



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

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.01.19**

**(21)** Номер заявки  
**201692560**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2015.06.18**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 39/395** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

**(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА ПРОТИВ ЭПИТОПА HER2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**(31)** 62/013,944; 62/034,489; 62/147,960;  
62/149,444

**(32)** 2014.06.18; 2014.08.07; 2015.04.15;  
2015.04.17

**(33)** US

**(43)** 2017.07.31

**(86)** PCT/US2015/036431

**(87)** WO 2015/195917 2015.12.23

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**МЕРСАНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.**  
(US)

**(72)** Изобретатель:  
**Бодяк Наталья Д., Деви́т Майкл  
Дж., Кроленд Эрик М., Ловингер  
Тимоти Б., Парк Питер Ю., Принц  
Бьянка, Юрковецкий Александр В.**  
(US)

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

**(56)** SPIRIDON C.I. ET AL.: "Targeting multiple Her-2 epitopes with monoclonal antibodies results in improved antigrowth activity of a human breast cancer cell line in vitro and in vivo", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 8, no. 6, 1 June 2002

(2002-06-01), pages 1720-1730, XP002393028, ISSN: 1078-0432, whole document, especially the Abstract; Figures 1-2; Tables 1-2

YIP YUM L. ET AL.: "Anti-ErbB-2 monoclonal antibodies and ErbB-2-directed vaccines", CANCER IMMUNOLOGY AND IMMUNOTHERAPY, SPRINGER-VERLAG, BERLIN, DE, vol. 50, no. 11, 1 January 2002 (2002-01-01), pages 569-587, XP002433669, ISSN: 0340-7004, DOI: 10.1007/S002620100226, whole document, especially Tables 1-2

KLAPPER L.N. ET AL.: "A SUBCLASS OF TUMOR-INHIBITORY MONOCLONAL ANTIBODIES TO ERB-2/HER2 BLOCKS CROSSTALK WITH GROWTH FACTOR RECEPTORS" ONCOGENE, NATURE PUBLISHING GROUP, GB, vol. 14, no. 17, 1 May 1997 (1997-05-01), pages 2009-2019, XP001068241, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/SJ.ONC.1201029, whole document, especially Table 1  
US-A1-2012321583

CHRISTIAN JOST ET AL.: "Structural Basis for Eliciting a Cytotoxic Effect in HER2-Overexpressing Cancer Cells via Binding to the Extracellular Domain of HER2", STRUCTURE, vol. 21, no. 11, 1 November 2013 (2013-11-01), pages 1979-1991, XP055108011, ISSN: 0969-2126, DOI: 10.1016/j.str.2013.08.020, whole document, especially page 1984, first paragraph

KO BONG-KOOK ET AL.: "Combination of novel HER2-targeting antibody 1E11 with trastuzumab shows synergistic antitumor activity in HER2-positive gastric cancer", MOLECULAR ONCOLOGY, vol. 9, no. 2, 28 September 2014 (2014-09-28), pages 398-408, XP029190459, ISSN: 1574-7891, DOI: 10.1016/J.MOLONC.2014.09.007, whole document, especially the Abstract

**(57)** Изобретение относится к выделенному полностью человеческому моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, способу получения такого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, кодирующей их выделенной молекуле нуклеиновой кислоты и вектору для экспрессии антитела, содержащего такую нуклеиновую кислоту, конъюгату для лечения, предотвращения или замедления прогрессирования рака, содержащему выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способу получения такого конъюгата, способу лечения с его помощью ракового заболевания, а также к применению такого конъюгата для производства лекарственного средства для лечения ракового заболевания. В отличие от других антител, известных из уровня техники, антитела по изобретению связываются с разными эпитопами HER2, причем они перекрестно блокируются относительно связывания с HER2 друг другом, но не трастузумабом, пертузумабом, Fab37 или chA21. Кроме того, в противоположность известным

антителам антитела по изобретению могут эффективно интернализироваться в экспрессирующие HER2 клетки без стимулирования пролиферации клеток.

039374 B1

039374 B1

---

### Родственные заявки

Данная заявка заявляет приоритет и преимущество по предварительным заявкам на патенты США № 62/013944, поданной 18 июня 2014 г.; 62/034489, поданной 7 августа 2014 г.; 62/147960, поданной 15 апреля 2015 г., и 62/149444, поданной 17 апреля 2015 г. Содержание каждой из этих заявок тем самым включено в данный документ в полном объеме путем ссылки.

### Область изобретения

Изобретение, в целом, относится к получению моноклональных антител, которые распознают рецептор HER2 человека, к моноклональным антителам, которые распознают специфические эпитопы HER2 в пределах внеклеточного домена рецептора HER2 человека, и к способам применения этих моноклональных антител в виде терапевтических и/или диагностических средств.

