (КИ).

[00511] Вторичной конечной точкой, определяющей эффективность соединения, является задержка роста опухоли, измеряемая по активности LCK (логарифм уничтожения клеток) и увеличению продолжительности жизни (УПЖ). Активность LCK рассчитывается по формуле: LCK = (T-C)/(Td x 3,32), где T представляет собой среднюю выживаемость группы (дни) без учета БОВ, C представляет собой среднюю выживаемость контрольной группы (дни), и Td представляет собой время удвоения опухоли (дни), как определено по медиане ОО для контрольной группы (носитель) в зависимости от времени. Согласно стандартам NCI, LCK> 2,8 определяет соединение как высокоактивное (++++), LCK в [0,7; 2,8] определяет соединение как активное (определены 3 уровня), а LCK <0,7 определяет соединение как неактивное (-). Увеличение продолжительности жизни (УПЖ) выражается в процентах от средней выживаемости получавшей лечение группы (T) (включая всех животных) по сравнению с контрольной группой (C) по формуле

[00512] УПЖ = (T-C)/C x 100. Согласно стандартам NCI, УПЖ ≥ 25% означает минимальный уровень активности, а УПЖ ≥ 50% означает высокий уровень активности.

[00513] Мышей умерщвляли, если размер опухоли превышал 1000 мм3; если животные теряли более 20% своей первоначальной массы тела (% BWC <-20%), что является приблизительным показателем токсичности; если опухоли приобрели некротический характер; или если мыши умирали в какой-либо момент во время исследования.

Эффективность huEpCAMG23v4.2-DGN549 in vivo

[00514] Мышей инокулировали и рандомизировали через 6 дней после инокуляции (дпи) в группы по 6 мышей. Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 118 до 122,1 мм^3. Исследование закончили через 116 дней после инокуляции (КИ = 116 дпи).

[00515] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), и три группы ADC huEpCAMG23v4.2-DGN549, которым вводили дозы в 0,5, 1,5 и 3 мкг/кг, соответственно, причем все дозы основывались на концентрации лекарственного средства.

[00516] В этом исследовании ИРО определяли на 27 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо достигала 1070,4 мм^3.

[00517] Результаты исследования представлены на Фиг. 16. Все препараты в указанных дозах переносились хорошо, потери массы не наблюдали. ADC

huEpCAM23Gv4.2-DGN549 был высокоактивным (НА) при 3 мкг/кг со значением ИРО 1,8%, 6/6 ЧР, 3/6 ПР и 1/6 TSF. Кроме того, эта группа также показала LCK = 1,77, что определяет лечение как активное (++), и 179% УПЖ (высокоактивное), демонстрируя хорошую задержку роста опухоли. Регрессию опухоли при схеме 3 мкг/кг начался в первые моменты времени после введения ADC и привел к множественной частичной регрессии уже через 7 дней после лечения. В частности, доза 1,5 мкг/кг была активной, со значением ИРО 31,6%, ЧР 1/6 и УПЖ 46% (активное). Напротив, доза 0,5 мкг/кг huEpCAM23Gv4.2-DGN549 была неактивной. Соответственно, эти данные демонстрируют, что лечение huEpCAM23Gv4.2-DGN549 вызывает высокую частоту регрессии опухоли в этой модели опухоли и приводит к сильной противоопухолевой активности при таких низких дозах, как 1,5 мкг/кг.

Эффективность маскированного EpCAM-DGN549, содержащего маскирующие фрагменты Ep02, Ep01-02, Ep11 и Ep04 с расщепляемым фрагментом 3014

[00518] Мышей инокулировали и рандомизировали через 6 дней после инокуляции (дпи) в группы по 6 мышей. Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 105,8 до 115,4 мм^3. Исследование закончили через 120 дней после инокуляции (КИ = 120 дпи).

[00519] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), и четыре группы AADC с маскированным huEpCAMG23v4.2-DGN549 (т. е. AADC, имеющие маски Ep02, Ep01-02, Ep11 и Ep04, связанные с субстратом 3014), вводимые в 3 и 5 мкг/кг на основе концентрации лекарственного средства. Группа положительного контроля, получавшая ADC huEpCAM23Gv4.2-DGN549 в дозе 5 мкг/кг, также была включена в это исследование.

[00520] В этом исследовании ИРО определяли на 25 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1072,4 мм^3.

[00521] Результаты исследования показаны на Фиг. 17А. Все препараты хорошо переносились в указанных дозах, и в этом исследовании не наблюдали потери массы тела.

[00522] ADC huEpCAM23Gv4.2-DGN549 был высокоактивным (НА) при 5 мкг/кг, со значением ИРО 0,3%, 6/6 ЧР, 6/6 ПР, 6/6 животных без опухолей в конце исследования, и на 120 дпи, что привело к 380% УПЖ.

[00523] Ep01-02-3014-DGN549 продемонстрировал минимальную активность при 5 мкг/кг, с 34,5% ИРО и 48% УПЖ. Ep11-3014-DGN549 был активен при дозе 5 мкг/кг, с 10,1% ИРО, 1/6 ЧР, 0,89 LCK (+) и 78% УПЖ, но был неактивен при более низкой дозе. AADC Ep02-3014-DGN549 был активен при 3 мкг/кг (38,6% ИРО, 1/6 ЧР) и

высокоактивен при 5 мкг/кг (9,9% ИРО, 2/6 ЧР, 66% УПЖ). AADC Ep04-3014-DGN549 был активен при 3 мкг/кг (19,7% ИРО, 60% УПЖ) и был высокоактивен при 5 мкг/кг (4,2% ИРО), вызывая множественные регрессии (6/6 ЧР, 1/6 ПР) и значительно увеличивая продолжительность жизни группы (LCK = 1,48, 144% УПЖ). Соответственно, эти данные демонстрируют, что лечение AADC Ep04-DGN549 высокоэффективно в этой модели опухоли в дозе 5 мкг/кг, тогда как лечение AADC Ep02- и Ep01-02-, и Ep11-3014-DGN549 демонстрируют меньшую противоопухолевую активность.

Эффективность маскированного EpCAM-DGN549, имеющего маски Ep03, Ep05, Ep07 и Ep04 с расщепляемым фрагментом 3014

[00524] Мышей инокулировали и рандомизировали через 6 дней после инокуляции (дпи) в группы по 6 мышей. Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 98,5 до 104,8 мм^3. Исследование закончили через 118 дней после инокуляции (КИ = 118 дпи).

[00525] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), и четыре группы AADC с маскированным huEpCAMG23v4.2-DGN549 (т. е. AADC, имеющие маски Ep03, Ep05, Ep07 и Ep04, связанные с субстратом 3014), вводимые в 3 и 5 мкг/кг на основе концентрации лекарственного средства. Группа отрицательного контроля, в которой вводили AADC с нерасщепляемой маской Ep04, Ep04-NSUB-DGN549, также была включена, как и группа положительного контроля, получавшая ADC huEpCAM23Gv4.2-DGN549 в дозе 5 мкг/кг.

[00526] В этом исследовании ИРО определяли на 25 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1293,4 мм^3.

[00527] Результаты этих исследований представлены на Фиг. 17B. Все препараты хорошо переносились в указанных дозах, и в этом исследовании не наблюдали потери массы тела.

[00528] ADC huEpCAM23Gv4.2-DGN549, используемый в качестве положительного контроля, был высокоактивным (НА) при 5 мкг/кг на основании ингибирования роста опухоли (ИРО = 0,0%), множественных регрессий (6/6 ЧР, 6/6 ПР и 6/6 животных без опухоли в конце исследования, 118 дпи) и общей задержкой роста опухоли (372% УПЖ), что согласуется с предыдущими результатами.

[00529] Как и ожидалось, нерасщепляемый Ep04-NSUB-DGN549 был неактивным (ИРО = 43,6%, LCK = 0,5) и не вызывал регрессии, при этом небольшое ингибирование роста опухоли, вероятно, было связано с полезной нагрузкой, а не с конкретным антиген-направленным противоопухолевым ответом. В соответствии с предыдущими результатами, AADC Ep04-3014-DGN549, введенный в дозе 5 мкг/кг,

продемонстрировал активность, которая определялась по ингибированию роста опухоли (ИРО = 3,2%) и задержке роста опухоли (LCK = 2,37, +++ и 210% УПЖ), и вызывал множественные регрессии (5/6 ЧР, 3/6 ПР и 2/6 БОВ).

[00530] AADC Ep03- и Ep07-3014-DGN549 были активны при 3 мкг/кг, со степенью ингибирования роста опухоли 21,7% и 35,9%, соответственно, и значениями LCK 0,79 (+) и 44% УПЖ, но не вызывали регрессии при этой дозе. При 5 мкг/кг AADC как Ep03-, так и Ep07-3014-DGN549 были высокоактивными (ИРО 7,6% и 6,4%, соответственно, LCK = 1,69 (++), 94% УПЖ) и вызвали несколько регрессий (2/6 и 3/6 ЧР, соответственно).

[00531] AADC Ep05-3014-DGN549 был активен при 3 мкг/кг (17,5% ИРО, 1/6 ЧР, LCK = 1,4 (++) и 78% УПЖ) и был высокоактивным при 5 мкг/кг, как и AADC Ep04-3014-DGN549. В частности, Ep05-3014-DGN549 AADC, введенный в дозе 5 мкг/кг, продемонстрировал ингибирование роста опухоли до 3,7%, LCK = 2,4 (+++), 134% УПЖ и множественные регрессии (6/6 ЧР, 2/6 ПР). Соответственно, эти данные демонстрируют, что лечение AADC Ep04- и Ep05-3014-EpCAM приводит к высокой активности в этой модели при 5 мкг/кг. Как Ep04-, так и Ep05-3014-DGN549 индуцировали множественные события регрессии опухоли при этой дозе и оставались активными при более низкой дозе 3 мкг/кг.

Эффективность Ep05-2014-DM4 и Ep05-2014-DGN549

[00532] Мышей инокулировали и рандомизировали в группы по 6 мышей через 7 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 96,7 до 102,3 мм^3. Исследование закончили через 58 дней после инокуляции (КИ = 58 дпи).

[00533] В части 1 этого исследования группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), и две группы AADC с маскированным huEpCAMG23v4.2-DGN549 (т. е. AADC с расщепляемой маской, имеющей субстрат 3014, и AADC в нерасщепляемой форме - NSUB (без субстрата)) вводили в дозе 5 мкг/кг на основании концентрации лекарственного средства. В Части 2 этого исследования группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группы ADC huEpCAMG23v4.2-s-SPDB-DM4, вводимые в дозах 15, 30 и 45 мкг/кг (в зависимости от концентрации лекарственного средства), две группы Ep01-02-2014-s-SPDB AADC (вводимые в дозах 45 и 30 мкг/кг) и группу нерасщепляемого варианта Ep01-02-NSUB-s-SPDB-DM4.

[00534] В этом исследовании ИРО определяли на 23 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1156,9 мм^3.

[00535] Результаты исследования показаны на Фиг. 17C и 17D. Все препараты хорошо переносились в указанных дозах, и в этом исследовании не наблюдали потери массы тела.

A. Эффективность AADC замаскированного EpCAM-3014-DGN549, имеющего маски Ep05 и Ep07.

[00536] Результаты части A этого исследования показаны на Фиг. 17C. AADC Ep05-3014-DGN549 и Ep07-3014-DGN549, вводимые в дозе 5 мкг/кг, были высокоактивными (HA) на основании ингибирования роста опухоли (2,9 и 3,9%), с множественной частичной регрессией (6/6 и 5/6, соответственно), но без ПР и без БОВ в конце исследования (58 дпи). Медиана выживаемости была >58 дней для группы, получавшей AADC Ep05-3014-DGN549, и 56 дней для группы, получавшей AADC Ep07-3014-DGN549, что привело к значениям LCK 2,56 и 2,41, соответственно (активность +++), и соответствующие УПЖ >152% и 143%, соответственно. Как и ожидалось, нерасщепляемые AADC Ep05-NSUB-DGN549 и Ep07-NSUB-DGN549 были неактивными (ИРО> 70%, LCK = 0,29 и УПЖ = 17%).

B. Эффективность huEpCAMG23v4.2-s-SPDB-DM4 и Ep01-02-2014-s-SPDB-DM4.

[00537] Результаты части B этого исследования показаны на Фиг. 17D. Эффективность майтанзиноидной полезной нагрузки тестировали с ADC huEpCAMG23Gv4.2-s-SPDB-DM4 (исходный EpCAM-DM4), который вводили в дозе 45, 30 и 15 мкг/кг на основании концентрации лекарственного средства. Исходный ADC EpCAM-DM4 был высокоактивен в дозах всего 30 мкг/кг (ИРО <1%, УПЖ >152%) и вызывал множественные регрессии (6/6 ЧР, 6/6 и 5/6 ПР и БОВ, соответственно, для доз 45 и 30 мкг/кг). При дозе 15 мкг/кг исходный ADC EpCAM-DM4 оставался активным (ИРО = 20,3%, LCK = 1,02), и в то время как множественные ЧР (6/6) не все достигали ПР и БОВ (1/6) продолжительность жизни группы была увеличена на 70% по сравнению с контрольной группой (носитель). Эффективность майтанзиноидной полезной нагрузки также была протестирована в формате AADC с использованием маски Ep01-02 и субстрата 2014: Ep01-02-2014-DM4. Доза 45 мкг/кг продемонстрировала минимальную активность в отношении ингибирования роста опухоли (35,6%), но не вызвала никаких регрессий и лишь немного увеличила продолжительность жизни группы. В совокупности эти данные демонстрируют, что противоопухолевая активность AADC EpCAM-DGN549 является опухолеспецифической (поскольку AADC, содержащие Ат с отщепляемыми масками, неактивны), и что полезная нагрузка расщепляемого DM4 очень активна в формате ADC с ограниченной активностью полезной нагрузки в виде DM4 в формате AADC с использованием маски Ep01-02 и субстрата 2014.

Эффективность Ep05-2014-DM4 и Ep05-2014-DGN549

[00538] Мышей инокулировали и рандомизировали в группы по 6 мышей через 8 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 90,8 до 99,1 мм^3. Исследование закончили через 62 дней после инокуляции (КИ = 62 дпи).

[00539] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), и два AADC Ep05 с субстратом 3014 (AADC Ep05-3014-DM4, вводимый в дозе 1,5 мг/кг на основе Ат (~ 25 мкг/кг на основе лекарственного средства) и AADC Ep05-3014-DGN549, вводимый в дозе 5 мкг/кг на основе лекарственного средства). Две группы получали аналогично соответствующие нерасщепляемые NSUB AADC в качестве отрицательного контроля. Трем дополнительным группам вводили AADC Ep05-2014-DM4 в дозах 1,5, 2,5 и 5 мг/кг (на основе Ат), а двум дополнительным группам вводили AADC Ep05-2014-DGN549 в дозах 3 и 5 мкг/кг (на основе лекарственного средства). Всем животным вводили дозу через 5 дней после рандомизации (13 дпи).

[00540] В этом исследовании ИРО определяли на 30 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1241,8 мм^3.

[00541] Результаты исследования показаны на Фиг. 17E и 17F. Все препараты хорошо переносились в указанных дозах, и в этом исследовании не наблюдали потери массы тела.

[00542] Как и ожидалось, все AADC Ep05-NSUB были неактивны, независимо от используемой полезной нагрузки. Ep05-2014-DM4 AADC был высокоактивным при 5 мг/кг (ИРО = 0%), вызывая ПР у 6/6 мышей, все они определены как БОВ на момент КИ. AADC Ep05-2014-DM4, вводимый в дозе 2,5 мг/кг, также был высокоактивен на основании ИРО (7,2%), но вызывал только 3 ЧР и 1 ПР, 1 TSF. AADC Ep05-2014-DM4, вводимый в дозе 1,5 мг/кг, был неактивным, как и та же доза AADC Ep05-3014-DM4 (Фиг. 17E). AADC Ep05-3014-DGN549 был высокоактивным (НА) при 5 мкг/кг (ИРО = 5,5%), но индуцировал только 2 ЧР. Содержащий субстрат 2014 AADC, Ep05-2014-DGN549, был неактивен в обеих используемых дозах и не вызывал регрессии роста опухоли (Фиг. 17F). Соответственно, эти данные демонстрируют, что противоопухолевая активность AADC Ep05 является опухолеспецифическим, поскольку AADC, содержащие Ат с нерасщепляемыми масками, неактивны независимо от полезной нагрузки. Кроме того, AADC Ep05-DGN549 в дозе 5 мкг/кг был высокоактивным при использовании с субстратом 3014, но терял активность при использовании субстрата 2014. Напротив, AADC Ep05-2014-DM4, имеющий полезную нагрузку расщепляемого –s-SPDB-

DM4, является высокоактивным и вызывает множественную регрессию опухолей в зависимости от дозы.

Пример 14. Эффективность Ep05-3014-DM4 и 2014-DM4 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат Calu-3 НМРЛ

[00543] Самкам мышей в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали в область правого бока 5×10^6 клеток Calu-3/мышь в 0,2 мл SFM: Матригель. Мышей случайным образом распределяли в группы по 6 мышей через 10 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 97,6 до 106,4 $мм^3$. Исследование закончили через 119 дней после инокуляции (КИ = 119 дпи).

[00544] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группу исходного ADC huEpCAMG23v4.2-s-SPDB-DM4 в качестве положительного контроля, группу нерасщепляемого AADC Ep05-NSUB-DM4 в качестве отрицательного контроля, группу AADC Ep05-3014-DM4 и группу AADC Ep05-2014-DM4 со всеми соединениями AADC, протестированными в дозах 5 и 2,5 мг/кг (на основе концентрации активируемого антитела).

[00545] В этом исследовании ИРО определяли на 73 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1138 $мм^3$.

[00546] Результаты исследования представлены на Фиг. 18. Все препараты хорошо переносились в указанных дозах, и в этом исследовании не наблюдали потери массы тела.

[00547] Как и ожидалось, AADC Ep05-NSUB-DM4 был неактивным, в то время как исходный ADC EpCAM-DM4 был активен при дозе 5 мг/кг, с ИРО = 15,6% при 5 мг/кг и 21% при 2,5 мг/кг. Более того, ADC EpCAM-DM4 задерживал рост опухоли, но не вызывал регрессии. Точно так же не наблюдали регрессии с AADC E05-3014-DM4 и Ep05-2014-DM4. AADC Ep05-3014-DM4 был активен как при 5, так и при 2,5 мг/кг (значения ИРО 15,6% и 21%, соответственно), в то время как AADC Ep05-2014-DM4 был неактивным (ИРО> 40%). Соответственно, эти данные демонстрируют, что лечение ADC EpCAM-DM4 или AADC Ep05-DM4 приводит к некоторой задержке роста опухоли в модели опухоли Calu-3, но проявляет минимальную общую противоопухолевую активность.

Пример 15. Эффективность Ep05-3014-DM4 и 2014-DM4 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат НМРЛ NCI-H292

[00548] Самкам мышей в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали в область правого бока $2,5\times10^6$ клеток NCI-H292/мышь в 0,1 мл SFM. Мышей случайным

образом распределяли в группы по 6 мышей через 13 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 88,7 до 94,1 мм^3. Исследование было прекращено на 64 дпи.

[00549] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группу исходного ADC huEpCAMG23v4.2-s-SPDB-DM4 в качестве положительного контроля, группу нерасщепляемого Ep05-NSUB-DM4 AADC в качестве отрицательного контроля, вводимого дозе 2,5 мг/кг, и две группы каждого из AADC Ep05-3014-DM4 и AADC Ep05-2014-DM4 (оба вводили в дозе 5 и 2,5 мг/кг на основе концентрации активируемых антител).

[00550] В этом исследовании ИРО определяли на 28 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 939,8 мм^3.

[00551] Результаты исследования показаны на Фиг.19. Все препараты в указанных дозах хорошо переносились, и хотя несколько животных пришлось умертвить из-за потери массы тела, это было связано с характеристиками модели ксенотрансплантата, а не с препаратами.

[00552] Как и ожидалось, AADC Ep05-NSUB-DM4 был неактивным, в то время как исходный ADC EpCAM-DM4 был активен при 2,5 мг/кг с ИРО 22,7%. ADC EpCAM-DM4 задерживал рост опухоли (УПЖ = 100% (28,5 дней)), но не вызывал регрессии. Регрессий в этой модели не наблюдали, за исключением короткого непродолжительного ЧР в группе E05-3014-DM4, получавшей дозу 2,5 мг/кг. Однако, как AADC Ep05-3014-DM4, так и Ep05-2014-DM4 были высокоактивны при дозах всего 2,5 мг/кг (ИРО 10% и 11,45%, соответственно) и увеличивали продолжительность жизни соответствующих групп более чем в раза (100%). Соответственно, эти данные демонстрируют, что опухоли NCI-H292 чувствительны к ADC EpCAM-DM4, а также к производным AADC Ep05-DM4. Хотя индукции значительной регрессии опухоли не наблюдалось, наблюдалась значительная задержка роста опухоли и увеличение продолжительности жизни в получавших лечение группах. Более того, ответы на AADC, содержащим субстрат 3014, и с AADC, содержащим субстрат 2014, были схожими.

Пример 16. Эффективность Ep05-3014-DM4, Ep05-2014-DM4, Ep05-3014-DM21 и Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат ПКРГШ Detroit 562

[00553] Самкам мышей в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали в область правого бока 10^7 клеток Detroit 562 / мышь в 0,2 мл раствора SFM: Матригель 1: 1. Мышей случайным образом распределяли в группы по 8 мышей через 4 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 99,2 до

106 мм^3. Исследование было прекращено на 90 дпи.

[00554] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группу AADC Ep05-3014-DM4, вводимого в дозе 2,5 мг/кг, группу AADC Ep05-2014-DM4, вводимого в дозе 2,5 мг/кг, группу AADC Ep05-3014-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг, группу AADC Ep05-3014-DM21L, вводимого в дозе 5 мг/кг, группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг, и группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого в дозе 5 мг/кг. Все AADC вводили на основе концентрации активируемых антител. Кроме того, группе ADC в качестве положительного контроля вводили huEpCAM23Gv4.2-DM21L в дозе 2,5 мг/кг на основе концентрации антител.

[00555] В этом исследовании ИРО определяли на 28 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1004,2 мм^3.

[00556] Результаты исследования представлены на Фиг. 20. Все препараты в указанных дозах переносились хорошо.

[00557] Все AADC, используемые в этом исследовании (Ep05-3014-DM4, Ep05-2014-DM4, Ep05-3014-DM21L и Ep05-2014-DM21L), а также ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21L, были высокоактивны во всех протестированных дозах (ИРО 0% для всех групп, кроме Ep05-3014-DM21L в дозе 2,5 мг/кг, у которой ИРО 0,7%) и увеличили продолжительность жизни в соответствующих группах более чем в три раза (200%). Все группы вызывали 100% частичных регрессий, за исключением группы Ep05-2014-DM21L в дозе 2,5 мг/кг, которая вызывала 87,5% частичных регрессий. Эти частичные регрессии в основном достигали до полных регрессий (т.е.> 75% ЧР переходили в ПР), которые сохранялись до прекращения исследования, что приводило к множеству выживших без опухолей. Дополнительные подробности относительно ИРО, ЧР, ПР и БОВ, связанных с каждой группой, представлены на Фиг. 20.

[00558] Соответственно, эти данные демонстрируют, что опухоли Detroit 562 очень чувствительны к AADC Ep05-DM4, что приводит к значительной регрессии опухоли, задержке роста опухоли и увеличению продолжительности жизни в получавших лечение группах.

Пример 17. Эффективность Ep05-3014-DM21 и Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат НМРЛ NCI-H441

[00559] Самкам мышей в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали в область правого бока 10^7 клеток NCI-H441/мышь в 0,2 мл SFM. Мышей случайным образом распределяли в группы по 8 мышей через 8 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 95,1 до 101,4 мм^3.

Исследование было прекращено на 92 дпи.

[00560] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группу исходного ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг (на основе концентрации антител), группу AADC Ep05-3014-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг, группу AADC Ep05-3014-DM21L, вводимого 5 мг/кг, группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого 2,5 мг/кг, и группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого в дозе 5 мг/кг. Все AADC вводили на основе концентрации активируемых антител.

[00561] В этом исследовании ИРО определяли на 37 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1109,7 мм^3.

[00562] Результаты исследования представлены на Фиг. 21. Все препараты в указанных дозах переносились хорошо.

[00563] Все препараты были активными или высокоактивными, увеличивали продолжительность жизни группы на >149% и вызывали 100% ЧР в каждой группе. Было достигнуто несколько ПР, и они стабильно сохранялись до конца исследования, что приводило к множеству БОВ. ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21 был высокоактивным при 2,5 мг/кг с ИРО 7,7%, 8/8 ЧР и 7/8 ПР. Аналогичным образом, Ep05-2014-DM21 AADC был высокоактивным при дозах 2,5 и 5 мг/кг с ИРО 6,2% и 4,2%, соответственно, и 6/8 и 5/8 ПР, соответственно. Ep05-3014-DM21 AADC был активен при дозе 5 мг/кг с ИРО 10,1% и 5/8 ПР. При дозе 2,5 мг/кг AADC Ep05-3014-DM21 был высокоактивным с ИРО 6,3% и 6/8 ПР.

[00564] Соответственно, эти данные демонстрируют, что опухоли NCI-H441 чувствительны к AADC Ep05-DM21L, что приводит к значительной регрессии опухоли, задержке роста опухоли и увеличению продолжительности жизни получавших лечение группах.

Пример 18: Эффективность Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат EOC OV-90

[00565] Самкам мышей в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали в область правого бока 10^7 клеток OV-90/мышь в 0,1 мл SFM: Матригель. Мышей рандомизировали в группы в 6 мышей в каждой через 7 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 92,2 до 98,5 мм^3. Исследование было прекращено на 71 дпи.

[00566] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группу исходного ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21, вводимого в дозе 1,25 мг/кг (на основе концентрации антител), группу AADC Ep05-2014-

DM21L, вводимого в дозе 1,25 мг/кг (на основе концентрации активируемых антител), группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг (на основе концентрации активируемых антител), группа ненацеленного ADC отрицательного контроля chKTI-DM21L, вводимого в дозе 1,25 мг/кг (на основе концентрации антител), и группу ненацеленного ADC отрицательного контроля chKTI-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг (на основе концентрации антител).

[00567] В этом исследовании ИРО определяли на 34 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 1436,7 мм^3.

[00568] Результаты исследования представлены на Фиг. 22. Все препараты в указанных дозах переносились хорошо.

[00569] Все нацеленные на EpCAM препараты, использованные в этом исследовании (группа ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21 в дозе 1,25 мг/кг и группа AADC Ep05-2014-DM21L как в дозе 2,5, так и 1,25 мг/кг) были высокоактивными, с ИРО <5%, >109% увеличением продолжительности жизни в группе по сравнению с животными, не получавшими лечения, и 100% ЧР в каждой группе. Все ЧР в этих группах достигали полной регрессии (ПР) и поддерживались до конца исследования, что приводило к БОВ. Ненацеленный ADC chKTI-DM21 не был активен против опухолей OV-90 при дозах 2,5 и 1,25 мг/кг, с ИРО> 74,5% и без регрессии опухоли.

[00570] Соответственно, эти данные демонстрируют, что опухоли OV-90 чувствительны к AADC Ep05-2014-DM21L, что приводит к значительной регрессии опухоли и увеличению продолжительности жизни в получавших лечение группах.

Пример 19. Эффективность Ep05-2014-DM21 у мышей SCID C.B-17, несущих ксенотрансплантат НМРЛ Calu-3

[00571] Самкам мышей в возрасте 6-8 недель подкожно инокулировали в область правого бока 5×10^6 клеток Calu-3/мышь в 0,2 мл SFM: Матригель. Мышей рандомизировали в группы в 6 мышей в каждой через 6 дней после инокуляции (дпи). Средний объем опухоли (ОО) для каждой группы составлял от 110,3 до 116,5 мм^3.

[00572] Группы лечения включали контрольную группу плацебо, в которой вводили носитель (200 мкл/мс), группу исходного ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг (на основе концентрации антител), группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг (на основе концентрации активируемых антител), группу AADC Ep05-2014-DM21L, вводимого в дозе 5 мг/кг (на основе концентрации активируемых антител), группа ненацеленного ADC отрицательного контроля chKTI-DM21L, вводимого в дозе 2,5 мг/кг (на основе концентрации антител), и группу ненацеленного ADC отрицательного контроля chKTI-DM21L, вводимого в дозе 5 мг/кг (на

основе концентрации антител).

[00573] В этом исследовании ИРО определяли на 62 дпи, когда медиана ОО в контрольной группе плацебо (носитель) достигала 963,8 мм^3.

[00574] Результаты исследования представлены на Фиг. 23. Все препараты в указанных дозах переносились хорошо.