### Уровень техники изобретения

Представители семейства ErbB, рецепторных тирозинкиназ, являются важными медиаторами роста, дифференцировки и выживания клеток. Данное семейство рецепторов включает четыре различных представителя, включающих рецептор эпидермального фактора роста (EGFR или ErbB1), HER2 (ErbB2 или p185<sup>neu</sup>), HER3 (ErbB3) и HER4 (ErbB4 или tyro2). Эти четыре представителя семейства EGFR формируют как гомо-, так и гетеродимеры, причем HER2 является предпочтительным и наиболее сильным партнером димеризации с другими рецепторами ErbB (Graus-Porta et al., *Embo* 3 1997; 16:1647-1655; Tao et al., *J. Cell Sci.* 2008; 121:3207-3217). Для HER2 не известен лиганд, но он может активироваться посредством гомодимеризации, в случае его сверхэкспрессии, или путем гетеродимеризации с другими захваченными лигандами рецепторами ErbB.

Ген HER2 (также известный как ген HER2/neu и ErbB2) амплифицируется в 20-30% случаев ранних стадий раковых заболеваний молочной железы, что относит его к сверхэкспрессируемым рецепторам эпидермального фактора роста (EGF) на клеточной мембране (Bange et al., *Nature Medicine* 7 (5): 548-552). Кроме рака молочной железы, экспрессию HER2 также связали с другими типами карцином человека, включая немелкоклеточный рак легкого, рак яичника, рак желудочно-кишечного тракта, рак простаты, рак мочевого пузыря, рак толстого кишечника, рак пищевода и плоскоклеточную карциному головы и шеи (Garcia de Palazzo et al., *Int. J. Biol. Markers* 1993; 8:233-239; Ross et al., *Oncologist* 2003; 8:307-325; Osman et al., *J. Urol.* 2005; 174:2174-2177; Kapitanovic et al., *Gastroenterology* 1997; 112:1103-1113; Turken et al., *Neoplasma* 2003; 50:257-261 и Oshima et al., *Int. J. Biol. Markers* 2001; 16:250-254).

Трастузумаб (Herceptin®) представляет собой рекомбинантное гуманизованное моноклональное антитело, направленное против домена IV белка HER2, тем самым блокируя лиганд-независимую гомодимеризацию и, в меньшей степени, гетеродимеризацию HER2 с другими представителями семейства в клетках с высокой сверхэкспрессией HER2 (Cho et al., *Nature* 2003; 421:756-760 and Wehrman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103:19063-19068). Herceptin® утвержден как препарат адьювантного лечения первой линии для метастатического рака молочной железы со сверхэкспрессией HER2, либо в комбинации с химиотерапией, либо как единственное средство с последующим применением одного или более режимов химиотерапии. Было установлено, что трастузумаб был эффективным только у 20-50% пациентов с опухолями молочной железы со сверхэкспрессией HER2 и у многих из первоначально отвечавших на лечение проявился рецидив через несколько месяцев (Dinh et al., *Clin. Adv. Hematol. Oncol.* 2007; 5:707-717).

Пертузумаб (Omnitarg/Perjeta®, также называемый 2C4) представляет собой другое гуманизованное моноклональное антитело, направленное против домена II белка HER2, приводящее к ингибированию лиганд-индуцированной гетеродимеризации (т.е. димеризации HER2 с другим представителем семейства ErbB, с которым связан лиганд); сообщалось, что механизм не требует обязательно высоких уровней экспрессии HER2 (Franklin et al., *Cancer Cell* 2004; 5:317-328). Пертузумаб в комбинации с трастузумабом и доцетакселом утвержден в качестве лечебного средства для HER2-положительного метастатического рака молочной железы.

Конъюгат лекарственное вещество-антитело против HER2 (ADC), трастузумаб эмтанзин (адо-трастузумаб эмтанзин, Kadcyla®) представляет собой конъюгат антитело-лекарственное вещество, состоящий из моноклонального антитела трастузумаб (герцептин), связанного с цитотоксическим средством мертанзином (DM1). Препарат Кадсила в виде единственного средства был утвержден для лечения пациентов с HER2-положительным (HER2+) метастатическим раком молочной железы (МВС), которым раньше давали трастузумаб и таксан, по отдельности или в комбинации.

Поскольку при выборе подходящего антитела для HER2-таргетной терапии задействовано много факторов, то, как правило, преимущество отдается подходу с использованием ADC, если комплекс HER2-антитело при связывании антитела эффективно интернализуется. Однако, по сравнению с EGFR интернализация HER2 ограничена.