[00575] ADC huEpCAM23Gv4.2-DM21 в дозе 2,5 мг/кг был высокоактивным с ИРО 7,8%, 6/6 ЧР, 5/6 ПР и 1/6 мышей была без опухолей при последнем измерении (75 дпи). AADC Ep05-2014-DM21L был высокоактивен при 5 мг/кг, с 4,4% ИРО, 5/6 ЧР достигали ПР и 2/6 мышей были без опухолей при последнем измерении (75 дпи). AADC Ep05-2014-DM21L был активен при 2,5 мг/кг с 30,4% ИРО и 3/6 ЧР. Контрольная группа ненацеленного ADC chKTI-DM21L была неактивна в отношении опухолей Calu-3 при дозах 5 и 2,5 мг/кг, с ИРО> 90% при дозе 5 мг/кг и без регрессии опухоли.

[00576] Соответственно, эти данные демонстрируют, что опухоли Calu-3 чувствительны к AADC Ep05-2014-DM21L, что приводит к значительной регрессии опухоли и задержке роста опухоли.

Пример 20. Анализ фармакокинетики и переносимости нацеленного на EpCAM AADC у яванских макак

Фармакокинетика и переносимость конъюгатов DM4

[00577] Для дальнейшей оценки переносимости и фармакокинетики, связанных с нацеленными на EpCAM ADC и AADC самцам яванских макак вводили huEpCAM23 Gv4.2-s-SPDB-DM4, huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4 или huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-s-SPDB-DM4 в соответствии с дизайном исследования, приведенным в таблице 27.

Таблица 27. Дизайн исследования фармакокинетики и переносимости у яванских макак.

Группа	Тестируемый материал	Уровень дозы	Количество животных
1	huEpCAM23Gv4.2-s-SPDB-DM4	8 мг Ат/кг	2M
2	huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4	8 мг Ат/кг	2M
2b	huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4	12 мг Ат/кг	2M
3	huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-s-SPDB-DM4	8 мг Ат/кг	2M
3b	huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-s-	12 мг Ат/кг	2M

	SPDB-DM4		

[00578] После однократной в/в инфузии ADC или AADC за яванскими макаками наблюдали в течение 28 дней и собирали образцы для фармакокинетического анализа. В частности, у обезьян контролировали изменения массы тела, проводили клинические наблюдения и оценивали клиническую патологию (например, липазу и амилазу).

[00579] Как показано на Фиг. 24, нацеленный на EpCAM AADC хорошо переносился в дозе 8 мг/кг у яванских макак. В частности, клинические наблюдения на обезьянах, получавших 8 мг/кг huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4 или huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-s-SPDB-DM4, включали покраснения кожи в месте инъекции, а каловые массы считались нормальными. Аналогичные результаты были получены для обезьян, получавших 12 мг/кг huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4. Напротив, обезьяны, получавшие 8 мг/кг ADC, считались умирающими, и клинические наблюдения включали нарушение походки, снижение активности, снижение аппетита, холодную на ощупь кожу, легкие изменения на коже (красноватая или шелушащаяся), жидкий стул и обезвоживание.

[00580] Яванские макаки, получавшие нацеленный на EpCAM AADC DM4, также показали улучшенный химический состав сыворотки по сравнению с обезьянами, получавшими нацеленный на EpCAM ADC DM4. В частности, изменения альбумина, TP, отношения A/G (Фиг. 25A), азота мочевины (Фиг. 25B) и креатинина (Фиг. 25C) наблюдались только в группе ADC, а увеличение липазы (Фиг. 25D) и концентрации амилазы (Фиг. 25E) в сыворотке аналогичным образом были связаны только с группой ADC.

[00581] Как показано на Фиг. 26 и в таблице 28, введение AADC также было связано с улучшенным воздействием конъюгата. В совокупности эти данные предполагают, что эффективная маскировка AADC DM4 снижает влияние нормальной тканевой экспрессии EpCAM на фармакокинетические профили и профили токсичности.

Таблица 28. Фармакокинетический профиль яванских макак, получающих huEpCAM23Gv4.2-s-SPDB-DM4, huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4 или huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-s-SPDB-DM4.

Исследуемый препарат	Доза (мг Ат/кг)	$T_{1/2}$ (ч)	C_{max} (мкг/мл)	AUC_{∞} (ч*мкг/мл)	V_{ss} (мл/кг)	Cl (мл/ч/кг)
huEpCAM23Gv4.2-s-SPDB-DM4	8	33,9 ± 6,4	275 ± 134	5510 ± 947	53,3 ± 3,1	1,47 ± 0,25

huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4	8	94,9 ± 12,4	200 ± 21	19000 ± 61	56,6 ± 3,4	0,421 ± 0,001
huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-s-SPDB-DM4	8	64,3 ± 16,9	177 ± 3,82	13600 ± 874	58,2 ± 5,33	0,59 ± 0,038

Фармакокинетика и переносимость конъюгатов DM21

[00582] В отдельном исследовании самцам яванских макак вводили huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L или huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L в соответствии с дизайном исследования, приведенным в таблице 29.

Таблица 29. Дизайн исследования фармакокинетики и переносимости у яванских макак.

Группа	Тестируемый материал	Уровень дозы	Количество животных
1	huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L	12 мг Ат/кг	2M
2	huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L	12 мг Ат/кг	2M

[00583] После однократной в/в инфузии ADC или AADC за яванскими макаками наблюдали в течение 28 дней и собирали образцы для фармакокинетического анализа. В частности, у обезьян контролировали изменения массы тела, проводили клинические наблюдения и оценивали клиническую патологию (например, липазу и амилазу).

[00584] Как показано на Фиг. 27, huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L хорошо переносился в дозе 12 мг/кг у яванских макак. В частности, клинические наблюдения включали покрасневшую/потемневшую кожу, жидкий кал и запавшие глаза (обезвоживание). Напротив, обезьяны, получавшие 12 мг/кг huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L, демонстрировали клинические наблюдения, аналогичные тем, которые получали huEpCAM23Gv4.2-s-SPDB-DM4 в предыдущем исследовании.

[00585] Яванские макаки, получавшие huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L в дозе 12 мг/кг, также показали химический состав сыворотки, аналогичный обезьянам, получавшим 12 мг/кг huEpCAMGv4.2-Ep05-2014-s-SPDB-DM4 в предыдущем исследовании. В частности, изменения в соотношении A/G (Фиг. 28A), азота мочевины

(Фиг. 28B), и креатинина (FIG. 28C), липазы (Фиг. 28D) и амилазы (Фиг. 28E) в сывороточных концентрациях были аналогичными для этих двух групп, в то время как химические параметры сыворотки для группы huEpCAM23Gv4.2-Ep05-3014-DM21L изменялись в направлении к тем, которые были получены для группы ADC DM4 в предыдущем исследовании.

[00586] Как показано на Фиг. 29 и в таблице 30, введение huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L также было связано с улучшенным воздействием конъюгата по сравнению со всеми другими тестируемыми конъюгатами (включая конъюгаты как DM4, так и DM21L). В совокупности эти данные предполагают, что эффективная маскировка AADC DM21 снижает влияние нормальной тканевой экспрессии EpCAM на фармакокинетические профили и профили токсичности.

Таблица 30. Фармакокинетический профиль яванских макак, получавших huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L.

Исследуемый препарат	Доза (мг Ат/кг)	$T_{1/2}$ (ч)	C_{max} (мкг/мл)	AUC_{∞} (ч*мкг/мл)	V_{ss} (мл/кг)	Cl (мл/ч/кг)
huEpCAM23Gv4.2-Ep05-2014-DM21L	12	111 ± 40,8	426 ± 33,9	42300 ± 3650	45,6 ± 11,1	0,285 ± 0,0246

Пример 21. Анализ экспрессии EpCAM

Опухолевая экспрессия EpCAM

[00587] Чтобы оценить экспрессию EpCAM по различным признакам, сначала оценивали тканевые микроматрицы (TMA), представляющие 10 различных типов опухолей, с помощью иммуногистохимического (ИГХ) анализа EpCAM, разработанного в ImmunoGen для предварительного исследования.

[00588] Все проанализированные опухоли представляли собой FFPE образцы (фиксированные в формалине и залитые парафином). В частности, были проанализированы две TMA множественных карцином представляющие 10 различных признаков, а также специфичные к признаку TMA представляющие трижды негативный рак молочной железы (ТНРМЖ), злокачественное новообразование яичников и злокачественное новообразование мочевого пузыря. Также была проанализирована TMA колоректального рака (КРР), а также FFPE блоки цельной опухолевой ткани для злокачественного новообразования легких и злокачественного новообразования яичников.

[00589] Иммуногистохимическое окрашивание на EpCAM проводили с

использованием прибора для автоматического окрашивания Ventana Discovery Ultra. Первичное антитело к EpCAM было коммерчески доступным кроличьим моноклональным антителом. Все образцы были оценены сертифицированным патологоанатомом, обученным алгоритму оценивания. Для оценки требовалось присутствие по меньшей мере 100 жизнеспособных опухолевых клеток. Интенсивность окрашивания оценивали по полуколичественной целочисленной шкале от 0 до 3, где 0 - отсутствие окрашивания, 1 - слабое окрашивание, 2 - умеренное и 3 - сильное окрашивание. Регистрировали процент клеток, окрашивающихся положительно на каждом уровне интенсивности. Оценка была основана на локализации EpCAM только на клеточной мембране. Результаты окрашивания анализировали с помощью гистохимического индекса (англ.: H-score), который объединяет компоненты интенсивности окрашивания с процентом положительных клеток. Он имеет значение от 0 до 300 и определяется как:

1 * (процент окрашивания клеток с интенсивностью 1+)

+ 2 * (процент окрашивания клеток с интенсивностью 2+)

+ 3 * (процент окрашивания клеток с интенсивностью 3+)

= гистохимический индекс

[00590] В таблице 31 ниже приведен уровень EpCAM на основе окрашивания мембран по всем 10 признакам от TMA множественных карцином.

Таблица 31. Уровень EpCAM по 10 различным признакам на основе окрашивания мембран.

Тип опухоли (n)	Общий положительный результат (H ≥ 1)	% опухолей с H = 1-100	% опухолей с H = 101-200	% опухолей с H = 201-300
Желудок (n = 39)	100%	21%	67%	13%
Яичник (n =39)	100%	8%	51%	41%
Матка (n = 40)	98%	20%	58%	20%
Толстая кишка (n = 38)	95%	0%	71%	24%
Молочная железа (n = 38)	95%	71%	24%	0%
Поджелудочная железа (n =37)	95%	49%	41%	5%

Предстательная железа (n = 36)	94%	28%	53%	14%
Легкое (n = 40)	88%	58%	18%	13%
Голова/Шея (n = 40)	53%	45%	8%	0%
Печень (n = 39)	41%	31%	8%	3%

[00591] По результатам TMA множественных карцином, для расширенного анализа содержания были выбраны пять TMA, специфичных для признаков: TMA колоректального рака (КРР) с 42 случаями (40 оцениваемых), TMA злокачественного новообразования яичников с 37 ядрами, трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) с 81 ядром, TMA злокачественного новообразования мочевого пузыря с 60 ядрами карциномы и TMA немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) с 80 ядрами для аденокарциномы и 80 ядрами для плоскоклеточного рака (79 оцениваемых для каждого). На Фиг. 30 показана экспрессия EpCAM с разбивкой по баллам согласно гистохимическому индексу в пределах каждого признака к опухоли.

[00592] Кроме того, срезы ткани целой опухоли аденокарциномы НМРЛ (n = 86), НМРЛ-плоскоклеточной карциномы (n = 19) и карциномы яичников (n = 29) анализировали с помощью ИГХ на экспрессию EpCAM. Все эти образцы были оценены на предмет окрашивания мембран, и результаты приведены в таблице 32.

Таблица 32. Уровень EpCAM в дополнительных образцах для НМРЛ и рака яичников.

Тип опухоли (n)	Общий положительный результат (H ≥ 1)	H = 1-100	H = 101-200	H = 201-300
НМРЛ-все (n = 105)	93%	39%	42%	12%
НМРЛ-аденокарцинома (n =86)	100%	38%	48%	15%
НМРЛ-плоскоклеточный (n = 19)	64%	48%	16%	0%
Яичник (n = 29)	100%	17%	76%	7%

[00593] Результаты этих предварительных исследований демонстрируют, что EpCAM экспрессируется в широком диапазоне солидных злокачественных опухолей, и

поддерживают использование конъюгатов лекарственных средств против EpCAM9 при многих различных солидных опухолях, экспрессирующих EpCAM.

Экспрессия EpCAM в нормальных тканях человека

[00594] Экспрессию EpCAM в нормальной ткани человека оценивали с помощью ИГХ способом, аналогичным описанному выше, с использованием того же кроличьего моноклонального антитела к EpCAM и прибора для автоматического окрашивания Ventana Discovery Ultra.

[00595] Все проанализированные ткани представляли собой FFPE образцы (фиксированные в формалине и залитые парафином) с использованием мультитканевой микроматрицы TMA, представляющей 35 различных органов / анатомических областей от 3 отдельных индивидуумов. Все образцы были оценены сертифицированным патологоанатомом, обученным алгоритму оценивания. Для оценки требовалось присутствие по меньшей мере 100 жизнеспособных опухолевых клеток. Что касается образцов опухолей, оценивали по полуколичественной целочисленной шкале от 0 до 3, где 0 - отсутствие окрашивания, 1 - слабое окрашивание, 2 - умеренное и 3 - сильное окрашивание. Однако, в отличие от опухолей, баллы по гистохимическому индексу не рассчитывали из-за различных структур, обычно обнаруживаемых в разных тканях, которые делают баллы по гистохимическому индексу неточным отражением окрашивания. Описание патологоанатом любой картины окрашивания, наблюдаемой в каждом органе, регистрировали, а результаты приведены в таблице 33.

[00596] Существенное, сильное окрашивание наблюдается в ряде нормальных тканей человека, особенно в тонкой кишке, толстой и прямой кишке. Соответственно, альтернативные подходы нацеливания, такие как технологии на основе активируемых антител, представляют собой привлекательный вариант для преодоления потенциальных рисков токсичности.

Таблица 33. Уровень EpCAM в нормальных тканях человека.

Орган/область	% положительных ядер	Клеточный тип/структура	Интенсивность
Надпочечник	0%	н/д	отрицательная
Мочевой пузырь	50%	Поверхностный переходный эпителий	очень слабая
Костный мозг	0%	н/д	отрицательная
Молочные железы	100%	Ацинус	1+/2+

Мозжечок	0%	н/д	отрицательная
Кора головного мозга	0%	н/д	отрицательная
Толстая/прямая кишка	100%	Поверхность, ворсинки и крипты эпителия	3+
Пищевод	0%	н/д	отрицательная
Глаз	0%	н/д	отрицательная
Фаллопиевая труба	100%	Эпителий фаллопиевой трубы	3+
Сердце	0%	н/д	отрицательная
Почка (корковый, мозговой слой)	100%	Дистальные канальцы	1+
Печень	100%	Желчные протоки	1+
Легкое	100%	Пневмоциты II типа	1+
Яичник	0%	н/д	отрицательная
Поджелудочная железа	100%	Ацинус	1+
Паращитовидная железа	100%	Клетки паращитовидной железы	2+
Периферический нерв	0%	н/д	отрицательная
Гипофиз	100%	Клетки гипофиза	1+/2+
Плацента	0%	н/д	отрицательная
Предстательная железа	100%	Железы предстательной железы	1+
Слюнная железа	100%	Ацинус	1+/2+
Скелетная мышца	0%	н/д	отрицательная
Кожа	0%	н/д	отрицательная
Тонкий кишечник	100%	Поверхность, ворсинки и крипты эпителия	3+
Спинной мозг	0%	н/д	отрицательная
Селезенка	0%	н/д	отрицательная
Желудок	33%	Фундальная железа	1+, цитоплазматический
Яички	33%	Сперматиды	Пятнистая, гранулярная
Тимус	0%	н/д	отрицательная
Щитовидная железа	100%	Фолликулярный эпителий щитовидной железы	1+, 2+, 3+

Миндалина	0%	н/д	отрицательная
Мочеточник	0%	н/д	отрицательная
Матка-шейка матки	0%	н/д	отрицательная
Матка-эндометрий	100%	Железы эндометрия	1+, 2+, 3+

* * *

Иллюстративная область Fc IgG1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 304)
Иллюстративная область Fc IgG2	APPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF NWYVDG VEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPAP IEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEW ESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 305)
Иллюстративная область Fc IgG4	APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQ FNWYVD GVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV FSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSLG (SEQ ID NO: 306)
Иллюстративная область Fc L234A/L235A IgG1	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG

	SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 307)
Иллюстративная область Fc N297A IgG1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 308)
Иллюстративная область Fc N297Q IgG1	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP G (SEQ ID NO: 309)

* * *

[00597] Следует принять во внимание, что раздел «Подробное описание сущности изобретения», а не разделы «Сущность изобретения» и «Реферат», предназначен для интерпретации формулы изобретения. В разделах «Сущность изобретения» и «Реферат» указаны один или более, но не все иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения, как это предусмотрено изобретателем(ями), и, таким образом, не предназначены для ограничения настоящего изобретения и прилагаемой формулы изобретения любым способом.

[00598] Настоящее изобретение было описано выше с помощью иллюстративных заголовков разделов и других функциональных структурных блоков, иллюстрирующих осуществления определенных функций и их взаимосвязей. Границы этих функциональных структурных элементов были произвольно определены в данном документе для удобства описания. Альтернативные границы могут быть определены до тех пор, пока указанные функции и их отношения будут надлежащим образом выполняться.

[00599] Вышеизложенное описание конкретных вариантов осуществления полностью отражает общий характер охватываемых композиций и способов, который другие применяя знания в пределах уровня техники могут легко модифицировать и/или адаптировать для различных применений подобных конкретных вариантов осуществления, без излишнего экспериментирования, не отступая от общей концепции

настоящего изобретения. Следовательно, такие адаптации и модификации предназначены для того, чтобы быть в пределах значения и диапазона эквивалентов раскрытых вариантов осуществления на основе представленных в данном документе инструкций и указаний. Формулировки или терминология в данном документе предназначены для описания, а не ограничения, так что терминология или формулировки данного описания должны интерпретироваться квалифицированным специалистом в свете инструкций и указаний.

[00600] Объем притязаний и объем настоящего изобретения не должны ограничиваться каким-либо из вышеописанных иллюстративных вариантов осуществления, но должны определяться только в соответствии со следующей формулой изобретения и их эквивалентами.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к EpCAM (англ.: epithelial cell adhesion molecule – рус.: адгезивная молекула эпителиальных клеток) или связывающий EpCAM фрагмент антитела, причем антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую последовательность $X_1YX_3X_4H$, где X_1 выбран из N и S, X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W, и X_4 выбран из I и M (SEQ ID NO: 5);

(b) CDR2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую последовательность $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7);

(c) CDR3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую последовательность $X_1GX_3X_4FAY$, где X_1 выбран D и E, X_3 выбран из P, A, S, Y, F, G, T, и V, и X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 8);

(d) CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую последовательность $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TY\ LX_{16,}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10);

(e) CDR2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) CDR3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую последовательность $X_1QX_3LELPX_8T$, где X_1 выбран из A, L и Q, X_3 выбран из S, G, Y и N, и X_8 выбран из N и W (SEQ ID NO: 11).

2. Антитело или фрагмент антитела по п. 1, в котором антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) CDR1 тяжелой цепи (VH-CDR1), содержащую последовательность NYX_3IH, где X_3 выбран из Y, N, F, S, H, D, L, I, и W (SEQ ID NO: 6);

(b) CDR2 тяжелой цепи (VH-CDR2), содержащую последовательность $WX_2X_3PGX_6VYIQYX_{12}X_{13}KFX_{17}G$, где X_2 выбран из I и F, X_3 выбран из Y и N, X_6 выбран из N и D, X_{12} выбран из N и S, X_{13} выбран из E и Q, и X_{17} выбран из K и Q (SEQ ID NO: 7);

(c) CDR3 тяжелой цепи (VH-CDR3), содержащую последовательность $DGPX_4FAY$, где X_4 выбран из Y и W (SEQ ID NO: 9);

(d) CDR1 легкой цепи (VL-CDR1), содержащую последовательность $RSSX_4SLLHSX_{10}GX_{12}TYLX_{16}$, где X_4 выбран из R и K, X_{10} выбран из N и D, X_{12} выбран из F и I, и X_{16} выбран из Y и S (SEQ ID NO: 10);

(e) CDR2 легкой цепи (VL-CDR2), содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) CDR3 легкой цепи (VL-CDR3), содержащую последовательность $AQX_3LELPNT$, где X_3 выбран из S, G, Y, и N (SEQ ID NO: 12).

3. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 1 или п. 2, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы:

(a) SEQ ID NO: 13-15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) SEQ ID NO: 13-15, и 39-41, соответственно;

(c) SEQ ID NO: 13, 26, 15, и 39–41, соответственно; и

(d) SEQ ID NO: 13, 24, 15, 42, 40, и 41, соответственно.

4. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по любому из пп. 1–3, в котором антитело или фрагмент антитела связывается с K_D 3,0 нМ или менее как с EpCAM человека, так и с EpCAM яванского макака.

5. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 4, в котором антитело или фрагмент антитела специфически связывается с эпитопом в пределах внеклеточного домена EpCAM человека, имеющего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

6. Антитело или фрагмент антитела по п. 5, в котором антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYYIH (SEQ ID NO: 13);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) VH-CDR3, содержащую последовательность DGPWFAY (SEQ ID NO: 15);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41).

7. Антитело или фрагмент антитела по п. 4, в котором антитело или фрагмент

антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYYIH (SEQ ID NO: 13);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) a VH-CDR3, содержащую последовательность DGPWFAY (SEQ ID NO: 15);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSKSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 39);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41).

8. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 3, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH и VL, выбранные из следующего:

(a) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

(b) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 87;

(c) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 55, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 87;

(d) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 56, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 88;

(e) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 55, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89; и

(f) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 56, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89.

9. Антитело или фрагмент антитела по п. 8, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 89.

10. Антитело или фрагмент антитела по п. 8, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 54 и VL с SEQ ID NO: 87.

11. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 8, в котором антитело или фрагмент антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, выбранные из следующего

(a) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющая

последовательность SEQ ID NO: 140;

(b) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 138;

(c) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 105, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 139;

(d) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 106, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 139;

(e) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 105, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140; и

(f) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 106, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140.

12. Антитело или фрагмент антитела по п. 11, в котором антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 103 и LC с SEQ ID NO: 140.

13. Антитело или фрагмент антитела по п. 11, в котором антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 103 и LC с SEQ ID NO: 138.

14. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 1 или п. 2, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(a) SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40, и 41, соответственно;

(c) SEQ ID NO: 23, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно; и

(d) SEQ ID NO: 25, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно.

15. Антитело или фрагмент антитела по п. 14, в котором антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYHIH (SEQ ID NO: 22);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) VH-CDR3, содержащую последовательность DGPWFAY (SEQ ID NO: 15);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41).

16. Антитело или фрагмент антитела по п. 14, в котором антитело или фрагмент антитела содержит:

(a) VH-CDR1, содержащую последовательность NYYIH (SEQ ID NO: 13);

(b) VH-CDR2, содержащую последовательность WIYPGNVYIQYNEKFKG (SEQ ID NO: 14);

(c) VH-CDR3, содержащую последовательность DGYWFAY (SEQ ID NO: 33);

(d) VL-CDR1, содержащую последовательность RSSRSLLHSDGFTYLY (SEQ ID NO: 42);

(e) VL-CDR2, содержащую последовательность QTSNLAS (SEQ ID NO: 40); и

(f) VL-CDR3, содержащую последовательность AQNLELPNT (SEQ ID NO: 41).

17. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 14, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH и VL, выбранные из следующего:

(a) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

(b) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89;

(c) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 76; и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89; и

(d) VH, имеющая последовательность SEQ ID NO: 84, и VL, имеющая последовательность SEQ ID NO: 89.

18. Антитело или фрагмент антитела по п. 17, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 75 и VL с SEQ ID NO: 89.

19. Антитело или фрагмент антитела по п. 17, в котором антитело или фрагмент антитела содержит VH с SEQ ID NO: 77 и VL с SEQ ID NO: 89.

20. Антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела по п. 17, в котором антитело или фрагмент антитела содержит тяжелую цепь и легкую цепь, выбранные из следующего

(a) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 125, и LC, имеющая

последовательность SEQ ID NO: 140;

(b) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 127, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140;

(c) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 126; и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140; и

(d) HC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 134, и LC, имеющая последовательность SEQ ID NO: 140.

21. Антитело или фрагмент антитела по п. 20, в котором антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 125 и LC с SEQ ID NO: 140.

22. Антитело или фрагмент антитела по п. 20, в котором антитело или фрагмент антитела содержит HC с SEQ ID NO: 127 и LC с SEQ ID NO: 140.

23. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1–22, в котором антитело или фрагмент антитела представляет собой мышиное антитело, антитело отличного от человека млекопитающего, химерное, гуманизированное или человеческое антитело.

24. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1–23, в котором антитело представляет собой полноразмерное антитело.

25. Полноразмерное антитело по п. 24, в котором антитело представляет собой IgG1 человека.

26. Антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1–23, в котором фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', $F(ab')_2$, F_d, одноцепочечный Fv или scFv, дисульфидсвязанный F_v, домен V-NAR, IgNar, интраантитело, $IgG\Delta CH_2$, миниантитело, $F(ab')_3$, тетратело, триатело, диатело, однодоменное антитело, DVD-Ig, Fcab, $мкАт_2$, $(scFv)_2$ или scFv-Fc.

27. Активируемое антитело, содержащее антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1–26, в котором активируемое антитело дополнительно содержит

(a) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом или фрагментом антитела, при этом расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы; и

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом или фрагментом антитела, при этом маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии,

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент).

28. Активируемое антитело к EpCAM, содержащее:

(a) антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности члена, выбранного из группы:

(i) SEQ ID NO: 13–15, 42, 40, и 41, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 13–15, и 39–41, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 13, 26, 15, и 39–41, соответственно; и

(iv) SEQ ID NO: 13, 24, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

(c) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы;

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент).

29. Активируемое антитело к EpCAM по п. 28, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13–15, 42, 40 и 41, соответственно.

30. Активируемое антитело к EpCAM по п. 29, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 54, и VL, имеющую

последовательность SEQ ID NO: 89.

31. Активируемое антитело к EpCAM по п. 30, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 103, и LC, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

32. Активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 29–31, в котором активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151–157.

33. Активируемое антитело к EpCAM по п. 32, в котором активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

34. Активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 29–33, в котором активируемое антитело содержит расщепляемый фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168 или 169.

35. Активируемое антитело к EpCAM, содержащее:

(a) антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

(i) SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно;

(ii) SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40, и 41, соответственно;

(iii) SEQ ID NO: 23, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно, и;

(iv) SEQ ID NO: 25, 14, 15, 42, 40, и 41, соответственно.

(b) маскирующий фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем маскирующий фрагмент ингибирует связывание антитела или фрагмента антитела с EpCAM, когда активируемое антитело находится в нерасщепленном состоянии; и

(c) расщепляемый фрагмент, связанный с антителом к EpCAM или связывающим EpCAM фрагментом антитела, причем расщепляемый фрагмент представляет собой полипептид, который функционирует как субстрат для протеазы;

причем активируемое антитело в нерасщепленном состоянии имеет следующее структурное расположение от N-конца к C-концу: (маскирующий фрагмент)-(расщепляемый фрагмент)-(антитело или фрагмент антитела) или (антитело или фрагмент антитела)-(расщепляемый фрагмент)-(маскирующий фрагмент).

36. Активируемое антитело к EpCAM по п. 35, в котором активируемое

антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 22, 14, 15, 42, 40 и 41, соответственно.

37. Активируемое антитело к EpCAM по п. 36, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 75, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89.

38. Активируемое антитело к EpCAM по п. 37, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 125, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

39. Активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 36–38, в котором активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151–157 и 162–167.

40. Активируемое антитело к EpCAM по п. 39, в котором активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 162–167.

41. Активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 36–40, в котором активируемое антитело содержит расщепляемый фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168 или 169.

42. Активируемое антитело к EpCAM по п. 35, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13, 14, 33, 42, 40 и 41, соответственно.

43. Активируемое антитело к EpCAM по п. 42, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие VH, имеющую последовательность SEQ ID NO: 77, и VL, имеющую последовательность SEQ ID NO: 89.

44. Активируемое антитело к EpCAM по п. 43, в котором активируемое антитело содержит антитело к EpCAM или связывающий EpCAM фрагмент антитела, содержащие тяжелую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 127, и легкую цепь, имеющую последовательность SEQ ID NO: 140.

45. Активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 42–44, в котором активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151–161.

46. Активируемое антитело к EpCAM по п. 45, в котором активируемое антитело содержит маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 158–161.

47. Активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 42–46, в котором активируемое антитело содержит расщепляемый фрагмент, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 168 или 169.

48. Клетка, продуцирующая антитело или связывающий EpCAM фрагмент антитела по любому из пп. 1–26 или активируемое антитело по любому из пп. 27–47.

49. Способ получения антитела к EpCAM или связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM, включающий:

(a) культивирование клетки по п. 48; и

(b) выделение антитела к EpCAM, связывающего EpCAM фрагмента антитела или активируемого антитела к EpCAM из клетки или культуры клеток.

50. Способ по п. 49, в котором клетка представляет собой эукариотическую клетку.

51. Способ по п. 50, в котором клетка представляет собой клетку CHO.

52. Диагностический реагент, содержащий антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1–26 или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 27–47.

53. Диагностический реагент по п. 52, в котором антитело, фрагмент антитела или активируемое антитело помечены.

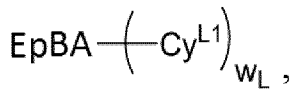
54. Диагностический реагент по п. 53, в котором метка выбрана из: радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего агента и иона металла.

55. Полинуклеотид или набор полинуклеотидов, кодирующие антитело или фрагмент антитела по любому из пп. 1–26 или активируемое антитело по любому из пп. 27–47.

56. Вектор или набор векторов, содержащие полинуклеотид по п. 55.

57. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид или набор полинуклеотидов по п. 55 или вектор по п. 56.

58. Иммуноконъюгат, представленный следующей формулой:

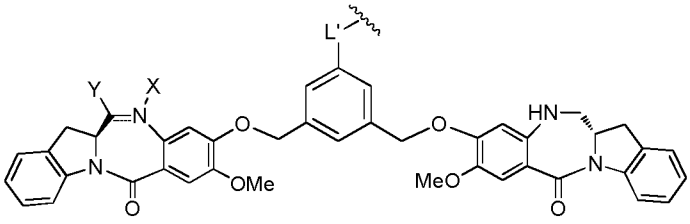


при этом:

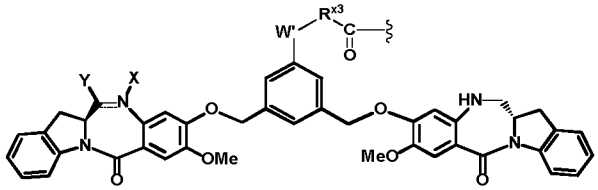
EpBA (англ.: EpCAM-binding agent – рус.: связывающий EpCAM агент) представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 1–47, которое ковалентно связано с Cy^{L1} через остаток лизина;

W_L равен целому числу от 1 до 20; и

Cy^{L1} представлен следующей формулой:



или



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что когда она представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой –H, или (C_1-C_4)алкил; и когда она представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H или защитный фрагмент на амин, и Y представляет собой -OH или $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль;

W’ представляет собой $-NR^{e'}$,

$R^{e'}$ представляет собой $-(CH_2-CH_2-O)_n-R^k$;

n равен целому числу от 2 до 6;

R^k представляет собой -H или -Me;

R^{x3} представляет собой (C_1-C_6)алкил;

L’ представлен следующей формулой:

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-C(=O)-$ (B1’); или

$-NR_5-P-C(=O)-(CR_aR_b)_m-S-Z^{s1}-$ (B2’);

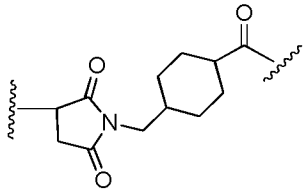
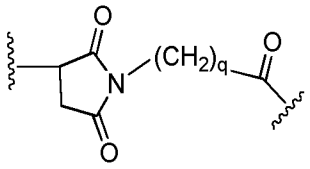
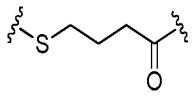
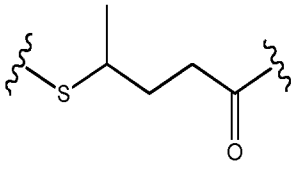
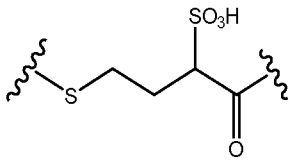
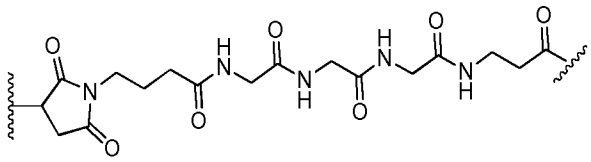
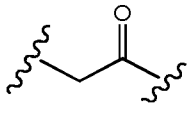
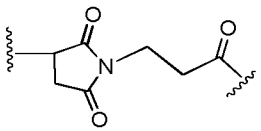
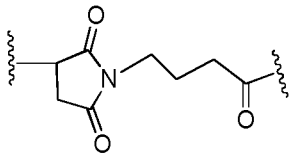
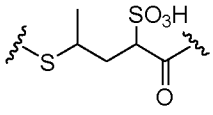
R_5 представляет собой -H или (C_1-C_3)алкил;

P представляет собой аминокислотный остаток или пептид, содержащий от 2 до 20 аминокислотных остатков;

каждый из R_a и R_b, в каждом случае независимо, представляет собой -H, (C_1-C_3)алкил или заряженный заместитель или ионизируемую группу Q;

m равен целому числу от 1 до 6; и

Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:


(b1);

(b2);

(b3);

(b4);

(b5),

(b6),

(b7);

(b8);

(b9); и

(b10),

где q равен целому числу от 1 до 5.

59. Иммуноконъюгат по п. 58, в котором оба из R_a и R_b представляют собой H; и R_5 представляет собой H или Me.

60. Иммуноконъюгат по п. 58 или п. 59, в котором пептид P представляет собой пептид, содержащий от 2 до 5 аминокислотных остатков.

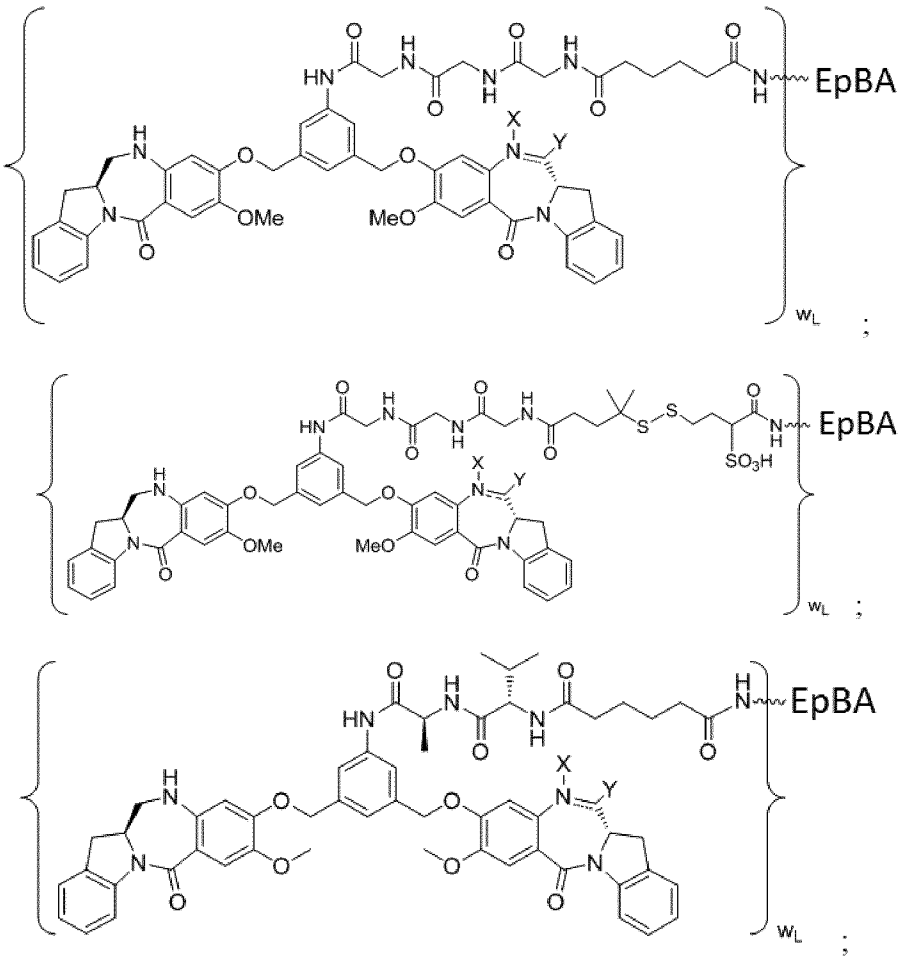
61. Иммуноконъюгат по любому из пп. 58–60, в котором P выбран из Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Val-Ala, Val-Cit, Val-Lys, Phe-Lys, Lys-Lys, Ala-Lys, Phe-Cit, Leu-Cit, Ile-Cit, Trp, Cit, Phe-Ala, Phe-N^9-тозил-Arg, Phe-N^9-нитро-Arg, Phe-Phe-Lys, D-Phe-Phe-Lys, Gly-

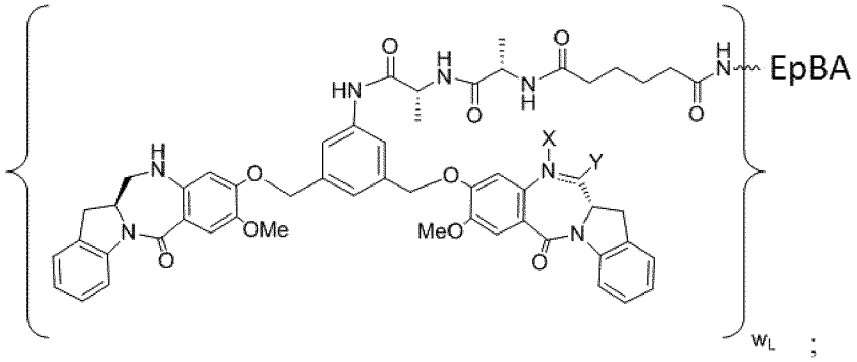
Phe-Lys, Leu-Ala-Leu, Ile-Ala-Leu, Val-Ala-Val, Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 215), β-Ala-Leu-Ala-Leu (SEQ ID NO: 216), Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 217), Val-Arg, Arg-Val, Arg-Arg, Val-D-Cit, Val-D-Lys, Val-D-Arg, D-Val-Cit, D-Val-Lys, D-Val-Arg, D-Val-D-Cit, D-Val-D-Lys, D-Val-D-Arg, D-Arg-D-Arg, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, D-Ala-D-Ala, Ala-Met, Met-Ala, Gln-Val, Asn-Ala, Gln-Phe и Gln-Ala.

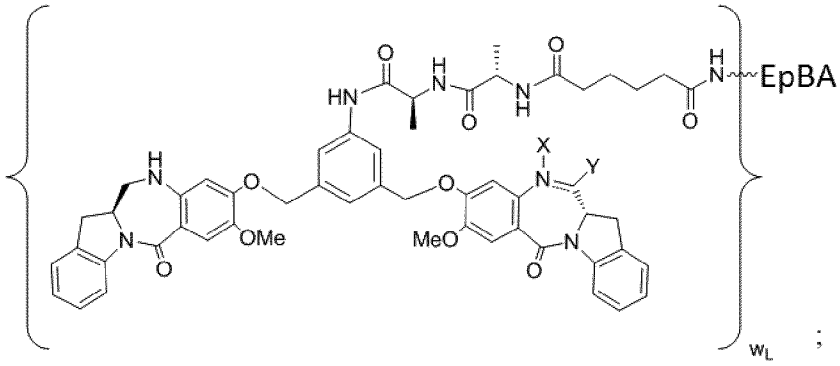
62. Иммуноконъюгат по п. 61, в котором P представляет собой Gly-Gly-Gly, Ala-Val, Ala-Ala, Ala-D-Ala, D-Ala-Ala, или D-Ala-D-Ala.

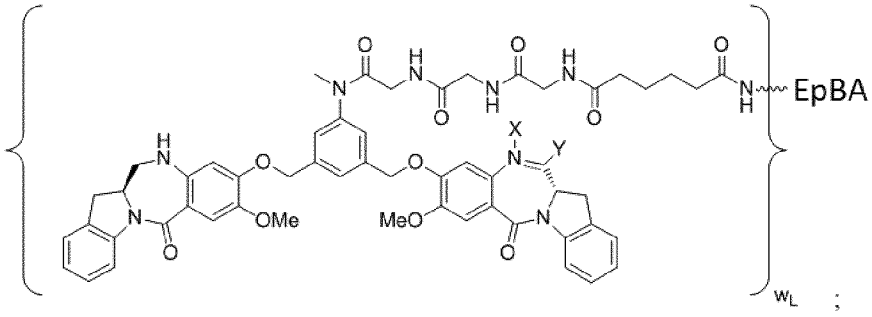
63. Иммуноконъюгат по любому из пп. 58–62, в котором Q представляет собой -SO_3H, или его фармацевтически приемлемая соль.

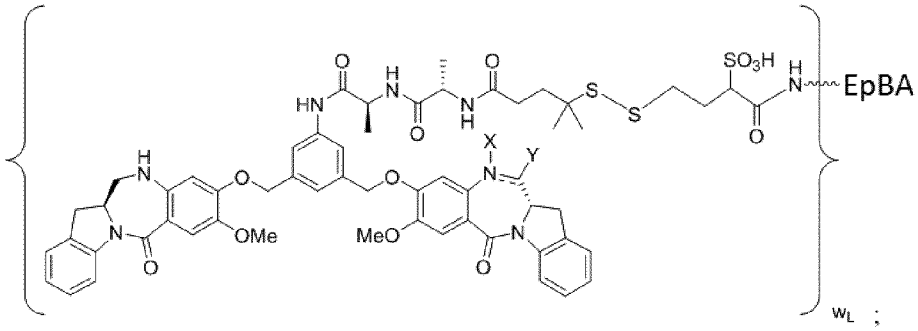
64. Иммуноконъюгат по п. 58, в котором иммуноконъюгат представлен следующей формулой:

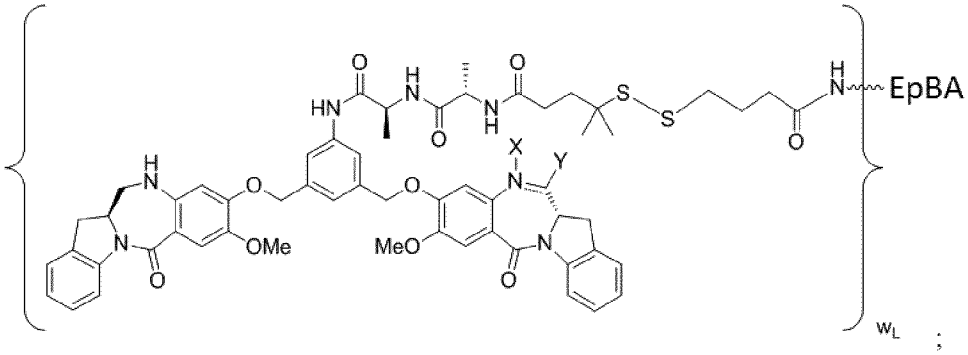


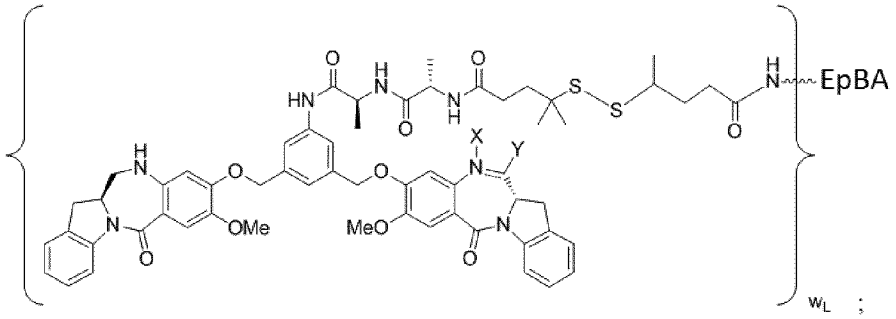

EpBA
w_L ;

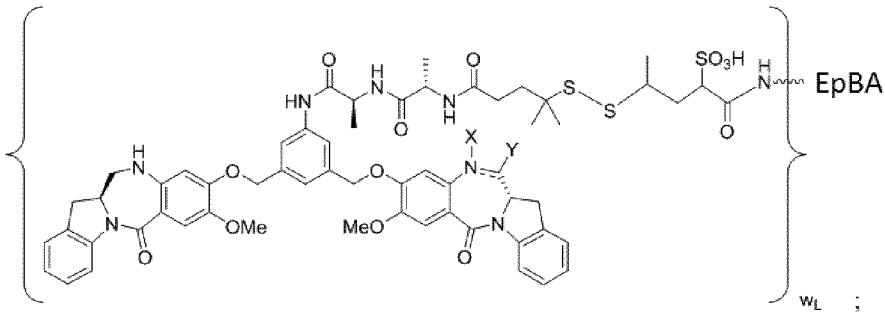

EpBA
w_L ;

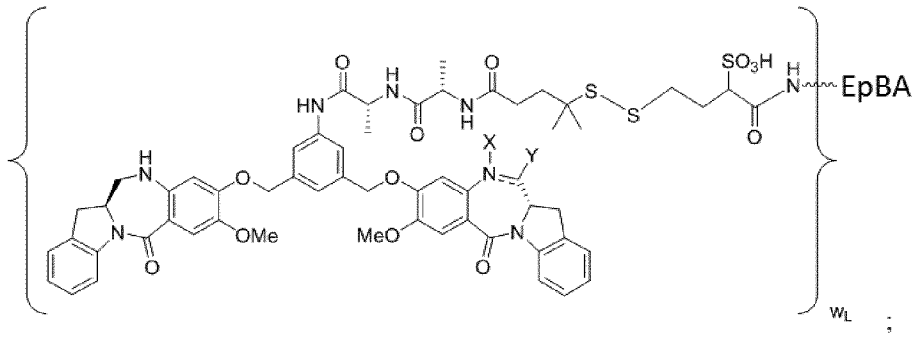

EpBA
w_L ;

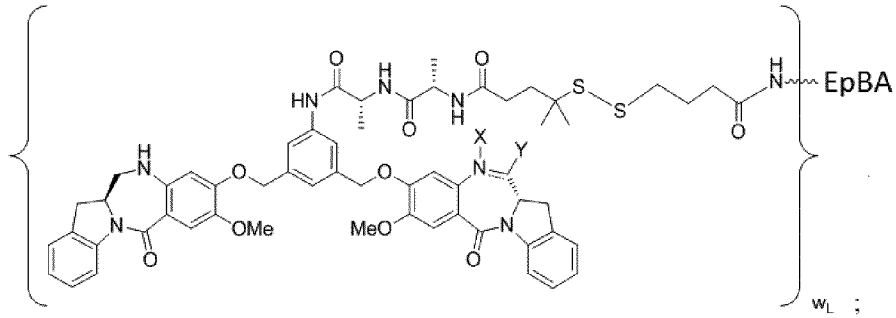

EpBA
w_L ;

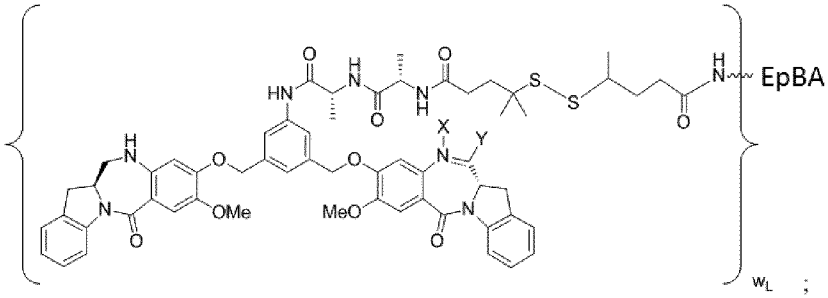

EpBA
w_L ;

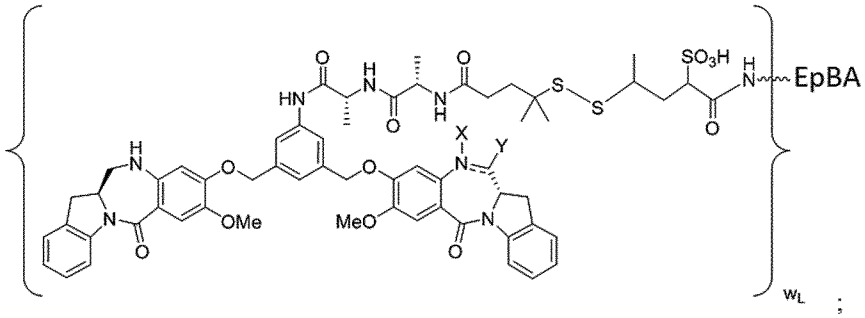

EpBA
w_L ;


EpBA
w_L ;

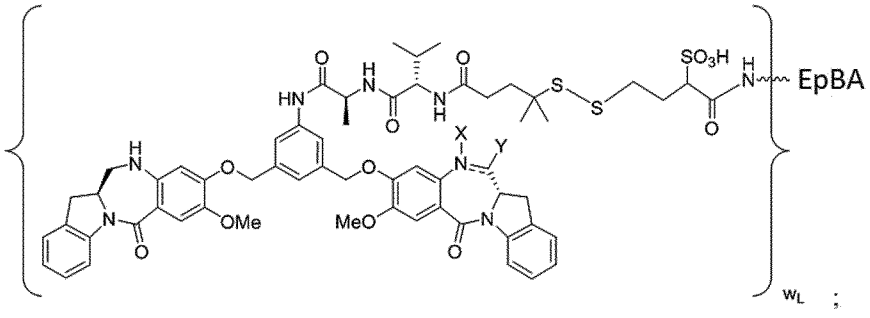

EpBA
w_L ;


EpBA
w_L ;

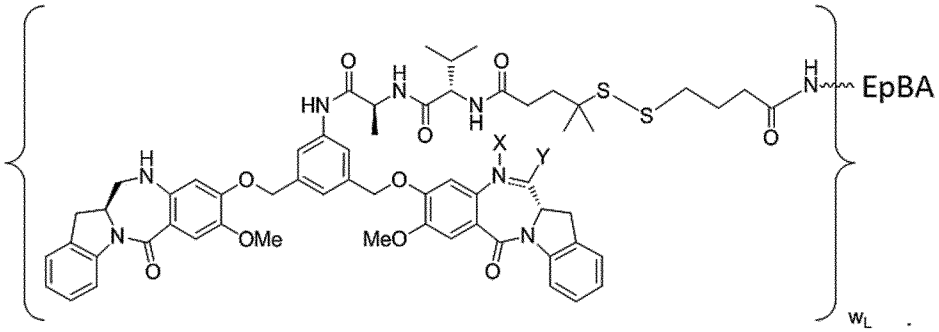

EpBA
w_L ;



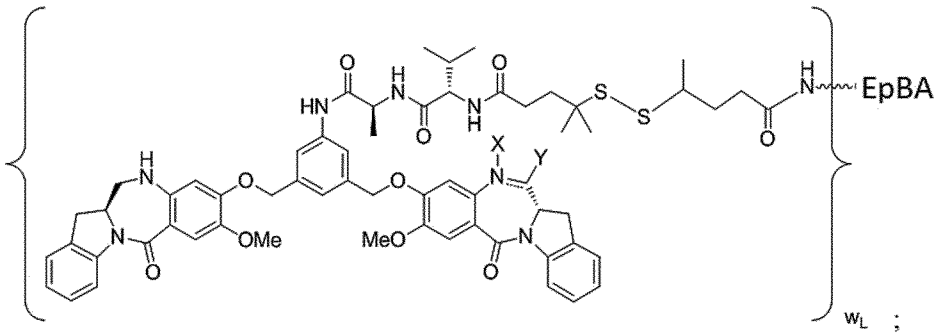
;



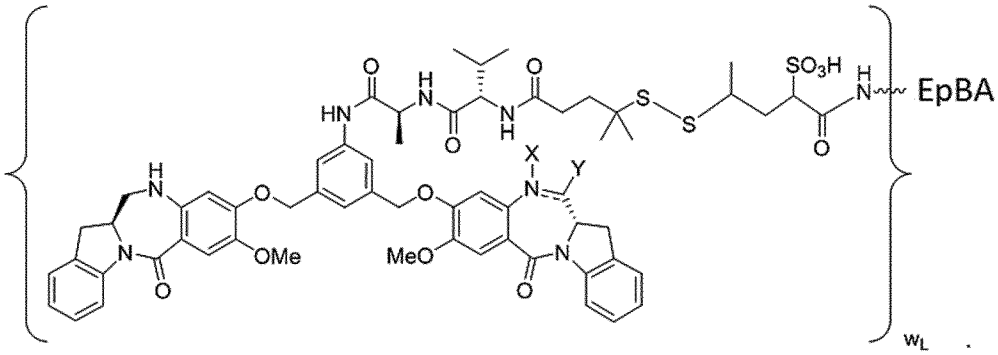
;



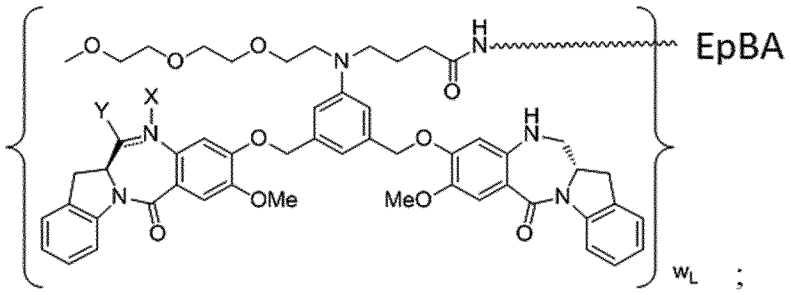
;



;



; или



;

или его фармацевтически приемлемая соль, где

W_L равно целому числу от 1 до 10; двойная линия == между N и C представляет собой одинарную связь или двойную связь, при условии, что, когда это двойная связь, X отсутствует, а Y представляет собой -H; и когда это одинарная связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой -OH или $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль.

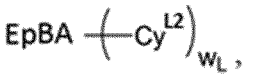
65. Иммуноконъюгат по любому из пп. 58–64, в котором двойная линия == между N и C представляет собой двойную связь, X отсутствует и Y представляет собой -H.

66. Иммуноконъюгат по любому из пп. 58–64, в котором двойная линия между == N и C представляет собой одинарную связь, X представляет собой -H, а Y представляет собой $-SO_3H$, или его фармацевтически приемлемая соль.

67. Иммуноконъюгат по п. 66, в котором Y представляет собой $-SO_3H$, $-SO_3Na$ или $-SO_3K$.

68. Иммуноконъюгат по п. 66, в котором Y представляет собой $–SO_3Na$.