Сложные механизмы регулирования функционирования HER2 определяют необходимость дополнительного исследования новых и оптимизированных терапевтических стратегий против данного протоногена.

Соответственно, существует потребность в видах терапии, которые таргетируют биологические активности HER2.

### Сущность изобретения

В изобретении предложены моноклональные антитела, которые специфически распознают HER2, также известный как (ErbB2, p185<sup>neu</sup> и/или HER2/neu). Описанные в данном документе антитела способны и пригодны для модуляции, например, блокирования, ингибирования, снижения, обеспечения антагонизма, нейтрализации или иного нарушения механизма PI3K-Akt, который способствует выживанию клеток путем снижения уровней фосфорилированной АКТ. Описанные в данном документе антитела также способны и пригодны для модуляции, например, блокирования, ингибирования, снижения, обеспечения антагонизма, нейтрализации или иного нарушения лиганд-независимой гомодимеризации и/или гетеродимеризации HER2. Описанные в данном документе антитела также включают антитела, которые связывают растворимый HER2.

Антитела по изобретению проявляют характеристики связывания HER2, которые отличаются от антител, описанных в данной области техники. В частности, описанные в данном документе антитела связываются с разными эпитопами HER2, причем они перекрестно блокируются относительно связывания с HER2 друг другом, но не трастузумабом, пертузумабом, Fab37 или chA21. Дополнительно, в противоположность к известным антителам, данные антитела, описанные в данном документе, могут эффективно интернализироваться в экспрессирующие HER2 клетки без стимулирования пролиферации клеток.

Описанные в данном документе антитела являются полностью человеческими моноклональными антителами, которые связываются с новыми эпитопами и/или имеют другие благоприятные для терапевтического применения свойства. Типовые свойства включают, но не ограничиваются ими, благоприятные характеристики связывания с раковыми клетками, экспрессирующими HER2 человека на высоких или низких уровнях, специфически связываются с рекомбинантным HER2 человека и яванского макака, обеспечивают эффективную интернализацию при связывании с HER2, обладают высокой способностью к обеспечению гибели раковых клеток, экспрессирующих высокие или низкие уровни HER2, при введении в виде конъюгата антитело-лекарственное вещество (ADC), не оказывают значительного агонистического воздействия на пролиферацию экспрессирующих HER2 раковых клеток и обеспечивают эффективную антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), опосредующую гибель экспрессирующих HER2 клеток, а также любую комбинацию изложенных выше свойств.

Описанные в данном документе антитела также включают выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки от 452 до 531 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например остатки от 474 до 553 SEQ ID NO: 38 или остатки от 452 до 531 SEQ ID NO: 39.

Описанные в данном документе антитела включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывает по меньшей мере часть N-конца домена IV рецептора HER2 человека, но перекрестно не конкурирует с антителом, которое связывается с эпитопом 4D5 рецептора HER2 человека. Например, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, перекрестно не конкурируют с трастузумабом за связывание с рецептором HER2 человека, так как известно, что трастузумаб связывает эпитоп 4D5 рецептора HER2 человека. Как используется в данном документе, термин эпитоп 4D5 рецептора HER2 человека относится к аминокислотным остаткам от 529 до 627 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например остаткам от 551 до 649 SEQ ID NO: 38 или остаткам от 529 до 627 SEQ ID NO: 39. В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, также связывает по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

Описанные в данном документе антитела также включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который включает остатки от 452 до 500 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например остатки от 474 до 522 SEQ ID NO: 38 или остатки от 452 до 500 SEQ ID NO: 39.

Описанные в данном документе антитела также включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, выбранный из группы, состоящей из аминокислотных остатков E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека, например остатков 543, 547 и 522 SEQ ID NO: 38, и остатков 521, 525 и 530 SEQ ID NO: 39. Например, описанные в документе антитела включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который содержит по меньшей мере два аминокислотных остатка, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. Описанные в данном документе антитела включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, который содержит, по меньшей мере, аминокислотные остатки E521, L525 и R530 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения любое или все выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

Описанные в данном документе антитела также включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается с по меньшей мере частью домена III и по меньшей мере



остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. Например, описанные в данном документе антитела включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который содержит по меньшей мере пять аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. Например, описанные в данном документе антитела включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который содержит по меньшей мере шесть аминокислотных остатков, выбранных из группы, состоящей из аминокислотных остатков C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. Например, описанные в данном документе антитела включают выделенное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом внеклеточного домена рецептора HER2 человека, который содержит, по меньшей мере, аминокислотные остатки C453, H473, N476, R495, H497 и W499 внеклеточного домена рецептора HER2 человека. В некоторых вариантах реализации изобретения любое или все выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты также связывают по меньшей мере один эпитоп на рецепторе HER2 яванского макака.