69. Иммуноконъюгат, представленный следующей формулой:



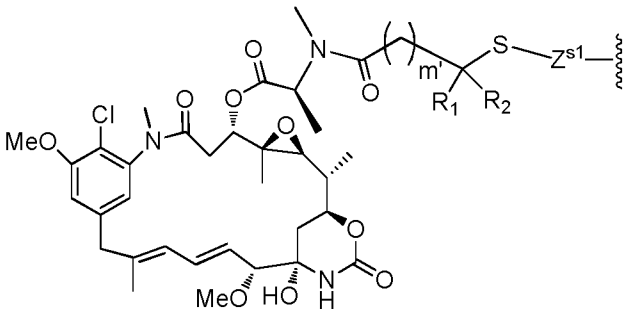
,

при этом:

EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 1–47, которое ковалентно связано с Cy^{L2} через остаток лизина;

W_L равен целому числу от 1 до 20;

Cy^{L2} представлен следующей формулой:

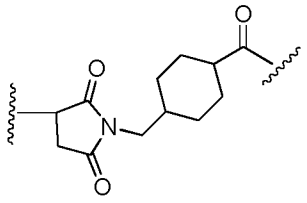


,

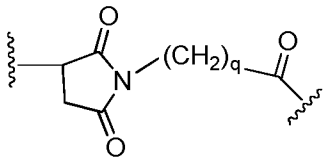
m’ равен 1 или 2;

каждый из R_1 и R_2 независимо представляет собой H или (C_1-C_3)алкил; и

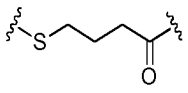
Z^{s1} выбран из любой из следующих формул:



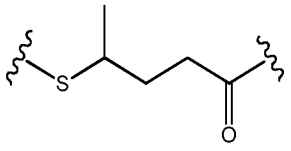
(b1);



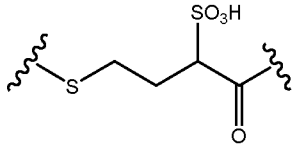
(b2);



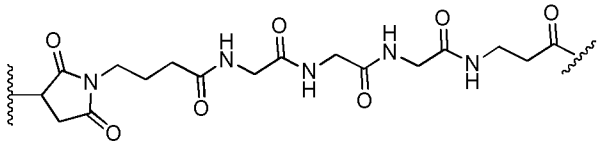
(b3);



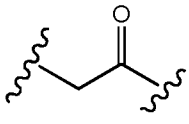
(b4);



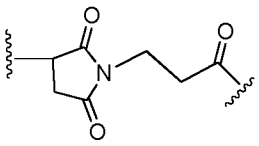
(b5),



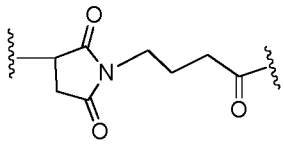
(b6),



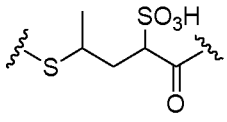
(b7);



(b8);



(b9), и



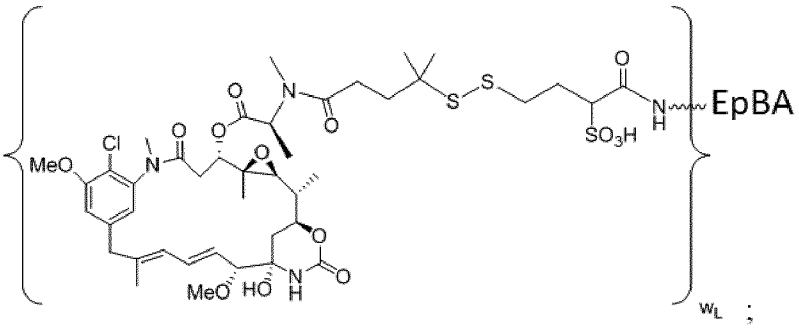
(b10),

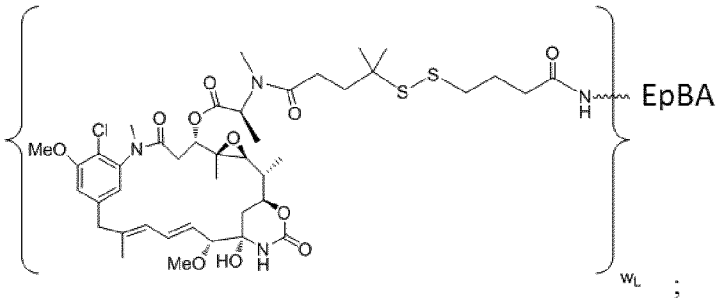
где q равен целому числу от 1 до 5.

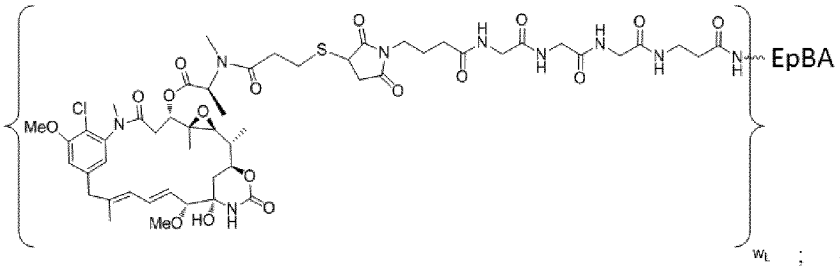
70. Иммуноконъюгат по п. 69, в котором m’ равен 1, и оба из R_1 и R_2 представляют собой H.

71. Иммуноконъюгат по п. 69, в которой m’ равен 2, и оба из R1 и R2 представляют собой Me.

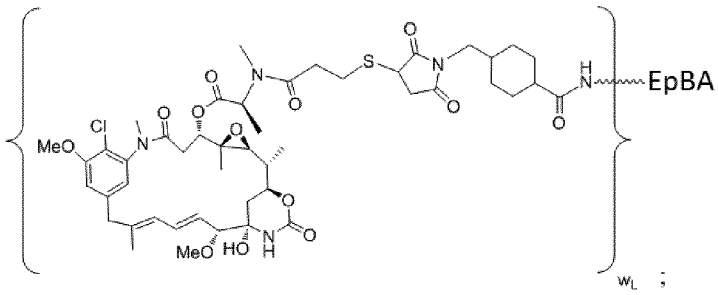
72. Иммуноконъюгат по п. 69, в котором иммуноконъюгат представлен следующей формулой:





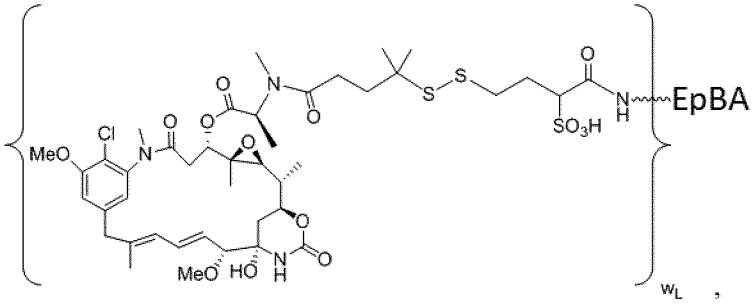


или



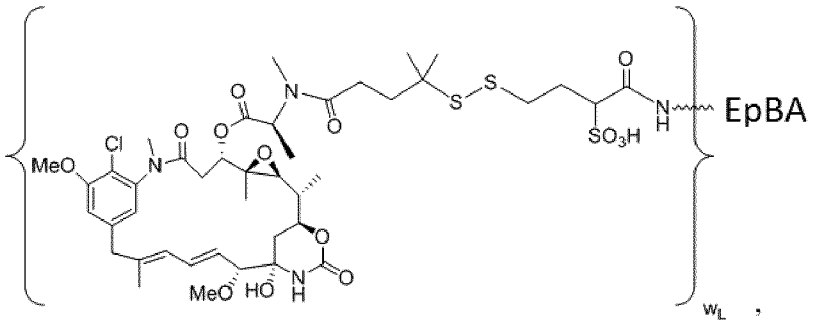
или его фармацевтически приемлемая соль, где W_L равен целому числу от 1 до 10.

73. Иммуноконъюгат по п. 69, в котором иммуноконъюгат представлен следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль.

74. Иммуноконъюгат, представленный следующей формулой:



или его фармацевтически приемлемая соль, где:

W_L равен целому числу от 1 до 10;

EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM, содержащие VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, имеющие последовательности SEQ ID NO: 13–15, 42, 40 и 41, соответственно.

75. Иммуноконъюгат по п. 74, в котором выделенное антитело или связывающий EpCAM фрагмент антитела содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), имеющие последовательности SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 89, соответственно.

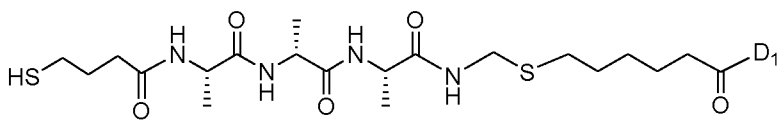
76. Иммуноконъюгат по п. 74, в котором выделенное антитело содержит тяжелую цепь и легкую цепь, имеющие последовательности SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 140, соответственно.

77. Иммуноконъюгат по любому из пп. 74–76, в котором иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, содержащее маскирующий фрагмент, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151–157.

78. Иммуноконъюгат по п. 77, в котором маскирующий фрагмент имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

79. Иммуноконъюгат по п. 77 или п. 78, в котором иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, дополнительно содержащее расщепляемый фрагмент SEQ ID NO: 168 или SEQ ID NO: 169.

80. Иммуноконъюгат, содержащий EpBA, связанный с соединением майтанзиноидом DM21L (также называемым LDL-DM), представленным следующей структурной формулой:

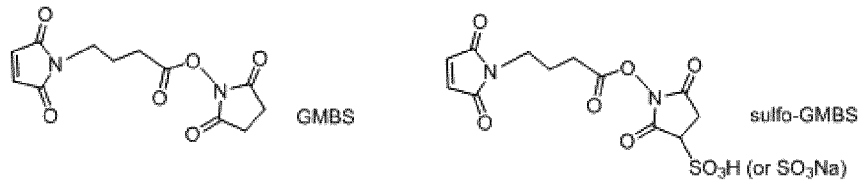


(D-2);

через линкер N-сукцинимидиловый эфир γ-малеимидомасляной кислоты (GMBS - англ.: γ-maleimidobutyric acid N-succinimidyl ester) или N-(γ-

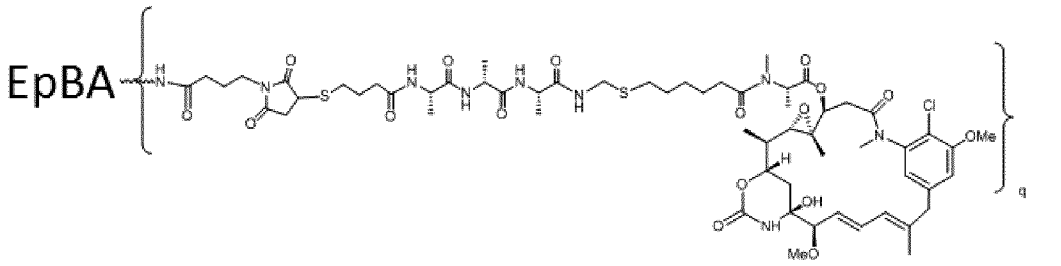
малеимидобутрилокси)сульфосукцинимидный эфир (сульфо-GMBS или sGMBS), где EpBA представляет собой антитело к EpCAM, фрагмент антитела к EpCAM или активируемое антитело к EpCAM по любому из пп. 1–47.

81. Иммуноконъюгат по п. 80, в котором линкеры GMBS и сульфо-GMBS (или sGMBS) представлены следующей формулой:



.

82. Иммуноконъюгат по п. 80 или п. 81, представленный следующей формулой:



,

при этом:

EpBA связан с соединением майтанзиноидом через аминогруппу Lys, где q равен целому числу от 1 до 10.

83. Иммуноконъюгат по любому из пп. 80–82, в котором EpBA содержит VH-CDR1, VH-CDR2, VH-CDR3, VL-CDR1, VL-CDR2 и VL-CDR3, содержащие последовательности SEQ ID NO: 13–15, 42, 40 и 41, соответственно.

84. Иммуноконъюгат по п. 83, в котором EpBA содержит вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), имеющие последовательности SEQ ID NO: 54 и SEQ ID NO: 89, соответственно.

85. Иммуноконъюгат по п. 84, в котором EpBA содержит тяжелую цепь и легкую цепь, имеющие последовательности SEQ ID NO: 103 и SEQ ID NO: 140, соответственно.

86. Иммуноконъюгат по любому из пп. 83–85, в котором иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, содержащее маскирующий фрагмент, имеющий

аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 151–157.

87. Иммуноконъюгат по п. 86, в котором маскирующий фрагмент имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 155.

88. Иммуноконъюгат по п. 86 или п. 87, в котором иммуноконъюгат содержит активируемое антитело, дополнительно содержащее расщепляемый фрагмент SEQ ID NO: 168 или SEQ ID NO: 169.

89. Иммуноконъюгаты по любому из пп. 58–88, в которых фармацевтически приемлемая соль представляет собой натриевую или калиевую соль.

90. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело, антигенсвязывающий фрагмент или активируемое антитело по любому из пп. 1–47 и фармацевтически приемлемый носитель.

91. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по любому из пп. 58–88 и фармацевтически приемлемый носитель.

92. Способ уничтожения раковой клетки, который включает приведение раковой клетки в контакт с эффективным количеством антитела, антигенсвязывающего фрагмента или активируемого антитела по любому из пп. 1–47, иммуноконъюгата по любому из пп. 58–88 или фармацевтической композиции по п. 90 или п. 91.

93. Способ по п. 92, в котором раковая клетка представляет собой клетку злокачественного эпителиального новообразования, клетку злокачественного новообразования молочной железы, клетку злокачественного новообразования легкого, клетку злокачественного новообразования желудка, клетку колоректального рака, клетку злокачественного новообразования предстательной железы, клетку злокачественного новообразования яичника, клетку злокачественного новообразования толстой кишки, клетку злокачественного новообразования прямой кишки или раковую стволовую клетку.

94. Способ по п. 92, в котором раковая клетка представляет собой клетку злокачественного новообразования яичника, клетку злокачественного новообразования матки, клетку злокачественного новообразования желудка, клетку злокачественного новообразования поджелудочной железы или клетку колоректального рака.

95. Способ лечения злокачественного новообразования, которое экспрессирует EpCAM, включающий введение терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1–47, иммуноконъюгата по любому из пп. 58–88 или фармацевтической композиции по п. 90 или п. 91 нуждающемуся в этом субъекту.

96. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное эпителиальное новообразование.

97. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование молочной железы, злокачественное новообразование легкого, злокачественное новообразование желудка, колоректальный рак, злокачественное новообразование предстательной железы, злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование толстой кишки, злокачественное новообразование пищевода, злокачественное новообразование трахеи, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование мочевого пузыря, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование прямой кишки, злокачественное новообразование тонкой кишки или их метастазы.

98. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников, злокачественное новообразование матки, злокачественное новообразование желудка, злокачественное новообразование поджелудочной железы, колоректальный рак или их метастазы.

99. Способ лечения по п. 97, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование легкого.

100. Способ лечения по п. 99, в котором злокачественное новообразование легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

101. Способ лечения по п. 100, в котором немелкоклеточный рак легкого представляет собой неплоскоклеточный немелкоклеточный рак легкого.

102. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование яичников.

103. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой трижды негативный рак молочной железы.

104. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой колоректальный рак.

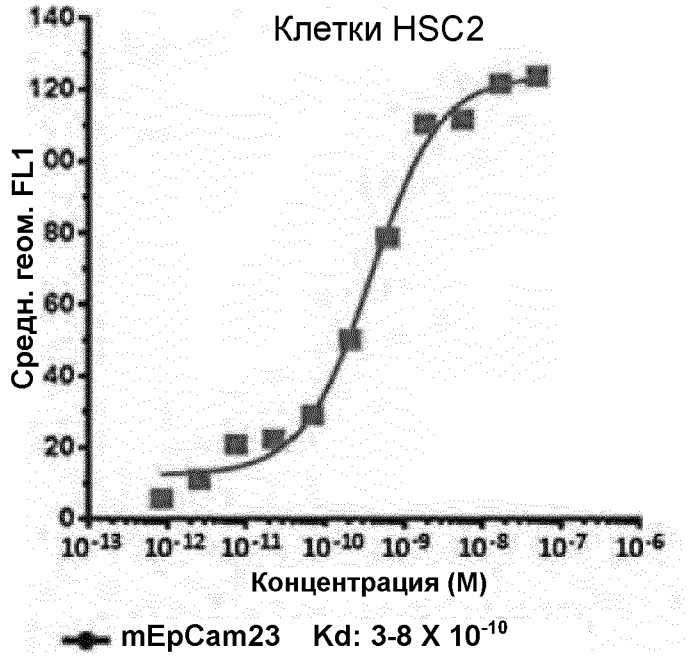
105. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование пищевода.

106. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование желудка.

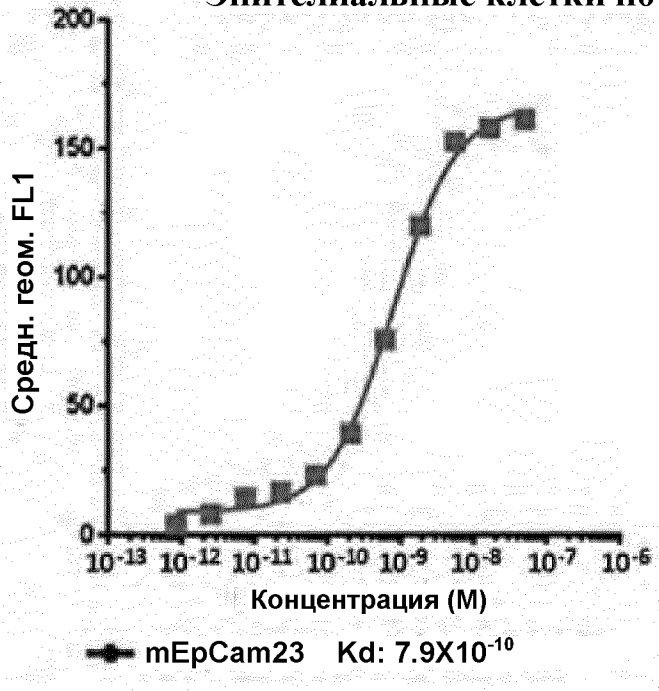
107. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование матки.

108. Способ лечения по п. 95, в котором злокачественное новообразование представляет собой злокачественное новообразование поджелудочной железы.

ФИГ. 1A


Клетки HSC2
Средн. геом. FL1
140
120
00
80
60
40
20
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Концентрация (M)
mEpCam23 Kd: 3-8 X 10-10

ФИГ. 1B


Эпителиальные клетки почки яванского макака
Средн. геом. FL1
200
150
100
50
0
10-13 10-12 10-11 10-10 10-9 10-8 10-7 10-6
Концентрация (M)
mEpCam23 Kd: 7.9X10-10

ФИГ. 2A

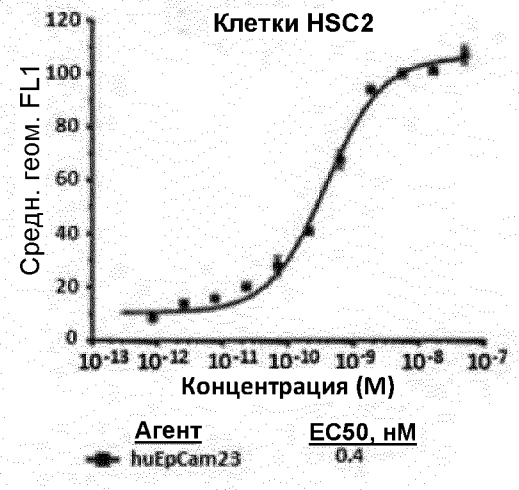
```
                <--------FR1-IMGT--------><CDR1-IMGT><---FR2-IMGT----><C><-------------FR3-IMGT----------
muEpCAM23    1 DIVLTQTPFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPHLLIYQTSNLASGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGV  90
IGKV2D29*02  1 ...M....L.LS..P.QP.....K..Q.......K.....Y........Q....EV..RF........G.........K...........  90
IGKV2D29*01  1 ...M....L.LS..P.QP.....K..Q.......K.....Y......P.Q....EV..RF........G.........K...........  90
IGKV229*02   1 ...M....L.LS..P.QP.....K..Q.......K.....Y........Q....EV.SRF........G.........K...........  90


                  -->
muEpCAM23    91  YYCAQNLELP  100
IGKV2D29*02  91  ...M.SIQ..  100
IGKV2D29*01  91  ...M.SIQ..  100
IGKV229*02   91  ...M.GIH..  100
```

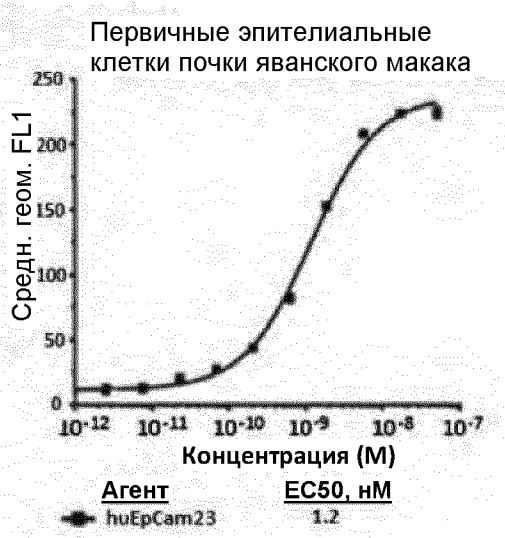
ФИГ. 2B

```
             <-------FR1-IMGT--------><CDR1-I><---FR2-IMGT----><CDR2-I><-------------FR3-IMGT-------------->
muEpCAM23 EVKLEESGPALVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGLDYIGWIYPGNVYIQYNEKFKGKATLTADKSSSTAFMQLSSLTSEDSAVYFCAR 98
IGHV13*01 Q.Q.VQ..AEVK......KV..........S.AM...R.A...R.EWM...NA..GNTK.SQ..Q.RV.I.R.T.A...Y.E....R...T...Y... 98
IGHV12*02 Q.Q.VQ..AEVK......KV..........G..M...R.A.....EWM...N.NSGGTN.AQ..Q.RV.M.R.T.I...Y.E..R.R.D.T...Y... 98
IGHV12*04 Q.Q.VQ..AEVK......KV..........G..M...R.A.....EWM...N.NSGGTN.AQ..Q.WV.M.R.T.I...Y.E..R.R.D.T...Y... 98
```

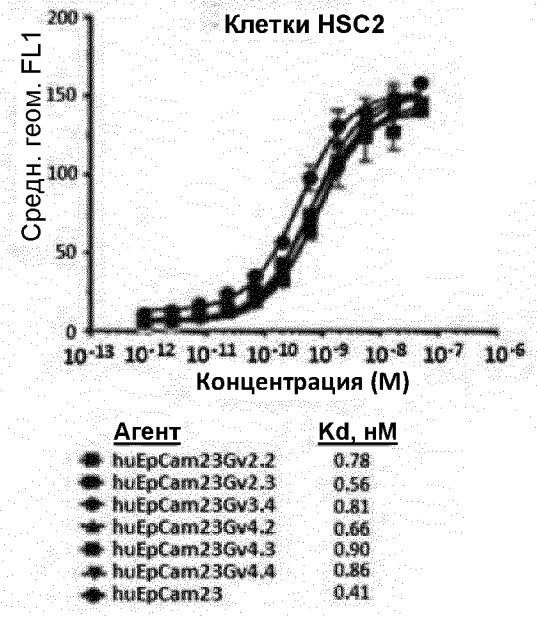
ФИГ. 3A



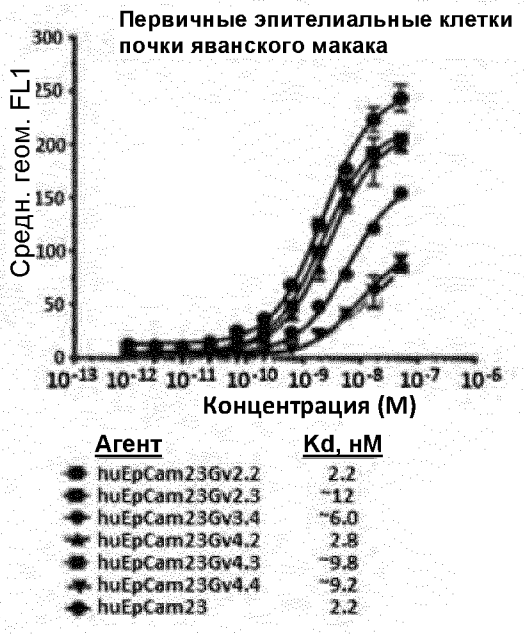
ФИГ. 3B



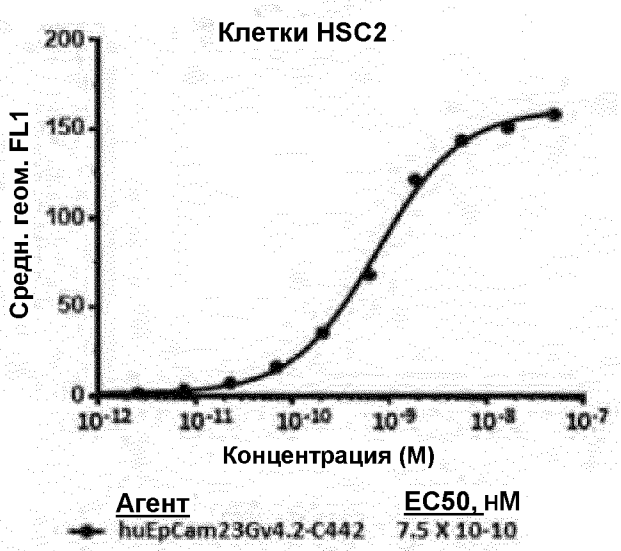
ФИГ. 3C



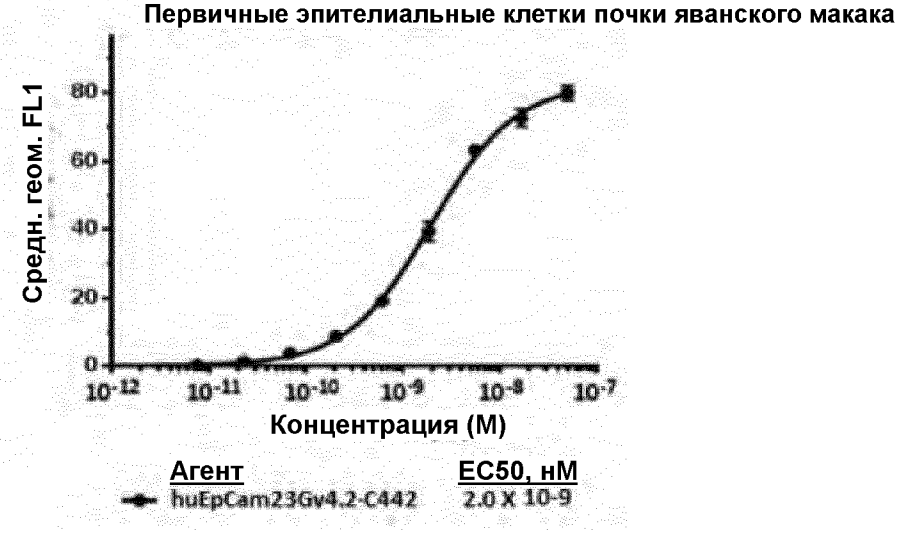
ФИГ. 3D



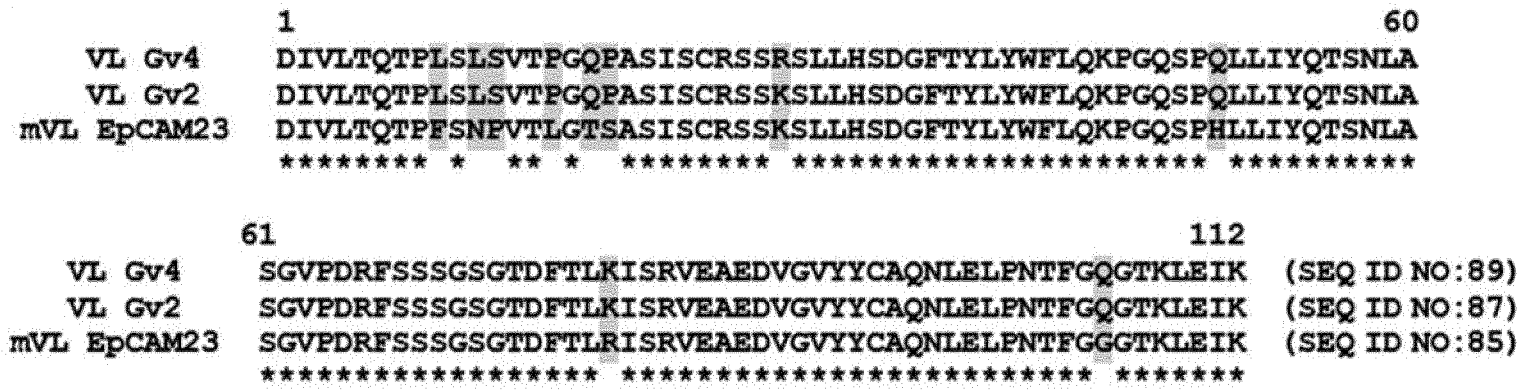
ФИГ. 3E


Клетки HSC2
Средн. геом. FL1
200
150
100
50
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
Концентрация (M)
Агент
EC50, нМ
huEpCam23Gv4.2-C442
7.5 X 10-10

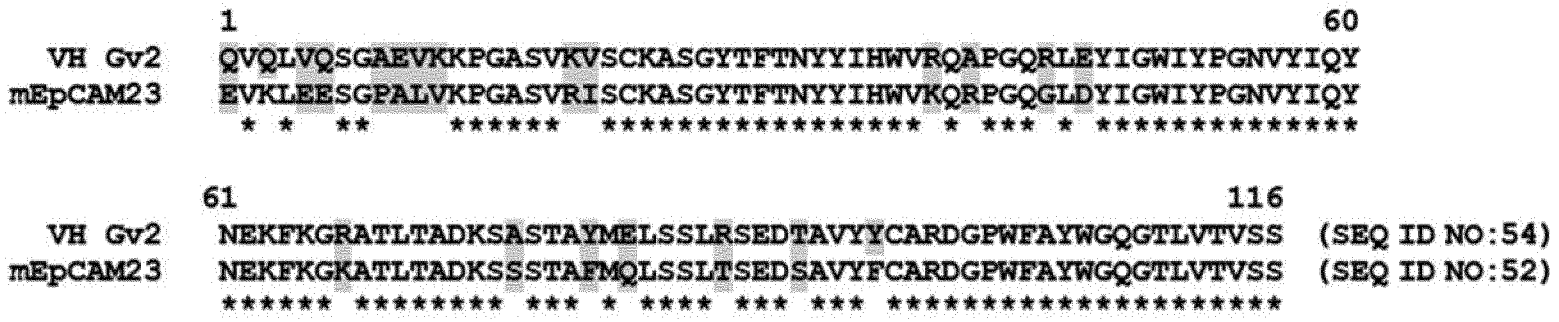
ФИГ. 3F


Первичные эпителиальные клетки почки яванского макака
Средн. геом. FL1
80
60
40
20
0
10-12
10-11
10-10
10-9
10-8
10-7
Концентрация (M)
Агент
EC50, нМ
huEpCam23Gv4.2-C442
2.0 X 10-9

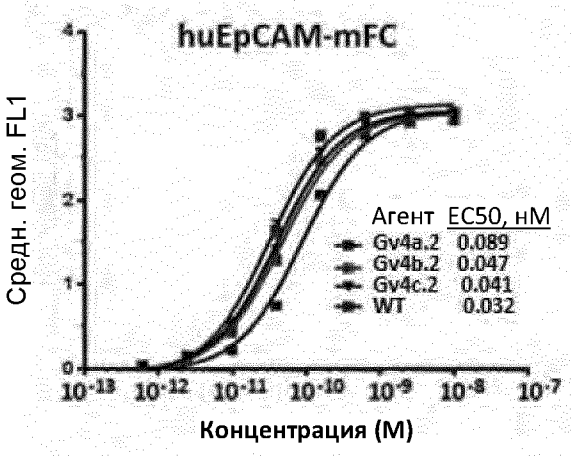
ФИГ. 4A


1 60
VL Gv4 DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSRSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLA
VL Gv2 DIVLTQTPLSLSVTPGQPASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPQLLIYQTSNLA
mVL EpCAM23 DIVLTQTPFSNPVTLGTSASISCRSSKSLLHSDGFTYLYWFLQKPGQSPHLLIYQTSNLA
61 112
VL Gv4 SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:89)
VL Gv2 SGVPDRFSSSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:87)
mVL EpCAM23 SGVPDRFSSSGSGTDFTLRISRVEAEDVGVYYCAQNLELPNTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO:85)

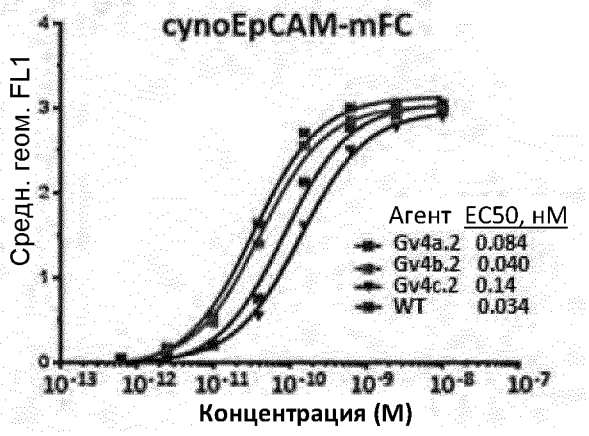
ФИГ. 4B


1 60
VH Gv2 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYIHWVRQAPGQRLEYIGWIYPGNVYIQY
mEpCAM23 EVKLEESGPALVKPGASVRISCKASGYTFTNYYIHWVKQRPGQGLDYIGWIYPGNVYIQY
61 116
VH Gv2 NEKFKGRATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:54)
mEpCAM23 NEKFKGKATLTADKSSSTAFMQLSSLTSEDSAVYFCARDGPWFAYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:52)

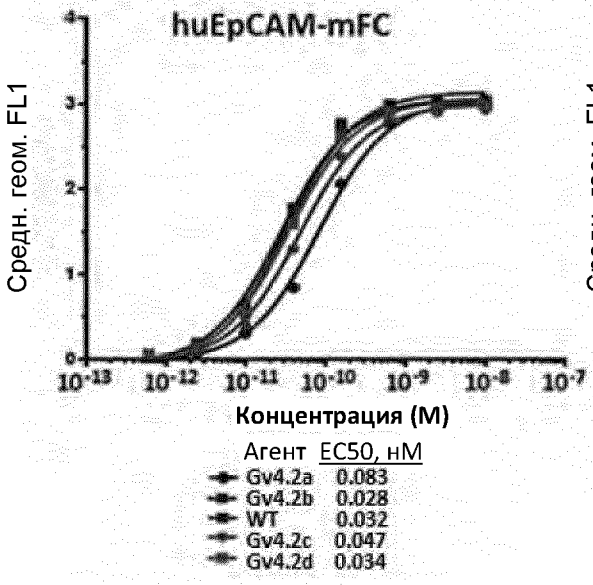
ФИГ. 5A



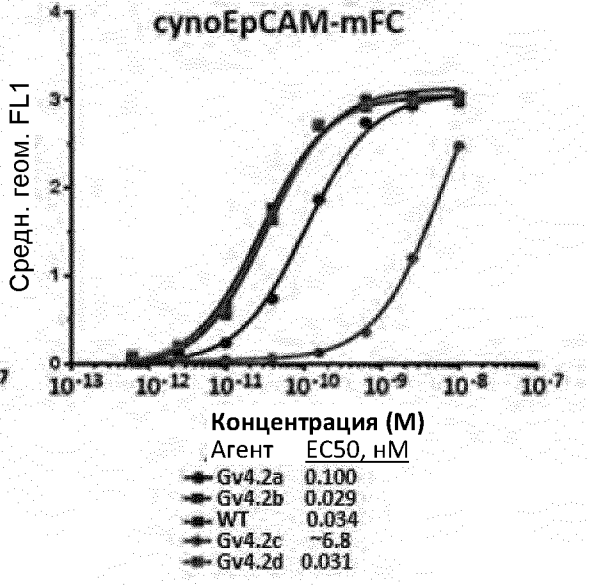
ФИГ. 5B



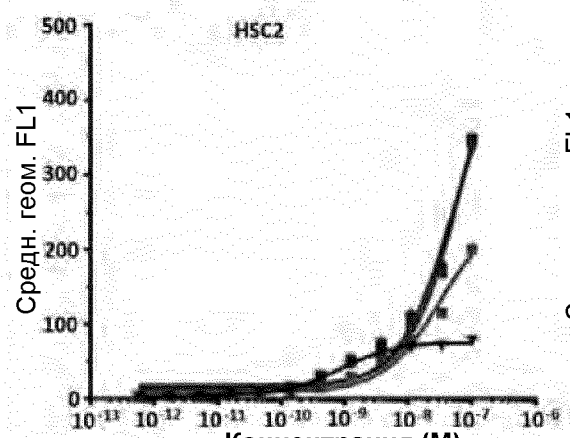
ФИГ. 5C



ФИГ. 5D



ФИГ. 5E



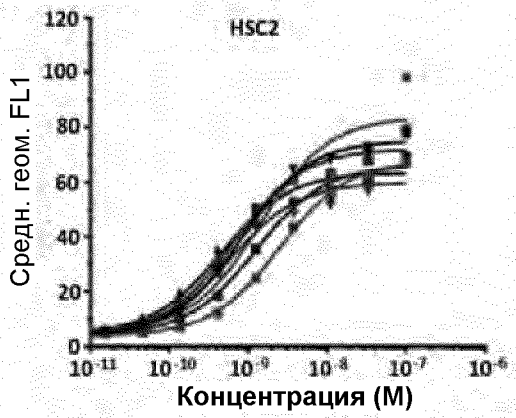
Агент	EC50, нМ
Gv4a.2a	NS
Gv4b.2a	NS
Gv4c.2a	NS
wt	0.8

ФИГ. 5F Первичные эпителиальные клетки почки яванского макака



Агент	EC50, нМ
Gv4a.2a	NS
Gv4b.2a	NS
Gv4c.2a	NS
wt	1.9

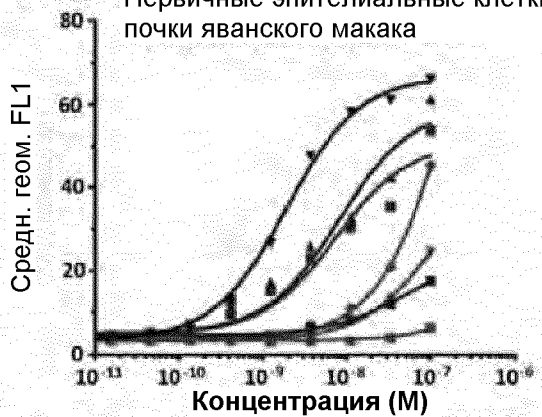
ФИГ. 5G



Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
Gv4a.2b	0.5	Gv4b.2d	1.4
Gv4a.2d	0.6	Gv4c.2b	1.3
Gv4b.2b	0.7	Gv4c.2d	2.5
wt	0.8		

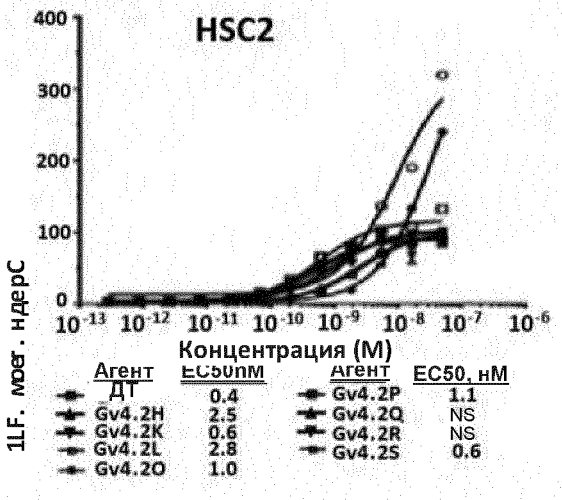
ФИГ. 5H

Первичные эпителиальные клетки почки яванского макака



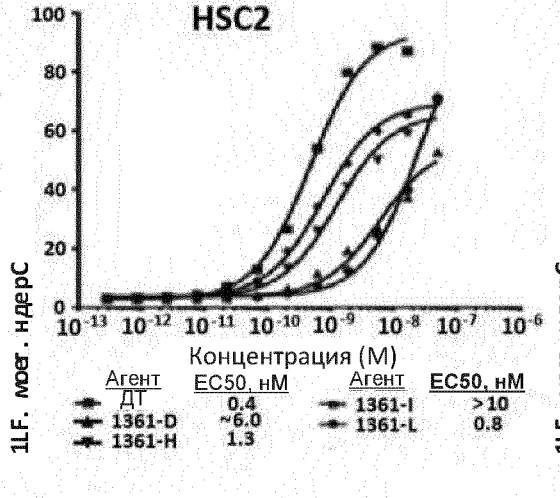
Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
Gv4a.2b	8.0	Gv4b.2d	NS
Gv4a.2d	NS	Gv4c.2b	NS
Gv4b.2b	7.2	Gv4c.2d	NS
wt	1.9		

ФИГ. 5I



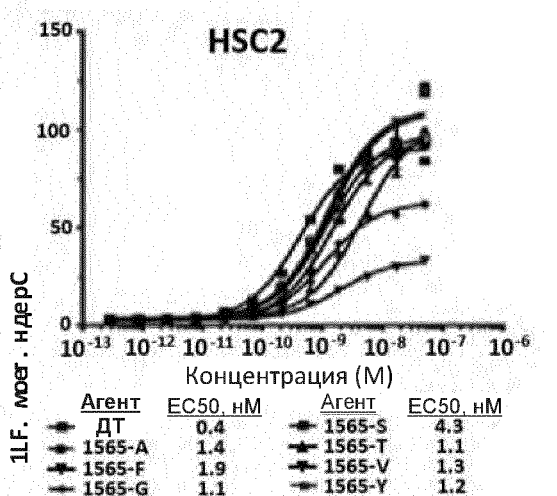
Агент	EC50nM	Агент	EC50, нМ
ДТ	0.4	Gv4.2P	1.1
Gv4.2H	2.5	Gv4.2Q	NS
Gv4.2K	0.6	Gv4.2R	NS
Gv4.2L	2.8	Gv4.2S	0.6
Gv4.2O	1.0		

ФИГ. 5J



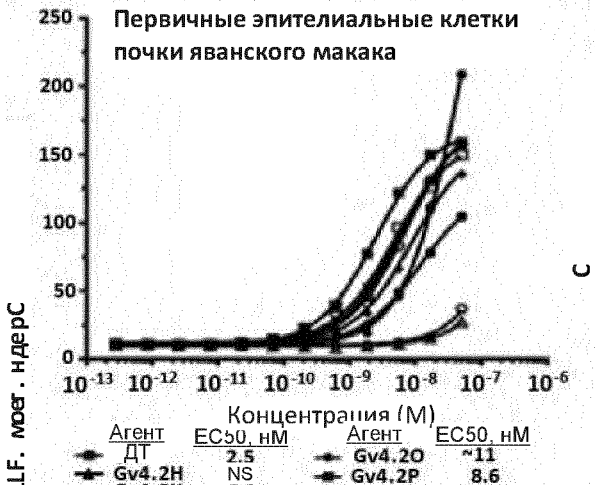
Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
ДТ	0.4	1361-I	>10
1361-D	~6.0	1361-L	0.8
1361-H	1.3		

ФИГ. 5K



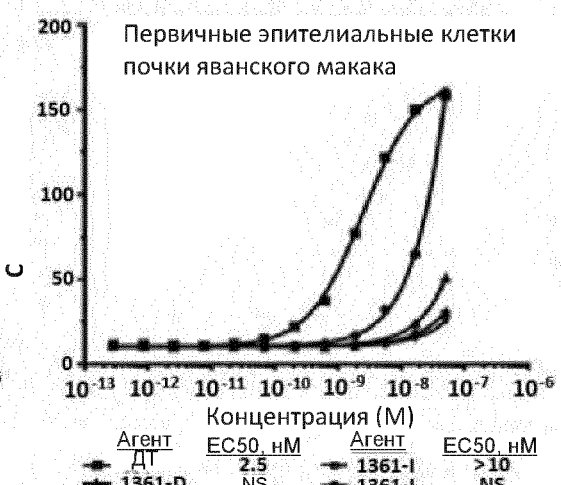
Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
ДТ	0.4	1565-S	4.3
1565-A	1.4	1565-T	1.1
1565-F	1.9	1565-V	1.3
1565-G	1.1	1565-Y	1.2

ФИГ. 5L



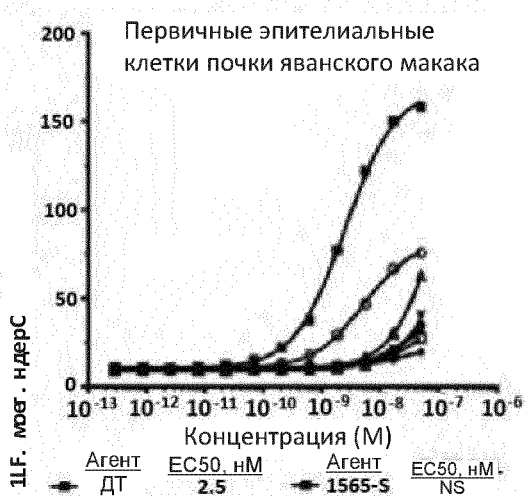
Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
ДТ	2.5	Gv4.2O	~11
Gv4.2H	NS	Gv4.2P	8.6
Gv4.2K	6.0	Gv4.2Q	NS
Gv4.2L	NS	Gv4.2R	7.4
		Gv4.2S	4.7

ФИГ. 5M



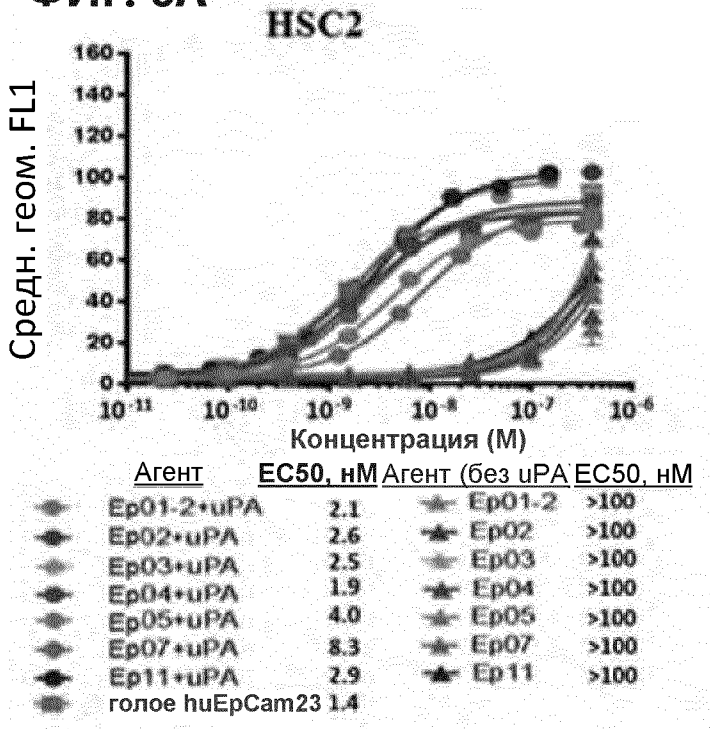
Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
ДТ	2.5	1361-I	>10
1361-D	NS	1361-L	NS
1361-H	NS		

ФИГ. 5N

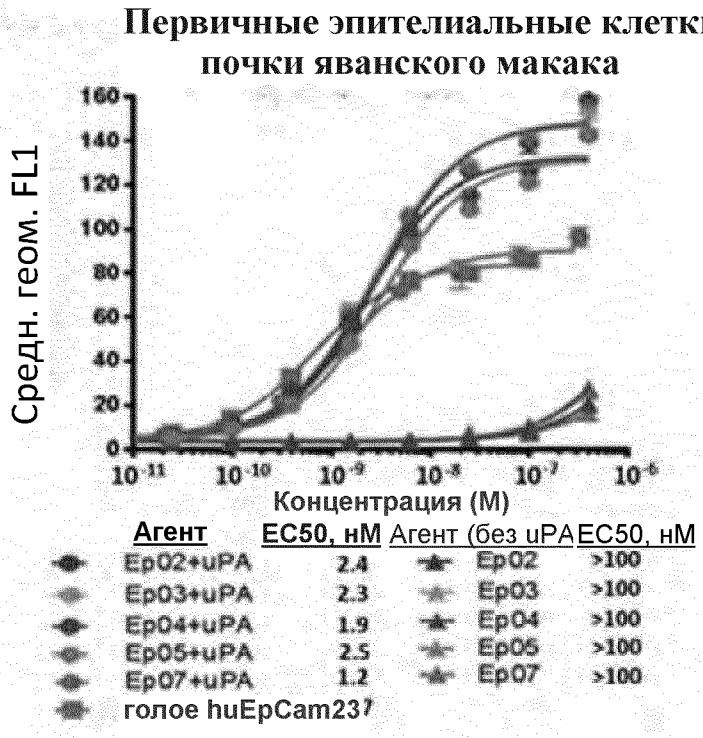


Агент	EC50, нМ	Агент	EC50, нМ
ДТ	2.5	1565-S	NS
1565-A	NS	1565-T	NS
1565-F	NS	1565-V	NS
1565-G	NS	1565-Y	~5.2

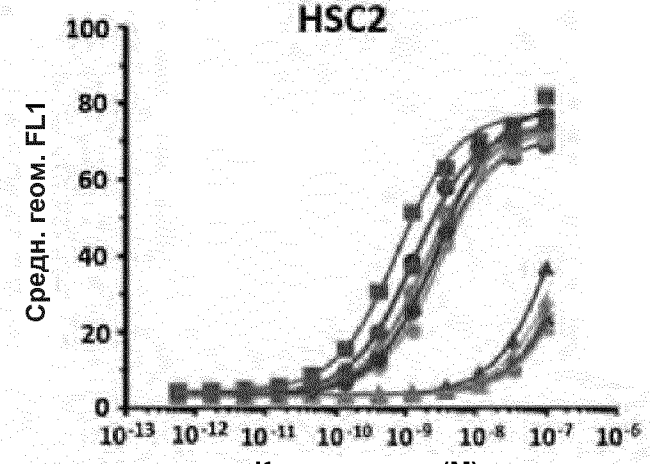
ФИГ. 6А


HSC2
Средн. геом. FL1
Концентрация (М)
Агент EC50, нМ Агент (без uPA EC50, нМ
Ep01-2+uPA 2.1 Ep01-2 >100
Ep02+uPA 2.6 Ep02 >100
Ep03+uPA 2.5 Ep03 >100
Ep04+uPA 1.9 Ep04 >100
Ep05+uPA 4.0 Ep05 >100
Ep07+uPA 8.3 Ep07 >100
Ep11+uPA 2.9 Ep11 >100
голое huEpCam23 1.4

ФИГ. 6В

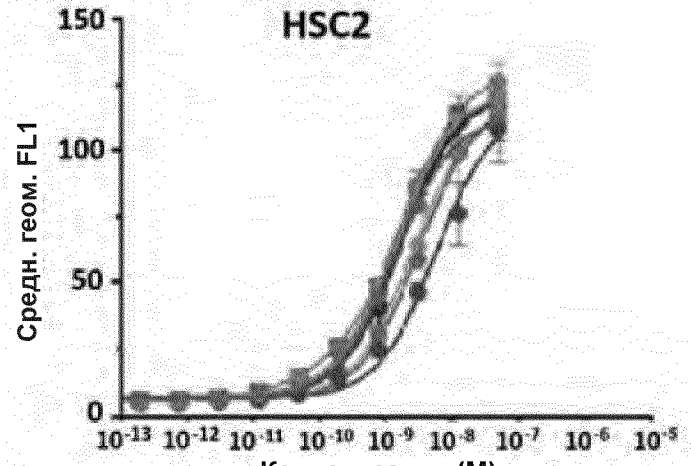

Первичные эпителиальные клетки почки яванского макака
Средн. геом. FL1
Концентрация (М)
Агент EC50, нМ Агент (без uPA EC50, нМ
Ep02+uPA 2.4 Ep02 >100
Ep03+uPA 2.3 Ep03 >100
Ep04+uPA 1.9 Ep04 >100
Ep05+uPA 2.5 Ep05 >100
Ep07+uPA 1.2 Ep07 >100
голое huEpCam237

ФИГ. 7A



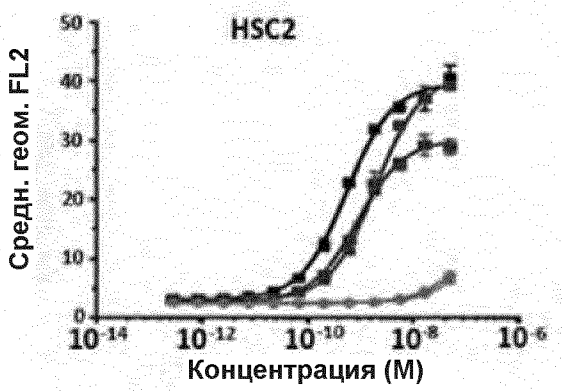
3014·DM4+uPA	EC50, нМ	NSUB DM4+uPA	EC50, нМ
Ep01-2	1.98	Ep01-2	>100
Ep02	2.42	Ep02	>100
Ep03	2.07	Ep03	>100
Ep04	3.18	Ep04	>100
Ep05	2.82	Ep05	>100
Ep07	1.34	Ep07	>100
Ep11	1.26	Ep11	>100
EpCAM·DM4 ADC	0.76		

ФИГ. 7B



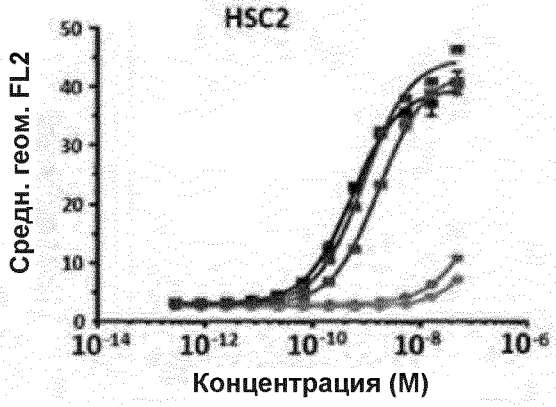
3014·DGN549+uPA	EC50, нМ
Ep01-2	1.4
Ep02	6.8
Ep03	2.5
Ep04	1.3
Ep05	1.7
Ep07	3.1
Ep11	1.7
EpCAM ADC	1.3

ФИГ. 8A



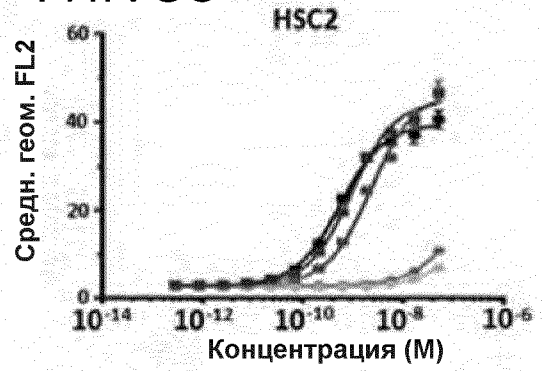
Агент	нМ
EP05-2014-DM4+uPA	1.9
EP05-2014-DM4 no uPA	>50
EP05-2014-+uPA	0.89
EP05-2014- no uPA	>50
Антитело ДТ	0.56

ФИГ. 8B



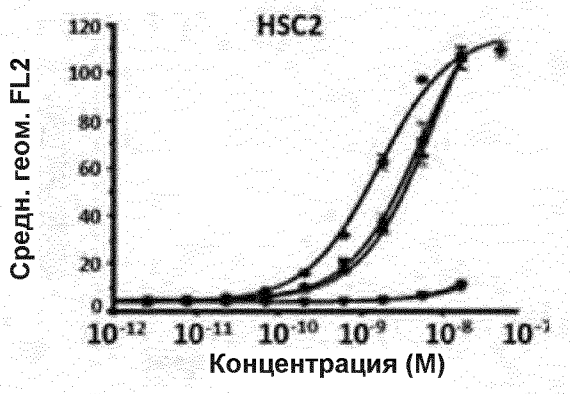
Агент	нМ
EP05-3014-DM4+uPA	1.8
EP05-3014-DM4 no uPA	>50
EP05-3014-+uPA	0.91
EP05-3014- no uPA	>50
Антитело ДТ	0.56

ФИГ. 8C



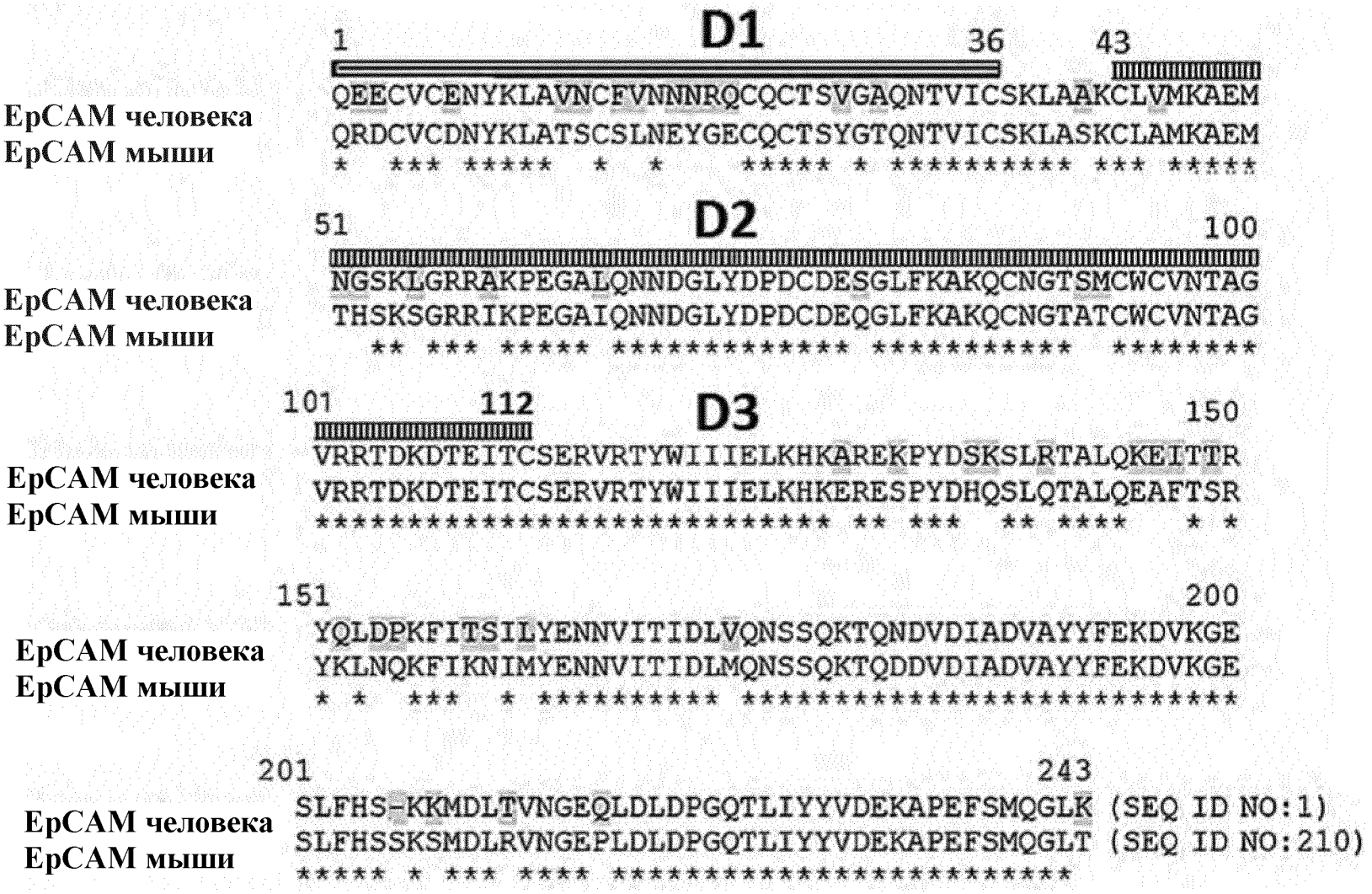
Агент	нМ
Ep05-3014-DGN549+uPA	2.3
Ep05-3014-DGN549 no uPA	>50
Ep05-3014+uPA	0.91
Ep05-3014 no uPA	>50
Антитело ДТ	0.56

ФИГ. 8D

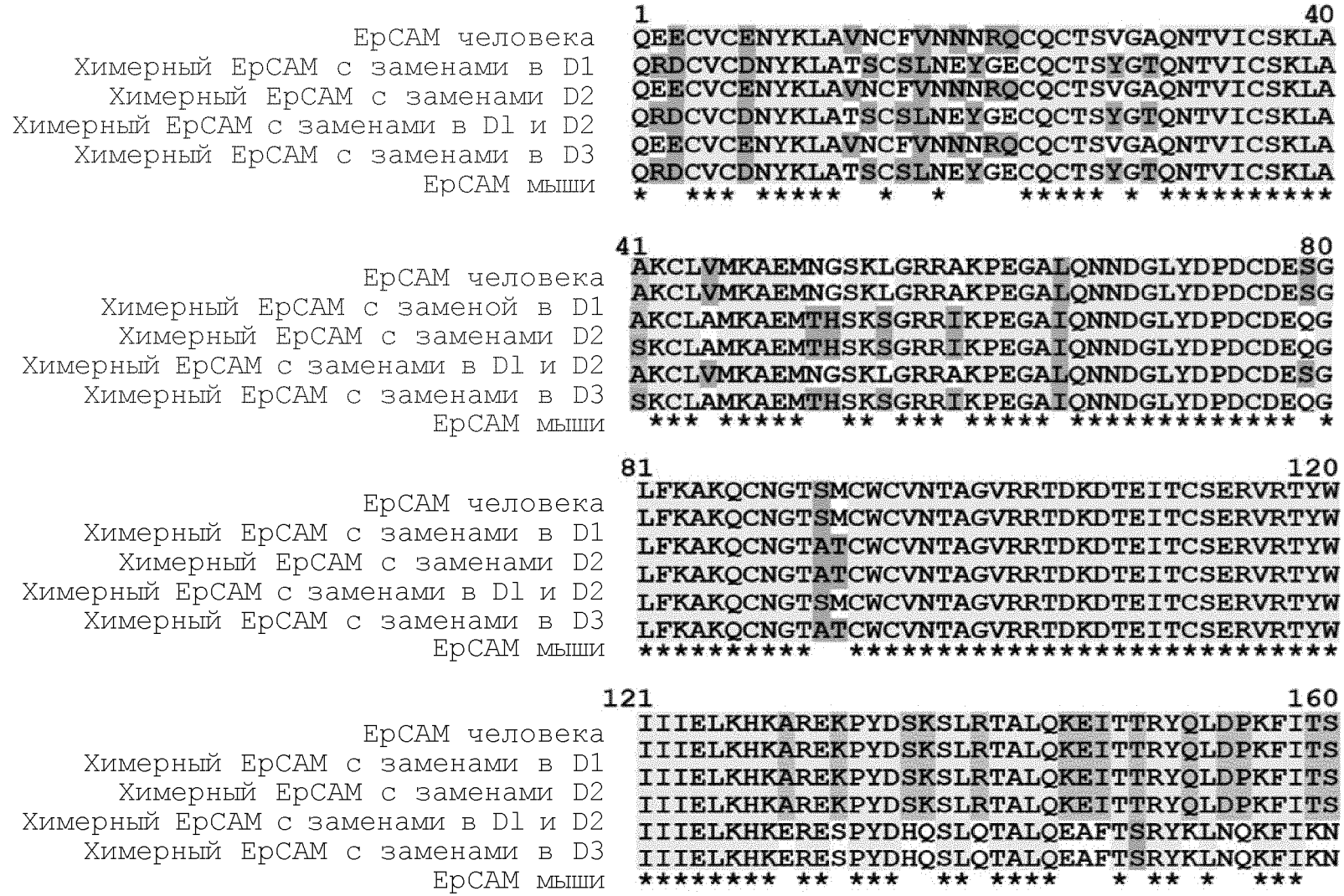


Агент	нМ
huEpCAM-DM21 ADC	1.5
Ep05-3014-DM32+uPA	7.2
Ep05-3014-DM21 no uPA	>50
Ep05-2014-DM21+ uPA	5.4
Ep05-2014-DM21 no uPA	>50

ФИГ. 9


D1
1
36
43
EpCAM человека QEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLAAKCLVMKAEM
EpCAM мыши QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLASKCLAMKAEM
D2
51
100
EpCAM человека NGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESGLFKAKQCNGTSMCWCVNTAG
EpCAM мыши THSKSGRRIKPEGAIQNNDGLYDPDCDEQGLFKAKQCNGTATCWCVNTAG
D3
101
112
150
EpCAM человека VRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTR
EpCAM мыши VRRTDKDTEITCSERVRTYWIIIELKHKERESPYDHQSLQTALQEAFTSR
151
200
EpCAM человека YQLDPKFITSILYENNVITIDLVQNSSQKTQNDVDIADVAYYFEKDVKGE
EpCAM мыши YKLNQKFIKNIMYENNVITIDLMQNSSQKTQDDVDIADVAYYFEKDVKGE
201
243
EpCAM человека SLFHS-KKMDLTVNGEQLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLK (SEQ ID NO:1)
EpCAM мыши SLFHSSKSMDLRVNGEPLDLDPGQTLIYYVDEKAPEFSMQGLT (SEQ ID NO:210)

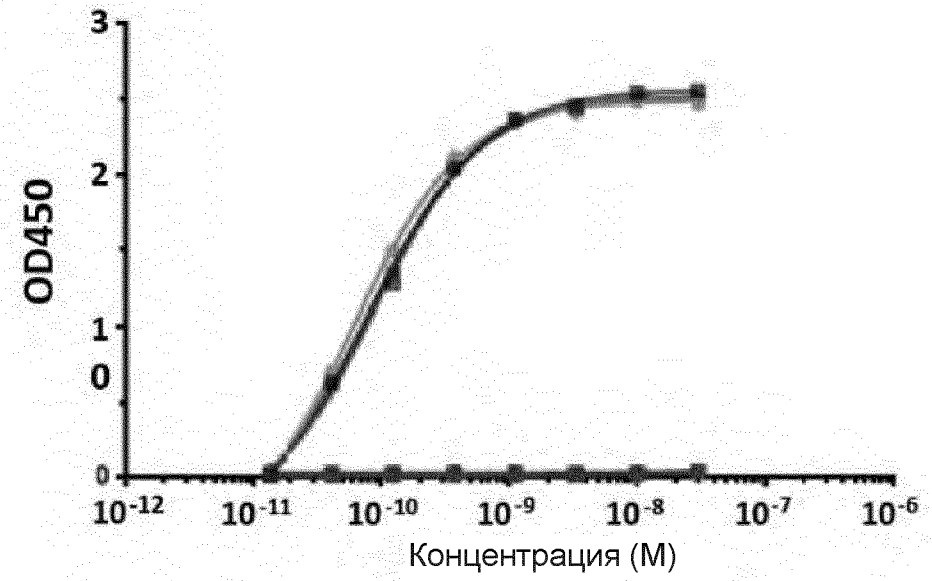
ФИГ. 10A


1 40
EpCAM человека QEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLA
Химерный EpCAM с заменами в D1 QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLA
Химерный EpCAM с заменами D2 QEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLA
Химерный EpCAM с заменами в Dl и D2 QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLA
Химерный EpCAM с заменами в D3 QEECVCENYKLAVNCFVNNNRQCQCTSVGAQNTVICSKLA
EpCAM мыши QRDCVCDNYKLATSCSLNEYGECQCTSYGTQNTVICSKLA
41 80
EpCAM человека AKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESG
Химерный EpCAM с заменой в D1 AKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESG
Химерный EpCAM с заменами D2 AKCLAMKAEMTHSKSGRRIKPEGAIQNNDGLYDPDCDEQG
Химерный EpCAM с заменами в Dl и D2 SKCLAMKAEMTHSKSGRRIKPEGAIQNNDGLYDPDCDEQG
Химерный EpCAM с заменами в D3 AKCLVMKAEMNGSKLGRRAKPEGALQNNDGLYDPDCDESG
EpCAM мыши SKCLAMKAEMTHSKSGRRIKPEGAIQNNDGLYDPDCDEQG
81 120
EpCAM человека LFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYW
Химерный EpCAM с заменами в D1 LFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYW
Химерный EpCAM с заменами D2 LFKAKQCNGTATCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYW
Химерный EpCAM с заменами в Dl и D2 LFKAKQCNGTATCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYW
Химерный EpCAM с заменами в D3 LFKAKQCNGTSMCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYW
EpCAM мыши LFKAKQCNGTATCWCVNTAGVRRTDKDTEITCSERVRTYW
121 160
EpCAM человека IIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITS
Химерный EpCAM с заменами в D1 IIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITS
Химерный EpCAM с заменами D2 IIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITS
Химерный EpCAM с заменами в Dl и D2 IIIELKHKAREKPYDSKSLRTALQKEITTRYQLDPKFITS
Химерный EpCAM с заменами в D3 IIIELKHKERESPYDHQSLQTALQEAFTSRYKLNQKFIKN
EpCAM мыши IIIELKHKERESPYDHQSLQTALQEAFTSRYKLNQKFIKN

ФИГ. 10B

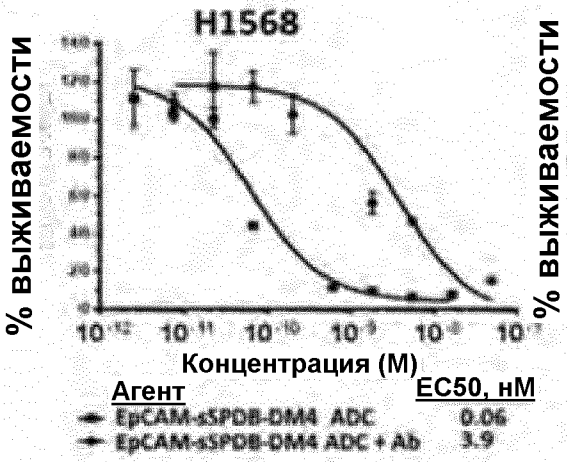
```
                                  161                                                
```

ФИГ. 11

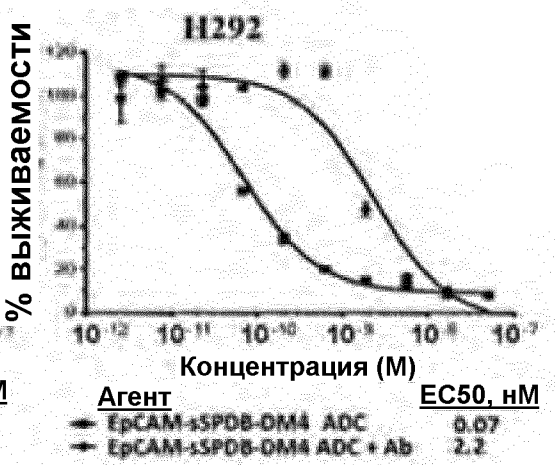


Агент	EC50, нМ
D1	Отсутствие связывания
D2	0.08
D1/2	Отсутствие связывания
D3	0.06
Аг ДТ	0.09

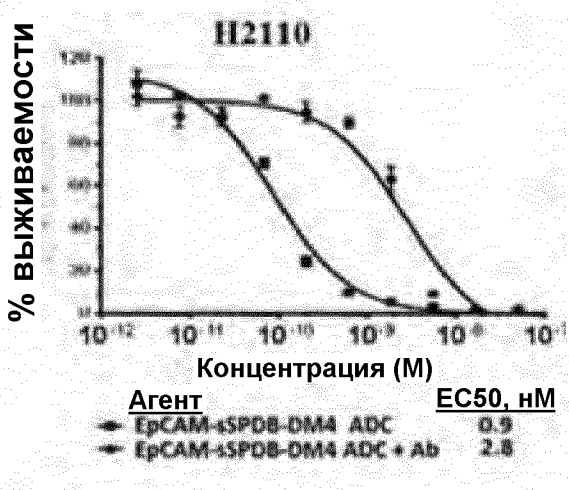
ФИГ. 12A



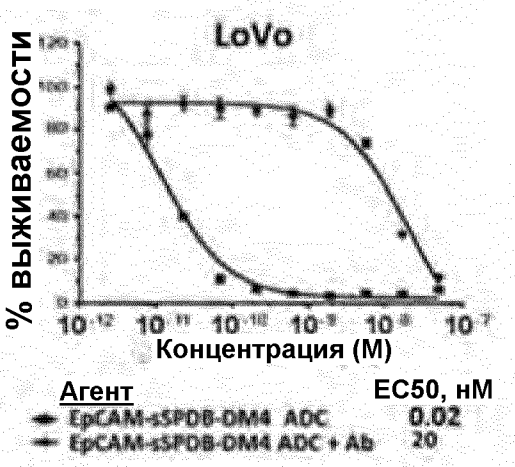
ФИГ. 12B



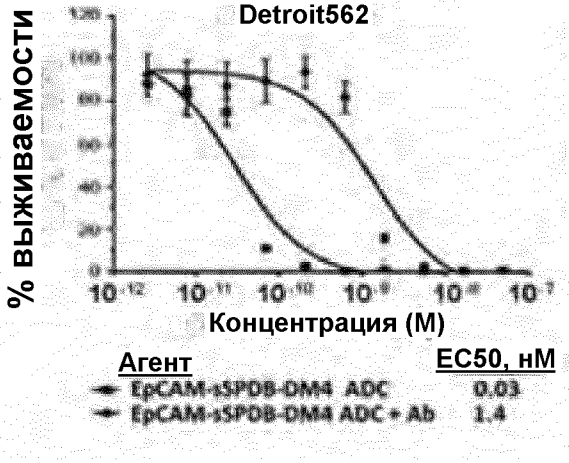
ФИГ. 12C



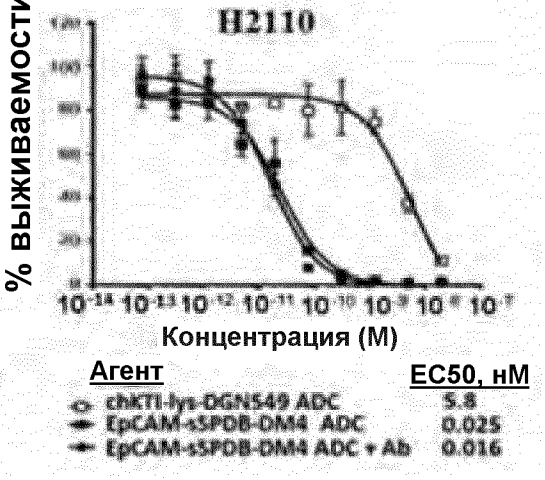
ФИГ. 12D



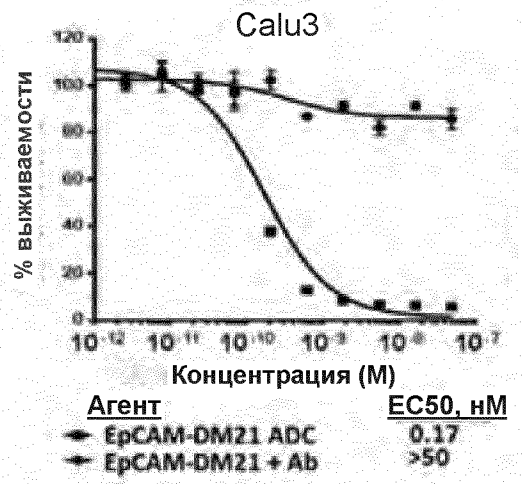
ФИГ. 12E



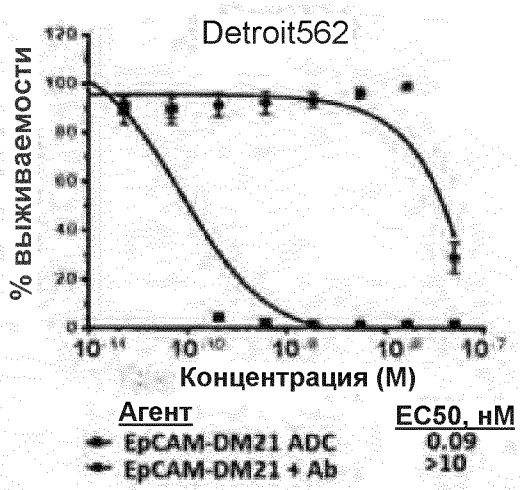
ФИГ. 12F



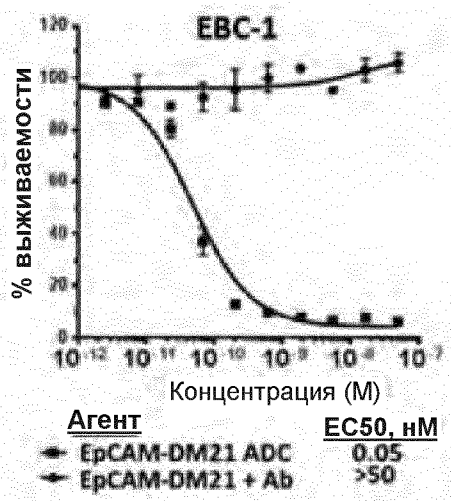
ФИГ. 12G



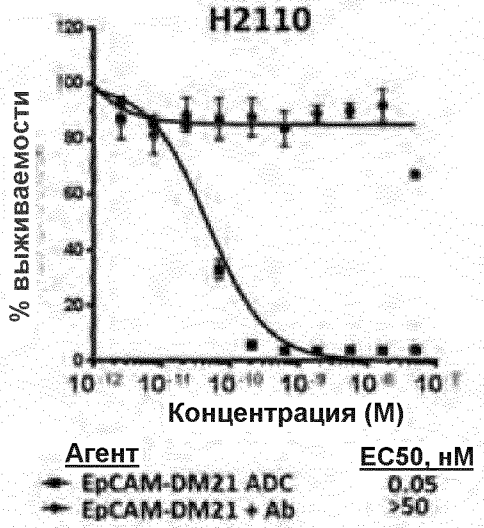
ФИГ. 12H



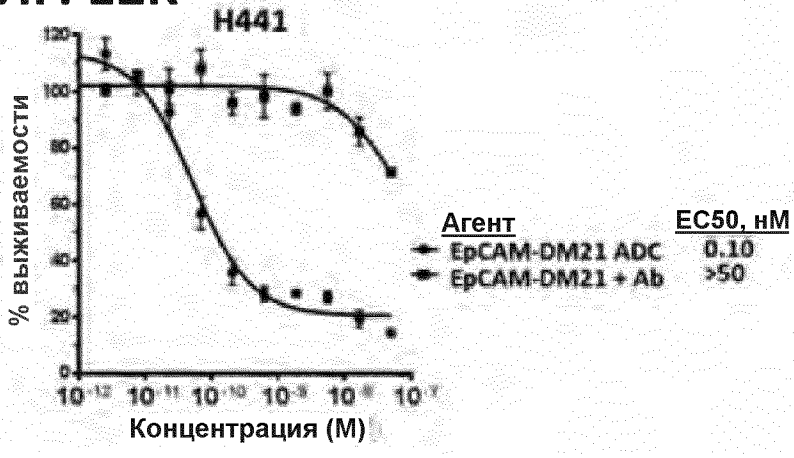
ФИГ. 12I



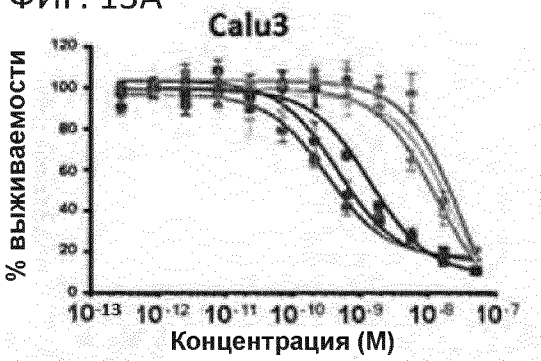
ФИГ. 12J



ФИГ. 12K

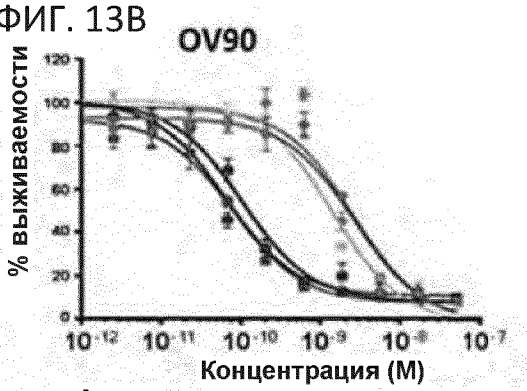


ФИГ. 13A



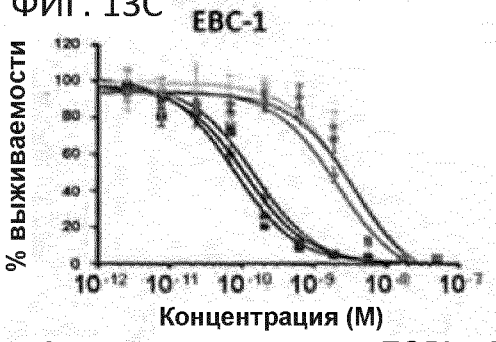
Агент	EC50, нМ
EpCAM-sSPDB-DM4 ADC	0.46
chKTI-sSPDB-DM4 ADC	25.3
Ep05-2014-DM4+uPA	0.31
Ep05-2014-DM4 no uPA	5.6
EP05-3014-DM4+uPA	1.4
EP05-3014-DM4 no uPA	34

ФИГ. 13B



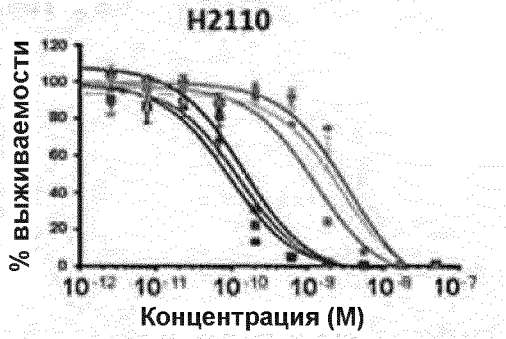
Агент	EC50, нМ
EpCAM-sSPDB-DM ADC	0.06
chKTI-sSPDB-DM4 ADC	2.5
Ep05-2014-DM4+uPA	0.08
Ep05-2014-DM4 no uPA	1.4
EP05-3014-DM4+uPA	0.1
EP05-3014-DM4 no uPA	28

ФИГ. 13C



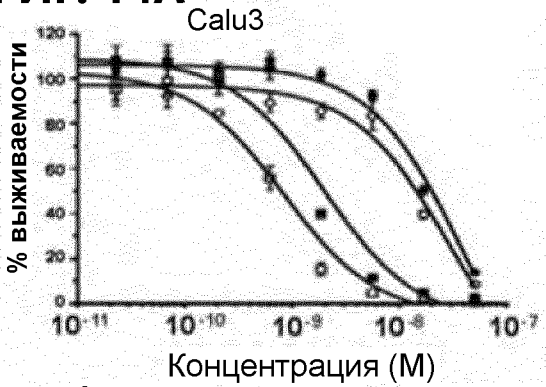
Агент	EC50, нМ
EpCAM-sSPDB-DM4 ADC	0.08
chKTI-sSPDB-DM4 ADC	2.1
Ep05-2014-DM4+uPA	0.15
Ep05-2014-DM4 no uPA	3.3
EP05-3014-DM4+uPA	0.1
EP05-3014-DM4 no uPA	3.6

ФИГ. 13D



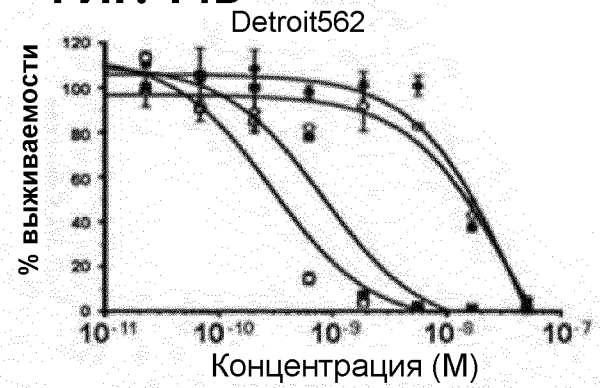
Агент	EC50, нМ
EpCAM-sSPDB-DM4 ADC	0.094
chKTI-sSPDB-DM4 ADC	1.3
Ep05-2014-DM4+uPA	0.13
Ep05-2014-DM4 no uPA	2.9
EP05-3014-DM4+uPA	0.14
EP05-3014-DM4 no uPA	3.5

ФИГ. 14A



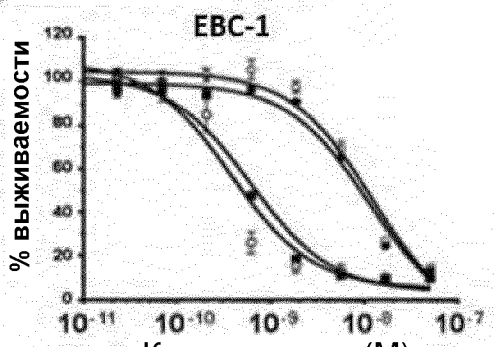
Агент	EC50, нМ
EpCAM-3014 DM21 без uPA	39
EpCAM-3014 DM21+uPA	2.0
EpCAM-2014 DM21 без uPA	33
EpCAM-2014 DM21+uPA	0.8

ФИГ. 14B



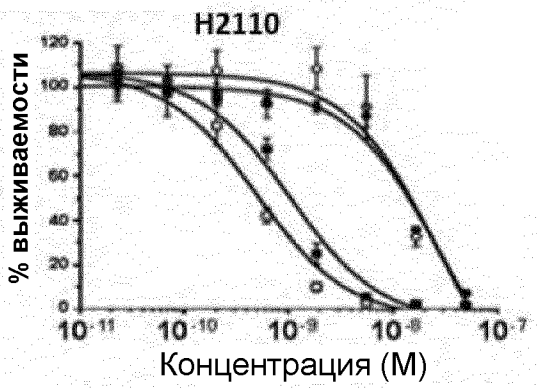
Агент	EC50, нМ
EpCAM-3014 DM21 без uPA	40
EpCAM-3014 DM21+uPA	0.8
EpCAM-2014 DM21 без uPA	34
EpCAM-2014 DM21+uPA	0.29

ФИГ. 14C



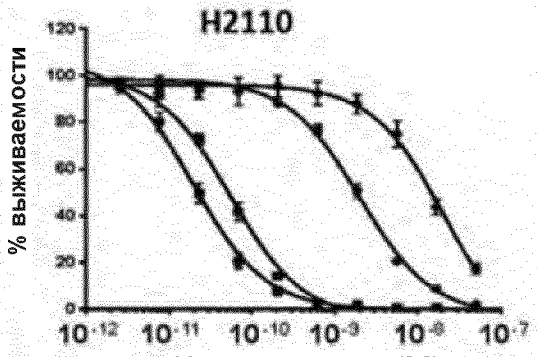
Агент	EC50, нМ
EpCAM-3014 DM21 без uPA	11
EpCAM-3014 DM21+uPA	0.6
EpCAM-2014 DM21 без uPA	12
EpCAM-2014 DM21+uPA	0.4

ФИГ. 14D



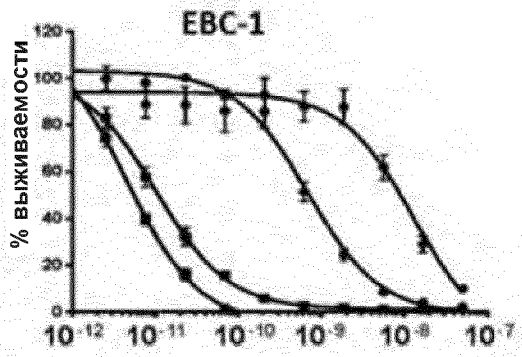
Агент	EC50, нМ
EpCAM-3014 DM21 без uPA	27
EpCAM-3014 DM21+uPA	1.1
EpCAM-2014 DM21 без uPA	26
EpCAM-2014 DM21+uPA	0.4

ФИГ. 15A



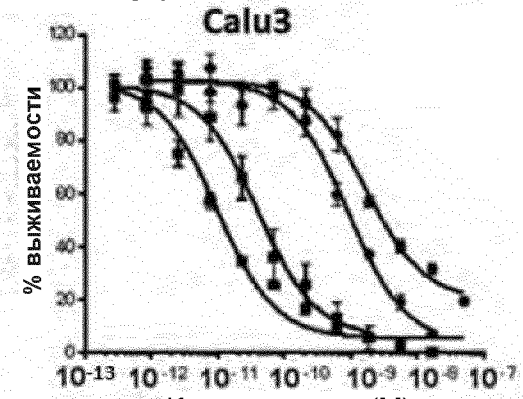
Агент	EC50, нМ
EpCAM-DGN549 ADC	0.02
chKTI-DGN549 ADC	21.1
Ep05-3014-DGN549+uPA	0.06
Ep05-3014-DGN549 без uPA	2.0

ФИГ. 15B



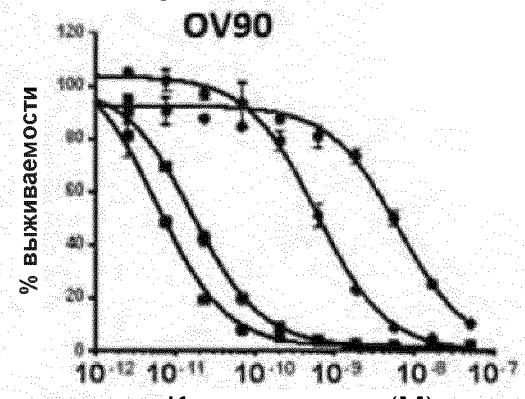
Агент	EC50, нМ
EpCAM-DGN549 ADC	0.004
chKTI-IGN149 ADC	13.1
Ep05-3014-DGN549+uPA	0.01
Ep05-3014-DGN549 без uPA	0.68

ФИГ. 15C



Агент	EC50, нМ
EpCAM-DGN549 ADC	0.01
chKTI-DGN549 ADC	3.6
Ep05-3014-DGN549+uPA	0.04
Ep05-3014-DGN549 без uPA	0.91

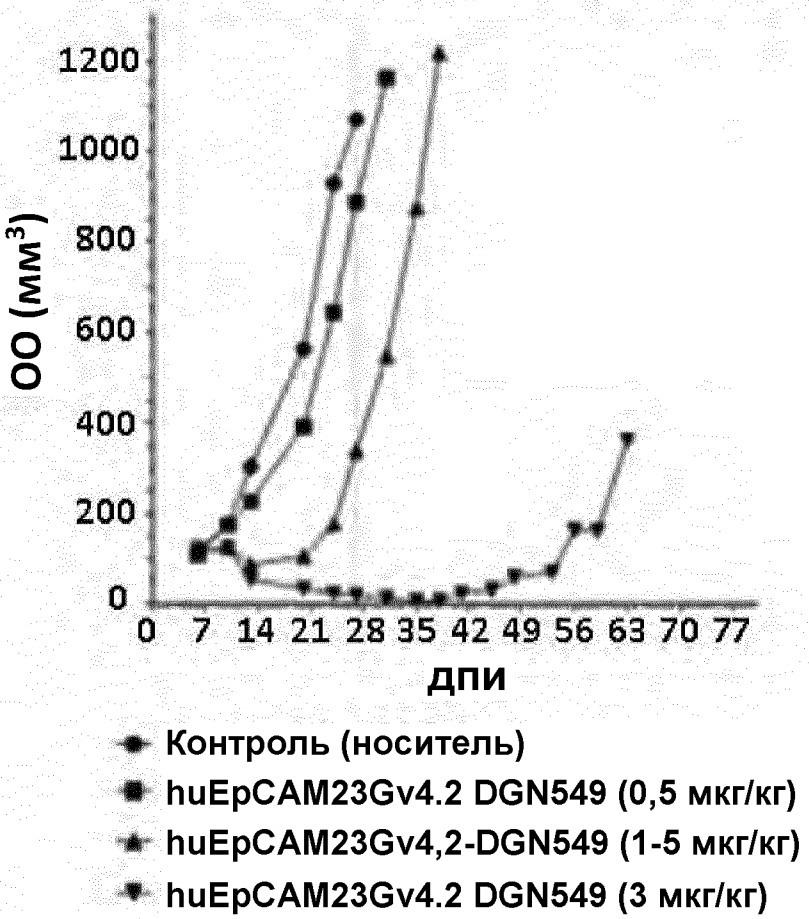
ФИГ. 15D



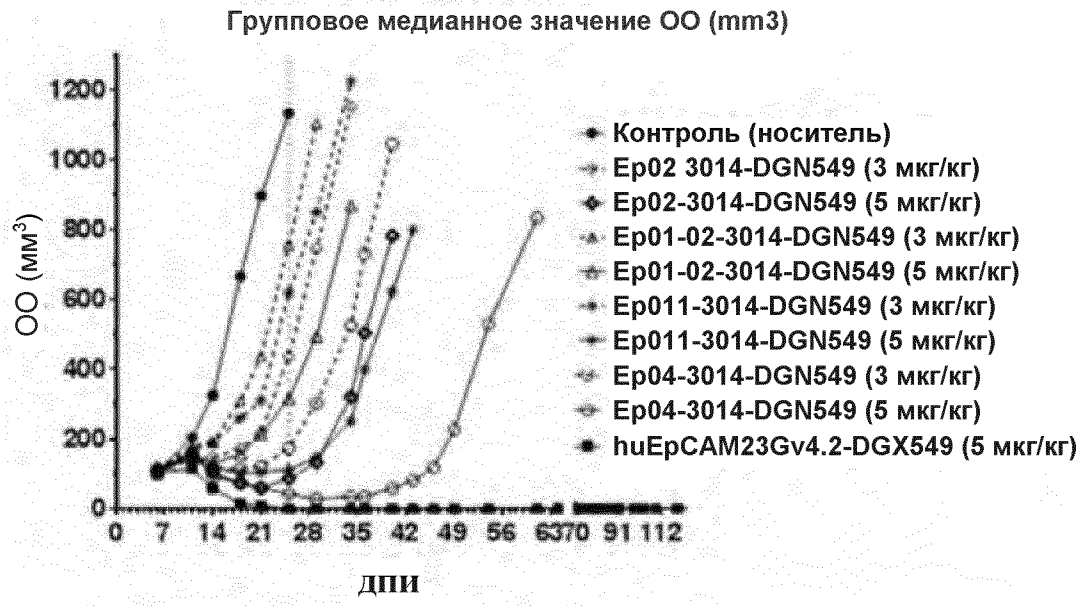
Агент	EC50, нМ
EpCAM-DGN549 ADC	0.006
chKTI-IGN149 ADC	6.3
Ep05-3014-DGN549+uPA	0.0017
Ep05-3014-DGN549 без uPA	0.59

ФИГ. 16

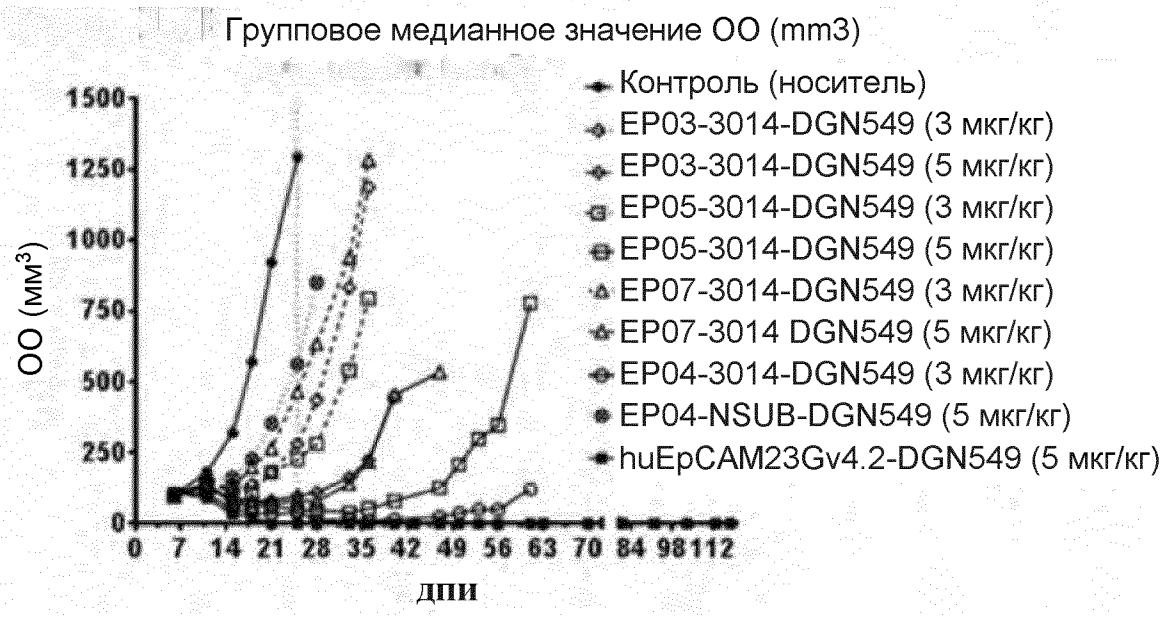
Групповое медианное значение ОО ($мм^3$)



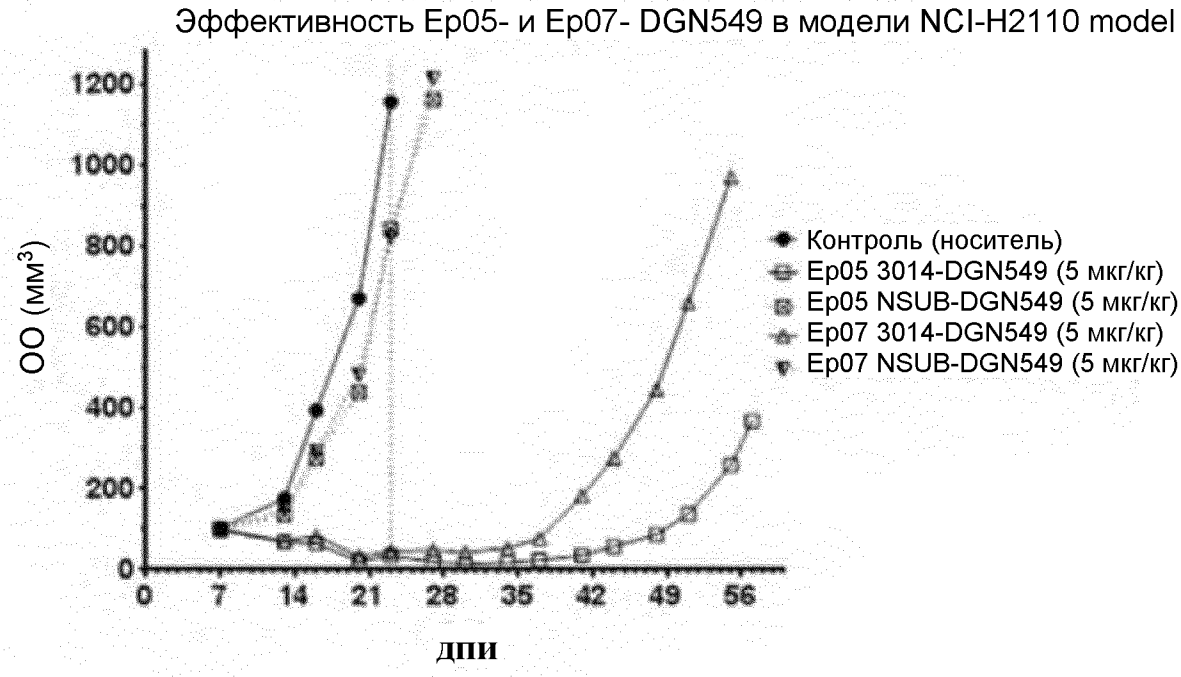
ФИГ. 17A



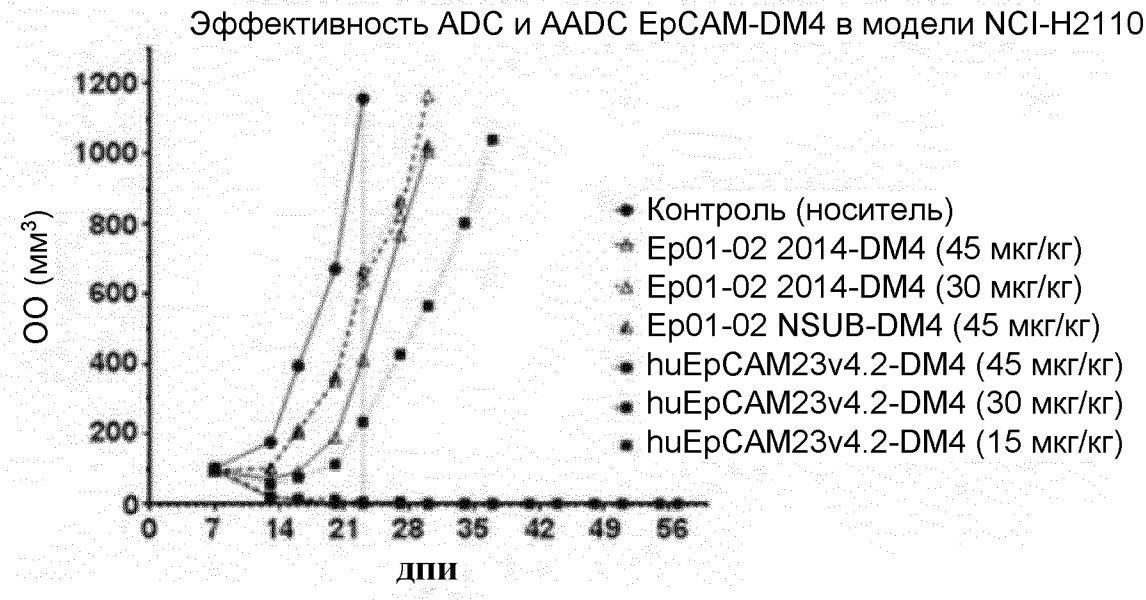
ФИГ. 17B



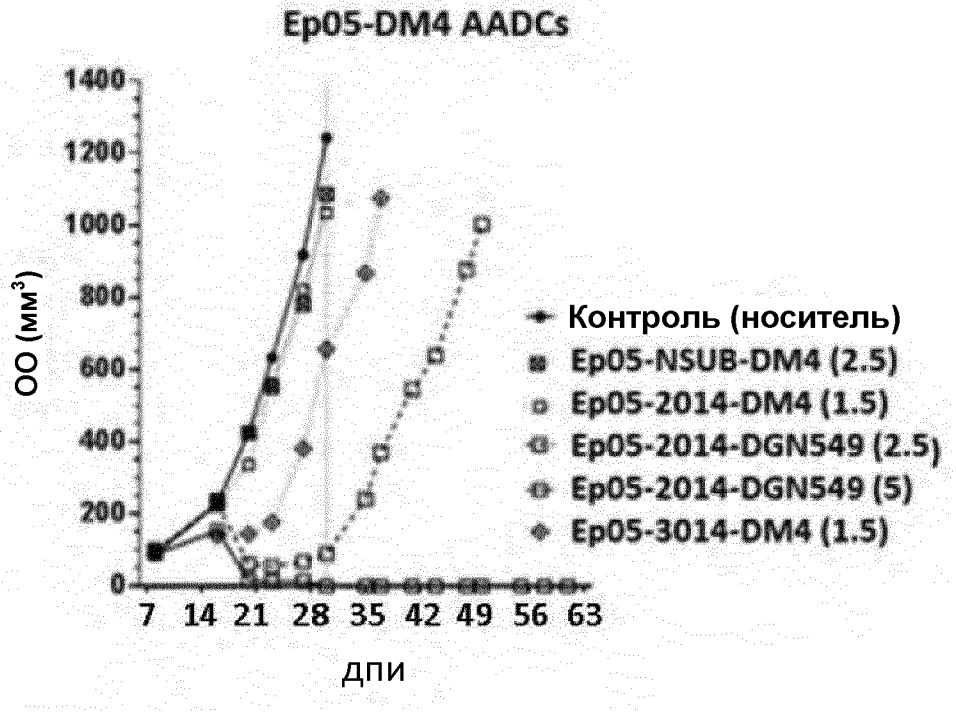
ФИГ. 17C



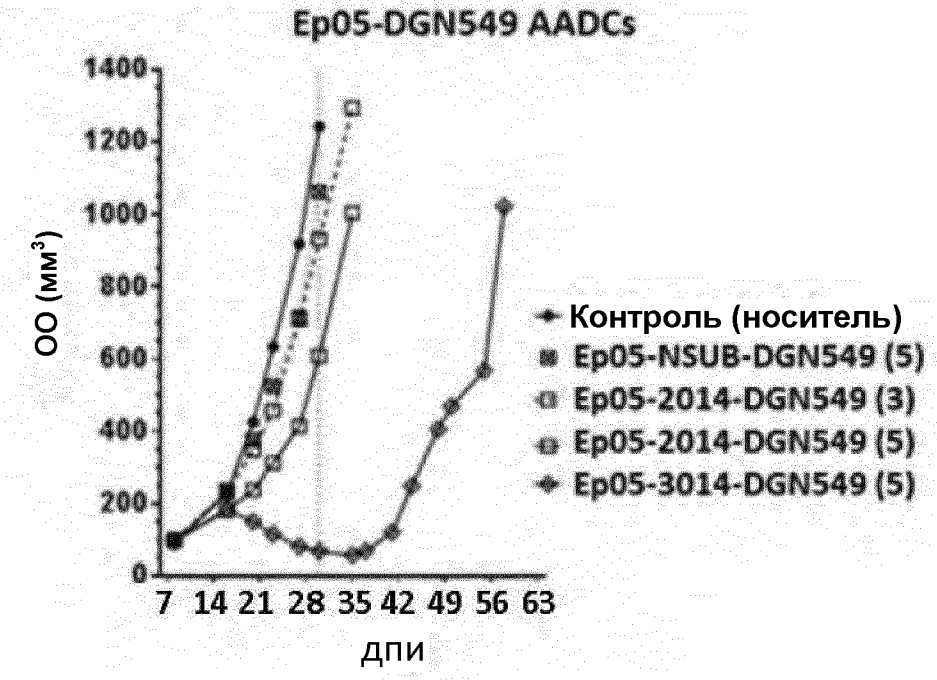
ФИГ. 17D



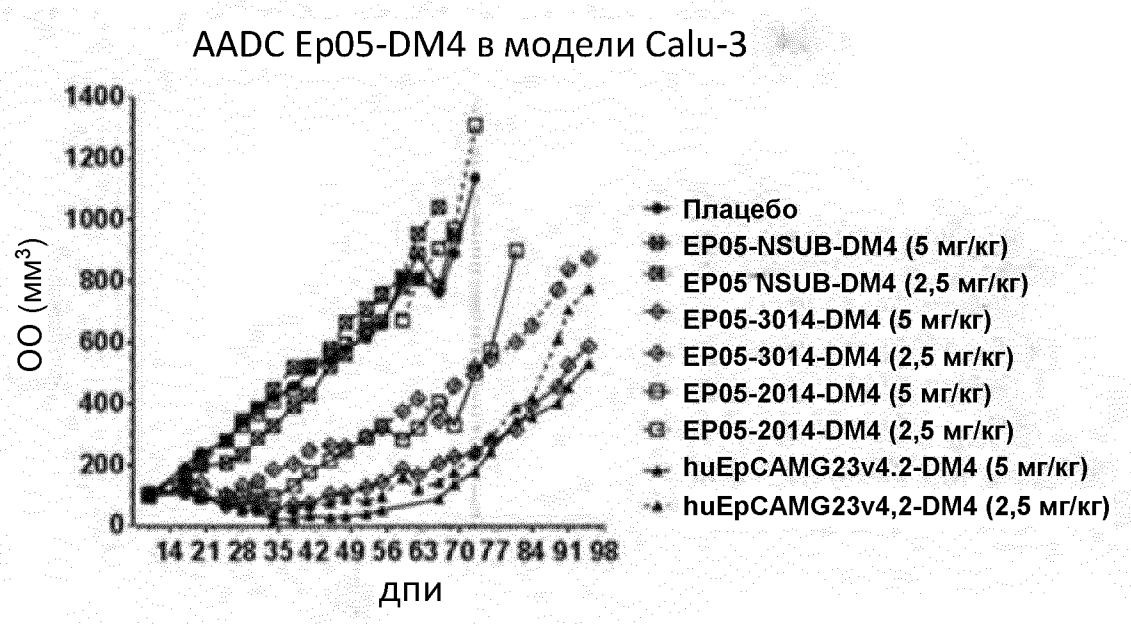
ФИГ. 17E



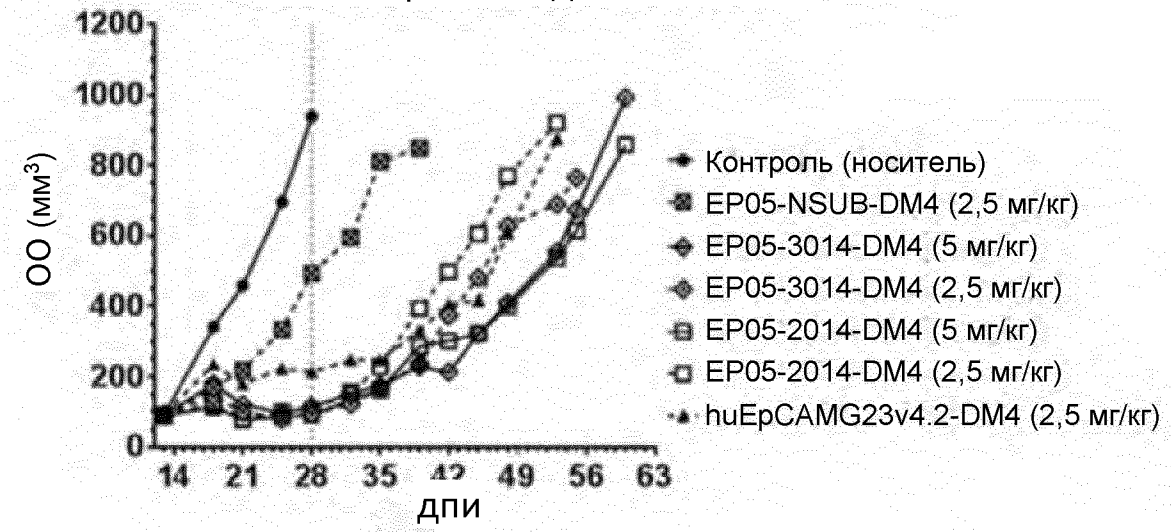
ФИГ. 17F



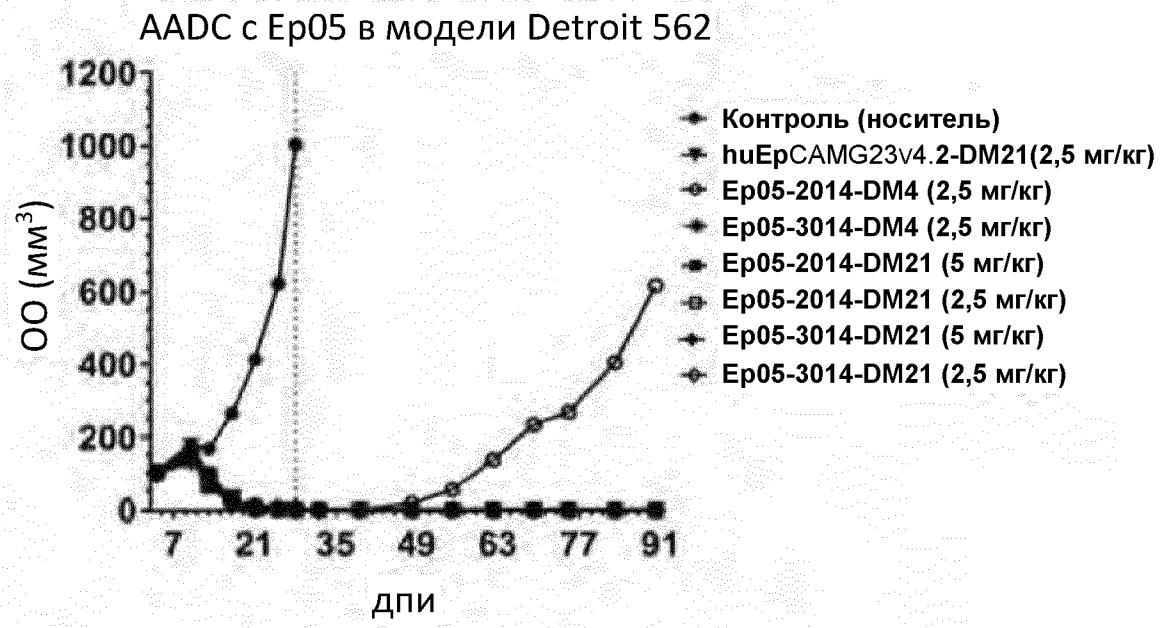
ФИГ. 18


AADC Ep05-DM4 в модели Calu-3
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
ОО (мм3)
14 21 28 35 42 49 56 63 70 77 84 91 98
дпи
Плацебо
EP05-NSUB-DM4 (5 мг/кг)
EP05 NSUB-DM4 (2,5 мг/кг)
EP05-3014-DM4 (5 мг/кг)
EP05-3014-DM4 (2,5 мг/кг)
EP05-2014-DM4 (5 мг/кг)
EP05-2014-DM4 (2,5 мг/кг)
huEpCAMG23v4.2-DM4 (5 мг/кг)
huEpCAMG23v4,2-DM4 (2,5 мг/кг)

ФИГ. 19

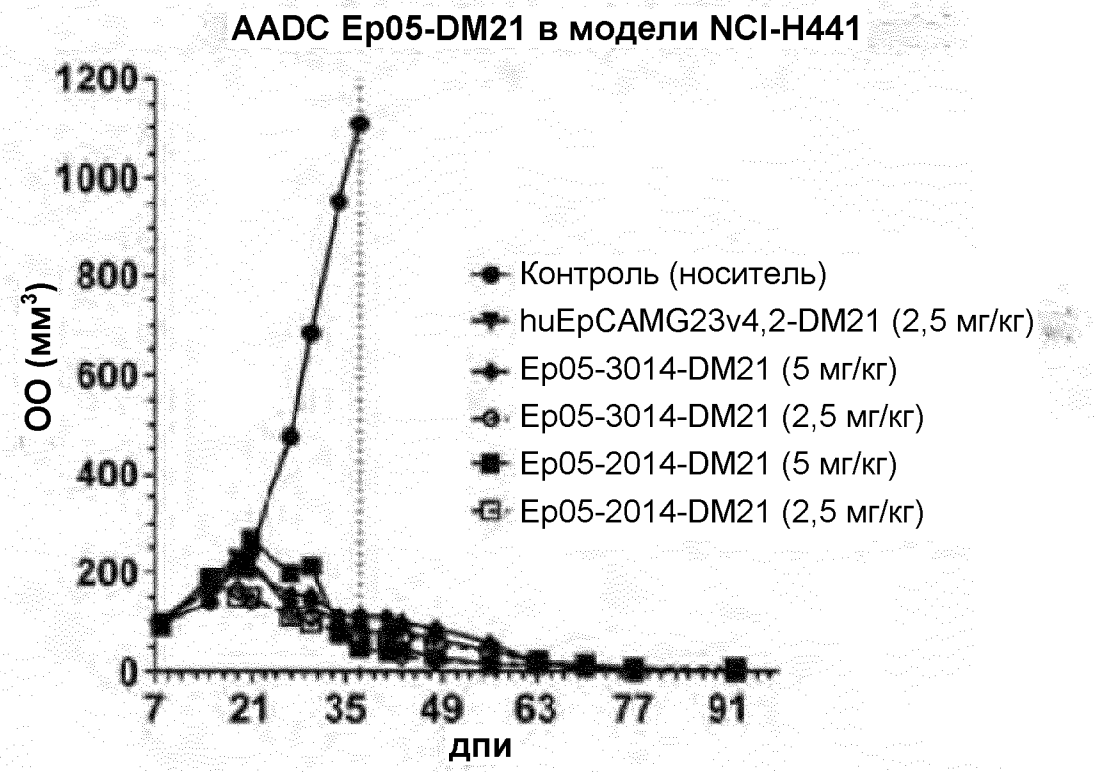

AADC с Ep05 в модели NCI-H292
1200
1000
800
600
400
200
0
ОО (мм3)
14 21 28 35 42 49 56 63
дпи
Контроль (носитель)
EP05-NSUB-DM4 (2,5 мг/кг)
EP05-3014-DM4 (5 мг/кг)
EP05-3014-DM4 (2,5 мг/кг)
EP05-2014-DM4 (5 мг/кг)
EP05-2014-DM4 (2,5 мг/кг)
huEpCAMG23v4.2-DM4 (2,5 мг/кг)

ФИГ. 20



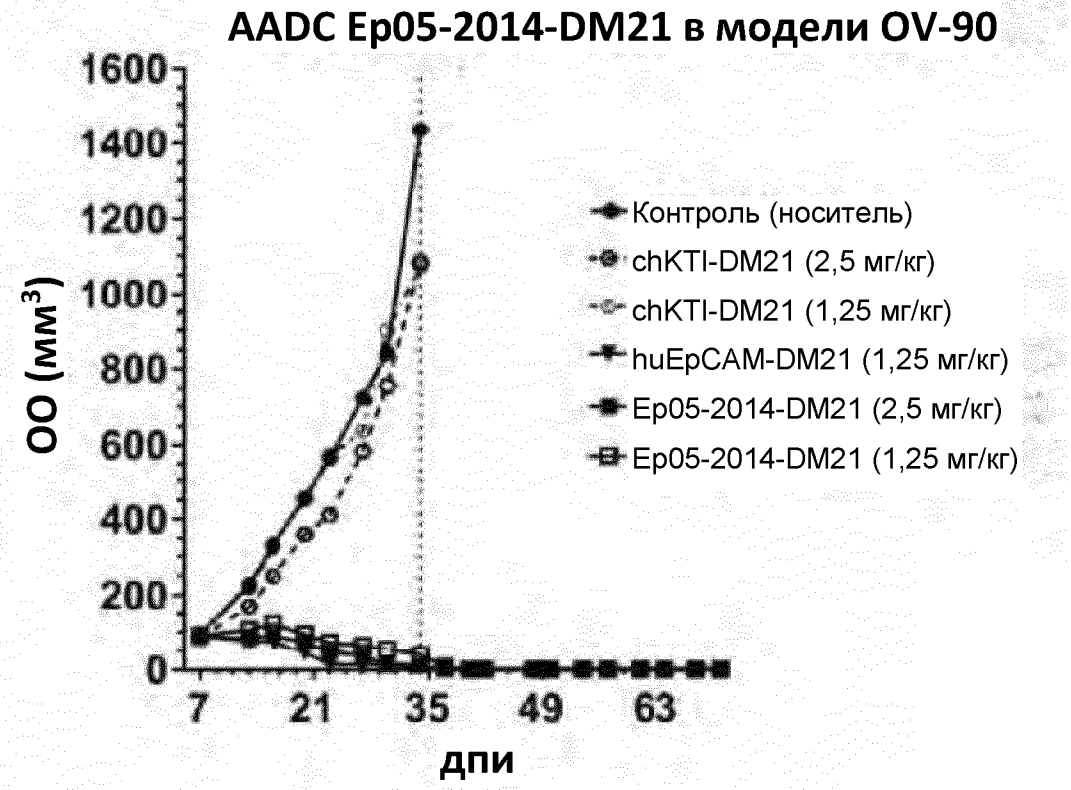
Группа (доза, мг/кг)	TGI (%T/C)	PR	CR	TFS
Контроль (носитель)	na	0/8	0/8	0/8
huEpCAM27Gv4.2-DM21 ADC (2.5)	0 %	8/8	8/8	8/8
Ep05-3014-DM4 (2.5)	0 %	8/8	8/8	7/8
Ep05-2014-DM4 (2.5)	0 %	8/8	6/8	0/8
Ep05-3014-DM21 (5)	0 %	8/8	7/8	7/8
Ep05-3014-DM21 (2.5)	0.7 %	8/8	7/8	6/8
Ep05-2014-DM21 (5)	0 %	8/8	8/8	8/8
Ep05-2014-DM21 (2.5)	0 %	7/8	7/8	6/8

ФИГ. 21 H441



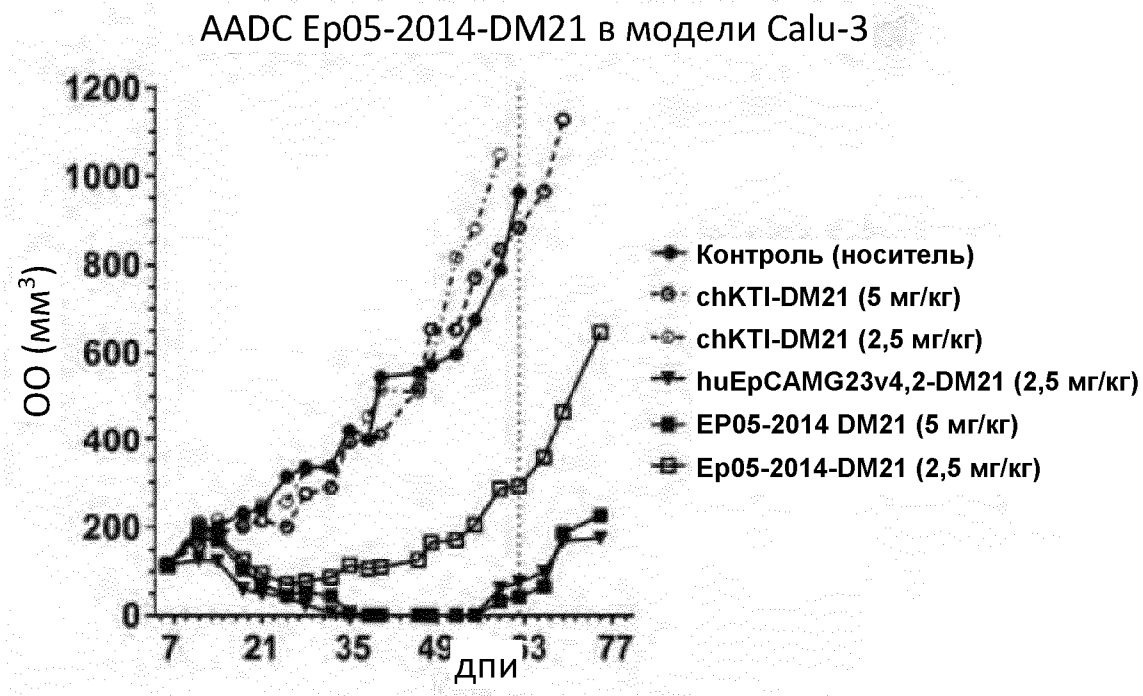
Группа (доза, мг/кг)	TGI (%T/C)	PR	CR	TFS
Контроль (носитель)	na	0/8	0/8	0/8
huEpCAM27Gv4.2-DM21 ADC (2.5)	7.7 %	8/8	7/8	7/8
Ep05-3014-DM21 (5)	10.1 %	8/8	5/8	5/8
Ep05-3014-DM21 (2.5)	6.3 %	8/8	6/8	6/8
Ep05-2014-DM21 (5)	4.2 %	8/8	7/8	7/8
Ep05-2014-DM21 (2.5)	6.2 %	8/8	4/8	4/8

ФИГ. 22 **OV-90**



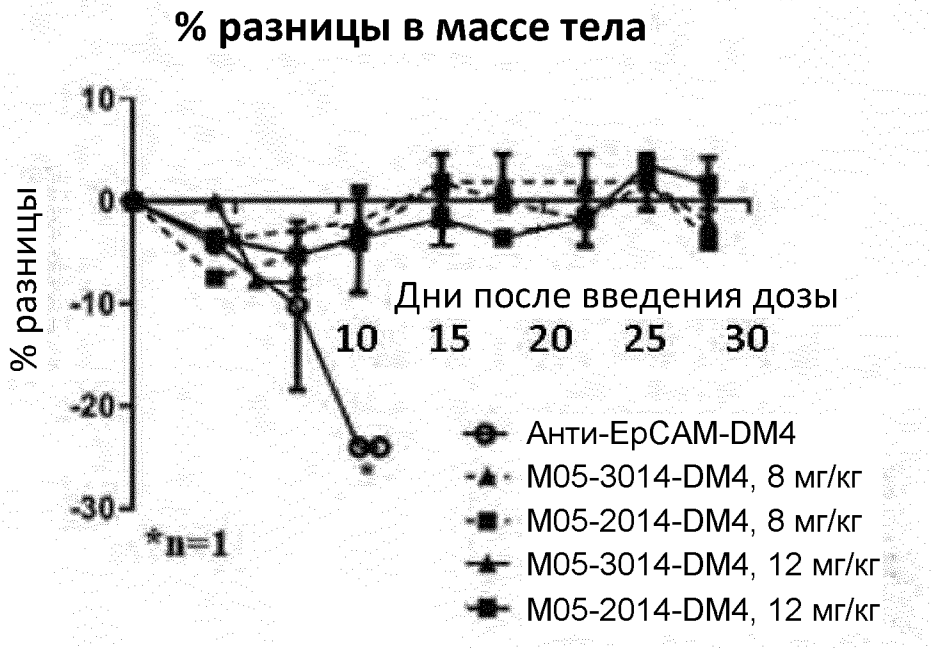
Группа (доза, мг/кг)	TGI (%T/C)	PR	CR	TFS
Контроль (носитель)	na	0/6	0/6	0/6
chKTI-DM21 (2.5)	75.5 %	0/6	0/6	0/6
chKTI-DM21 (1.25)	74.8 %	0/6	0/6	0/6
huEpCAM27Gv4.2-DM21 ADC (1.25)	0.5 %	6/6	6/6	6/6
Ep05-2014-DM21 (2.5)	0.8 %	6/6	6/6	6/6
Ep05-2014-DM21 (1.25)	2.9 %	6/6	6/6	6/6

ФИГ. 23 Calu-3

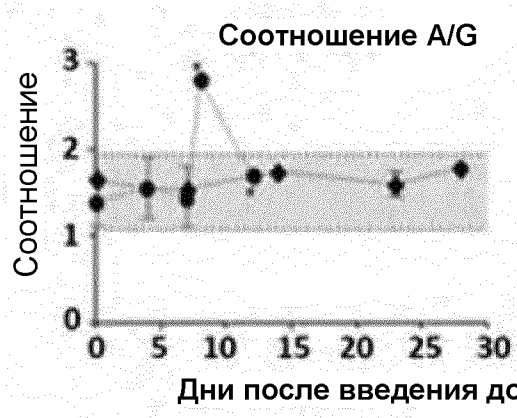


Группа (доза, мг/кг)	TGI (%T/C)	PR	CR	TF (75 dpi)
Контроль (носитель)	na	0/6	0/6	0/6
chKTI-DM21 (5)	91.7 %	0/6	0/6	0/6
chKTI-DM21 (2.5)	>110 %	0/6	0/6	0/6
huEpCAM27Gv4.2-DM21 ADC (2.5)	7.8 %	6/6	5/6	1/6
Ep05-2014-DM21 (5)	4.4 %	5/6	5/6	2/6
Ep05-2014-DM21 (2.5)	30.4 %	3/6	0/6	0/6

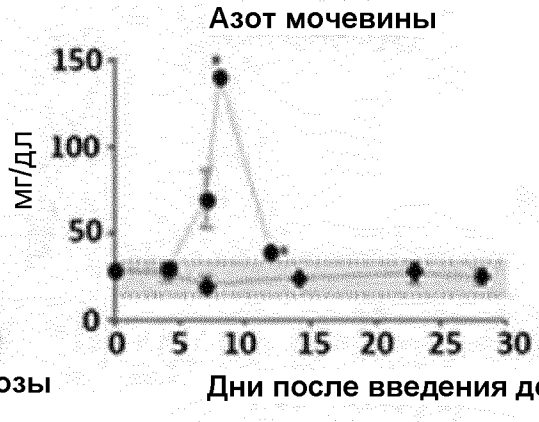
ФИГ. 24


% разницы в массе тела
10
0
-10
-20
-30
% разницы
Дни после введения дозы
10
15
20
25
30
*n=1
Анти-EpCAM-DM4
M05-3014-DM4, 8 мг/кг
M05-2014-DM4, 8 мг/кг
M05-3014-DM4, 12 мг/кг
M05-2014-DM4, 12 мг/кг

ФИГ. 25A

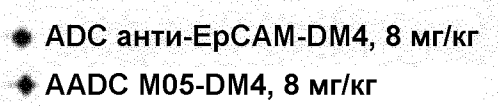


ФИГ. 25B

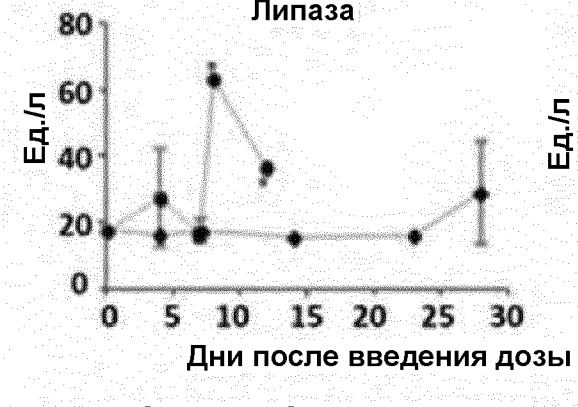


ФИГ. 25C

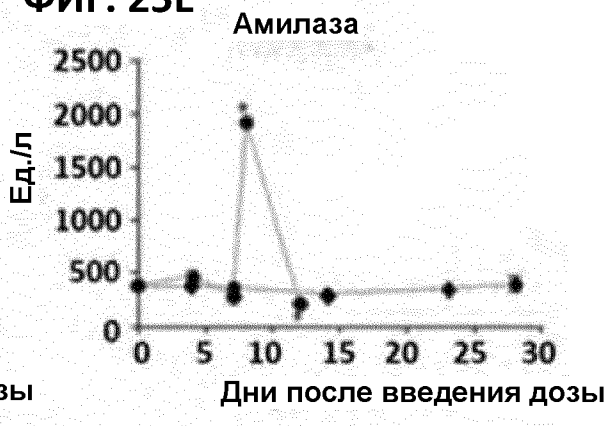




ФИГ. 25D

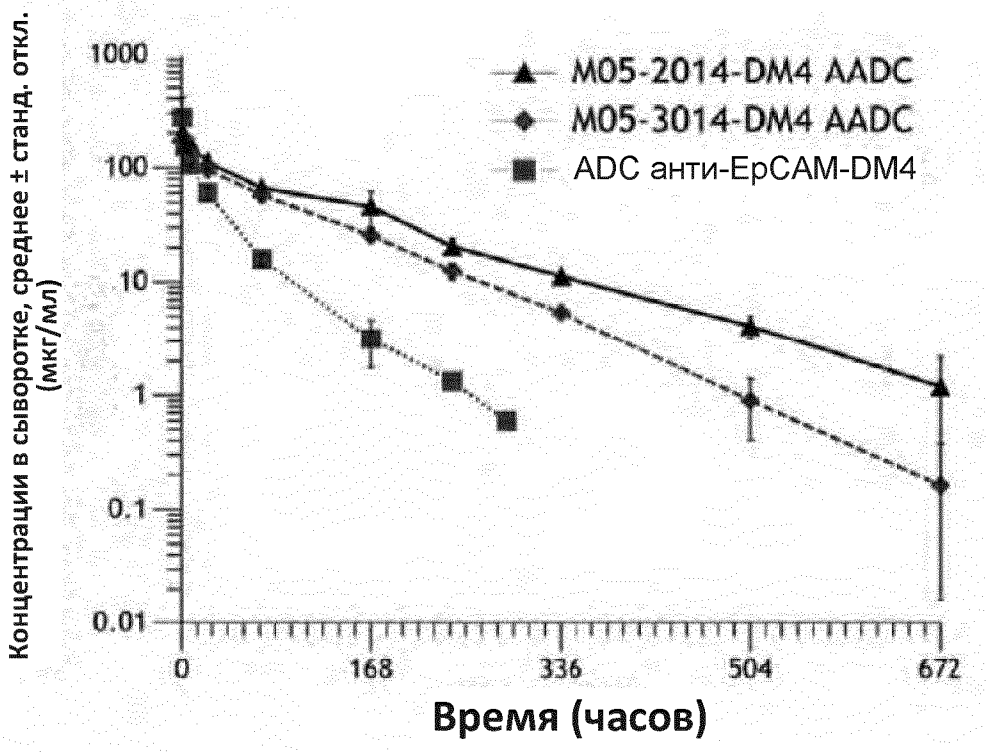


ФИГ. 25E

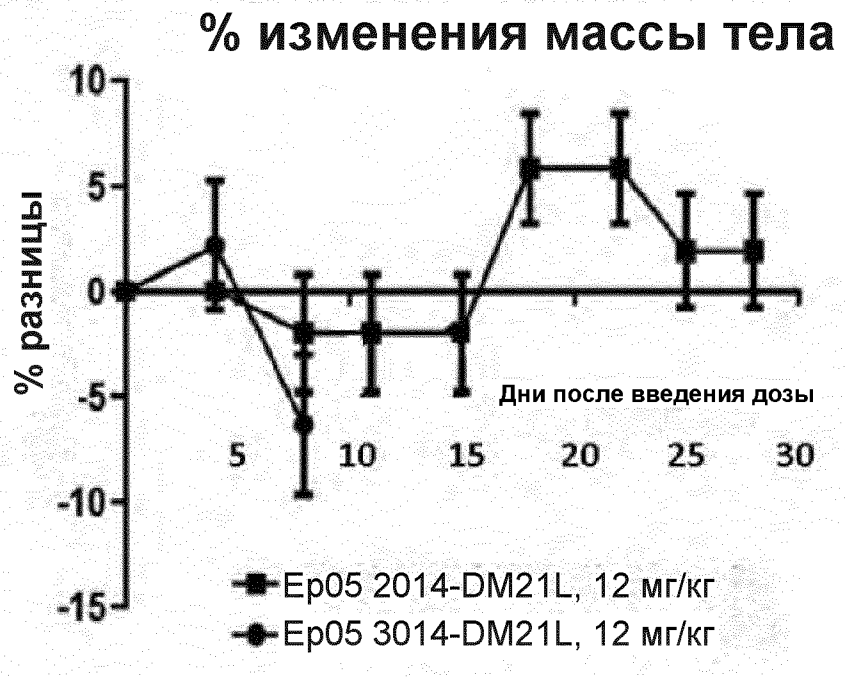




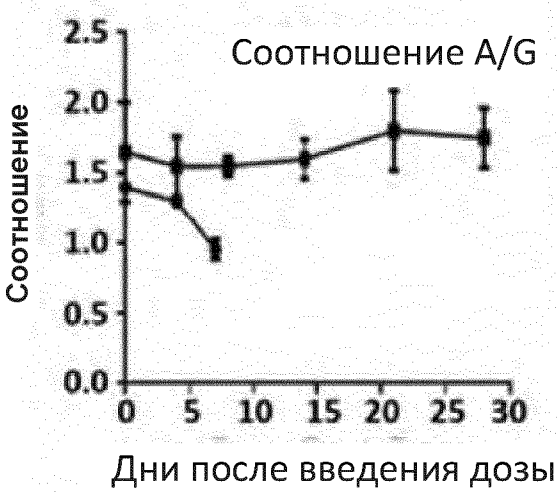
ФИГ. 26


Концентрации в сыворотке, среднее ± станд. откл. (мкг/мл)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0
168
336
504
672
Время (часов)
M05-2014-DM4 AADC
M05-3014-DM4 AADC
ADC анти-EpCAM-DM4

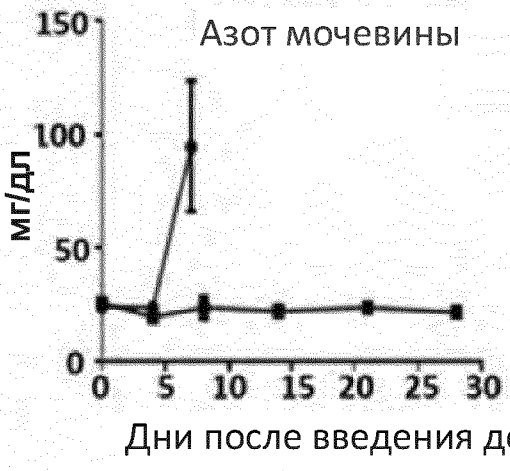
ФИГ. 27


% изменения массы тела
% разницы
10
5
0
-5
-10
-15
5
10
15
20
25
30
Дни после введения дозы
Ep05 2014-DM21L, 12 мг/кг
Ep05 3014-DM21L, 12 мг/кг

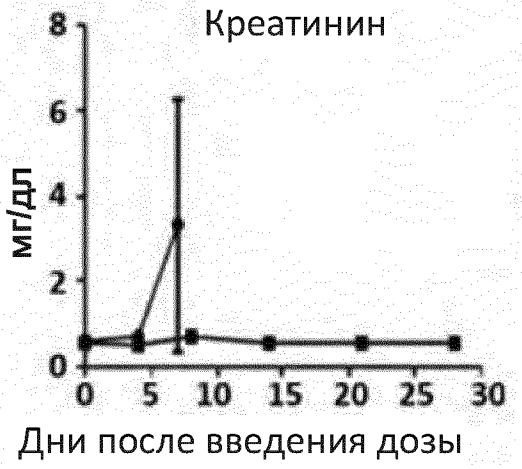
ФИГ. 28A



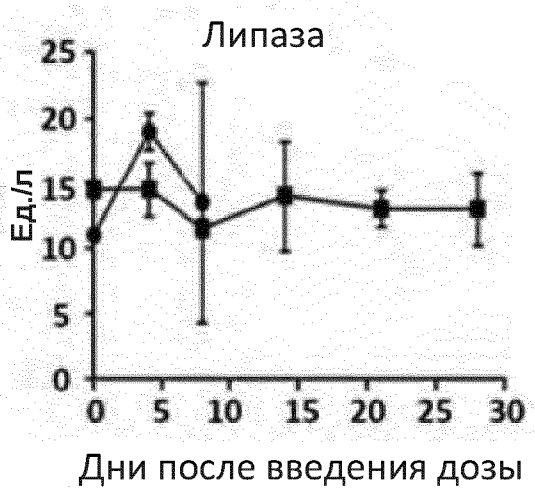
ФИГ. 28B



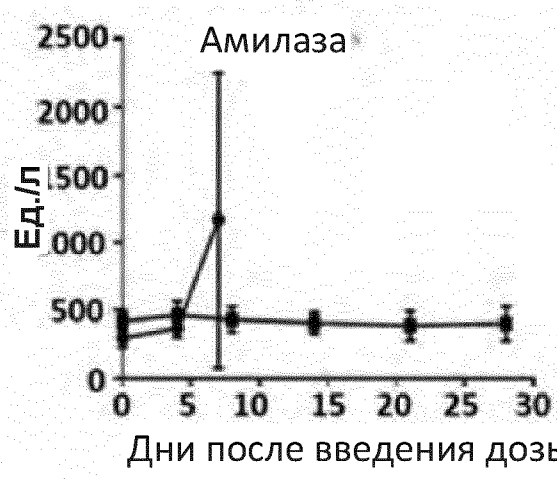
ФИГ. 28C

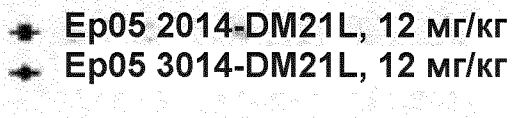


ФИГ. 28D

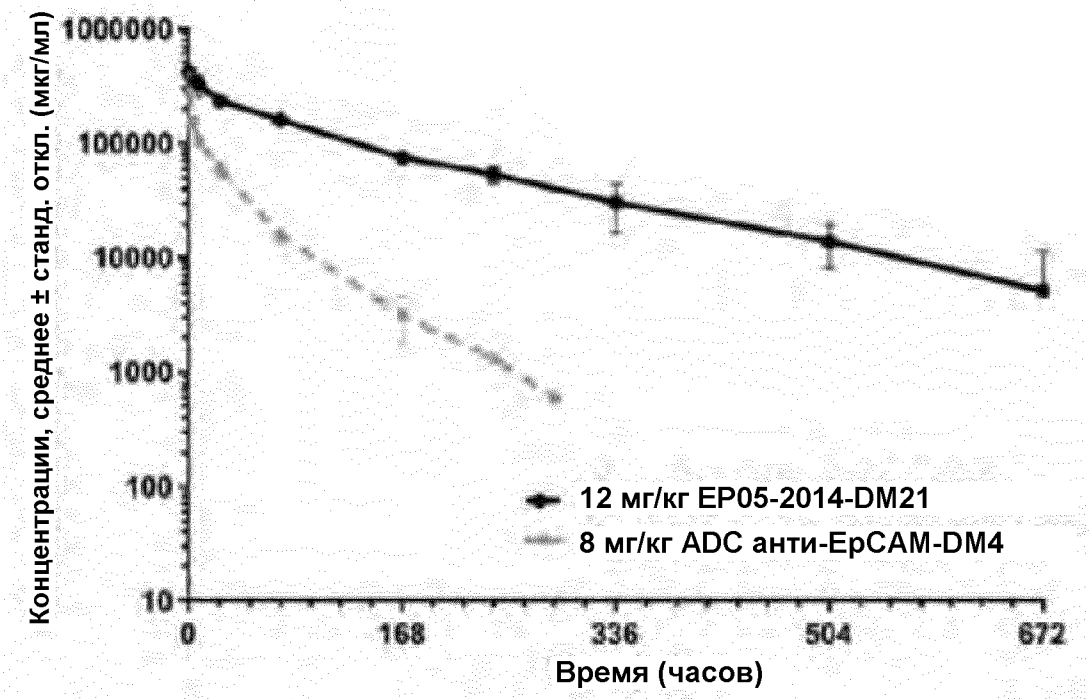


ФИГ. 28E

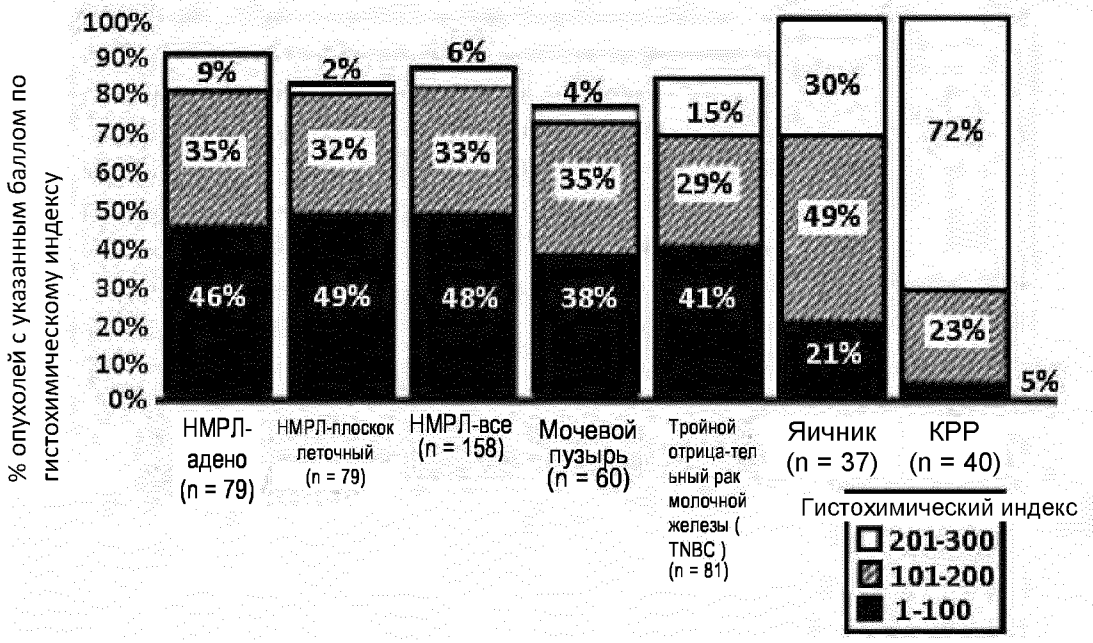




ФИГ. 29


Концентрации, среднее ± станд. откл. (мкг/мл)
1000000
100000
10000
1000
100
10
0
168
336
504
672
Время (часов)
12 мг/кг EP05-2014-DM21
8 мг/кг ADC анти-EpCAM-DM4

ФИГ. 30


% опухолей с указанным баллом по гистохимическому индексу
100%
90%
80%
70%
60%
50%
40%
30%
20%
10%
0%
9%
35%
46%
2%
32%
49%
6%
33%
48%
4%
35%
38%
15%
29%
41%
30%
49%
21%
72%
23%
5%
НМРЛ-адено (n = 79)
НМРЛ-плоскоклеточный (n = 79)
НМРЛ-все (n = 158)
Мочевой пузырь (n = 60)
Тройной отрица-тельный рак молочной железы (TNBC) (n = 81)
Яичник (n = 37)
КРР (n = 40)
Гистохимический индекс
201-300
101-200
1-100