Эти и другие аспекты изобретения описаны более подробно ниже.

Типовые моноклональные антитела, описанные в данном документе, включают, например, антитело XMT 1517, антитело XMT 1518, антитело XMT 1519 и антитело XMT 1520, описанные в данном документе. В альтернативном варианте, моноклональное антитело представляет собой антитело, которое перекрестно блокируется друг другом, но не связывается с таким же эпитопом, как трастузумаб, пертузумаб, Fab37 или chA21 (которые связываются со специфическими эпитопами на домене IV, домене II, домене III и домене I HER2 соответственно) или их биосимиляры. Эти антитела в данном документе называются, соответственно, как антитела против "HER2". Антитела против HER2 включают полностью человеческие моноклональные антитела, а также гуманизированные моноклональные антитела и химерные антитела. Эти антитела демонстрируют специфичность к HER2 человека, и было показано, что они модулируют, например, блокирование, ингибирование, снижение, обеспечение антагонизма, нейтрализацию или иное нарушение механизма PI3K-Akt, который способствует выживанию клеток путем снижения уровней фосфорилированной АКТ. Эти антитела интернализируются с клеточной поверхности экспрессирующих HER2 клеток со скоростью, которая является такой же или практически такой же, как скорость, с которой интернализируется трастузумаб или его биосимиляр. Например, эти антитела и антигенсвязывающие фрагменты имеют скорость интернализации, которая составляет около 50% общего связывания с поверхностью в момент времени 0, интернализуясь за 4 ч.

Описанные в данном документе антитела содержат тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичную последовательности, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8.

Описанные в данном документе антитела содержат комбинацию аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, выбранных из группы, состоящей из: (i) аминокислотной последовательности тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и аминокислотной последовательности легкой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2; (ii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и аминокислотной последовательности легкой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; (iii) аминокислотной последовательности тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 и аминокислотной последовательности легкой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 и (iv) аминокислотной последовательности тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7 и аминокислотной последовательности легкой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичной аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 и аминокислотную последовательность легкой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 98, 99% или более идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3 и аминокислотную









24 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 22.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 25, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 26, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 28, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 21 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 29.

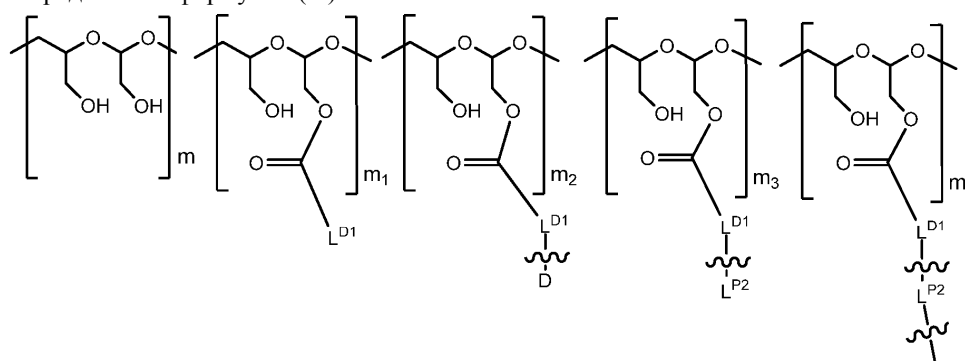
В некоторых вариантах реализации изобретения антитела, описанные в данном документе, содержат аминокислотную последовательность CDRH1 SEQ ID NO: 30, аминокислотную последовательность CDRH2 SEQ ID NO: 31, аминокислотную последовательность CDRH3 SEQ ID NO: 27, аминокислотную последовательность CDRL1 SEQ ID NO: 28, аминокислотную последовательность CDRL2 SEQ ID NO: 21 и аминокислотную последовательность CDRL3 SEQ ID NO: 29.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела против HER2, описанное в данном документе, включает конъюгированное с данным антителом средство. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой противоопухолевое средство. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой токсин или его фрагмент. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой: (a) соединение ауристатина; (b) соединение калихеамицина; (c) соединение дуокармицина; (d) SN38; (e) пирролобензодиазепин; (f) соединение барвинка; (g) соединение тубулизина; (h) соединение не встречающегося в природе каптотецина; (i) соединение майтанзиноида; (j) связывающее ДНК лекарственное вещество; (k) ингибитор киназы; (l) ингибитор MEK; (m) ингибитор KSP; (n) ингибитор топоизомеразы и их аналоги или аналогичные средства. В некоторых вариантах реализации изобретения средство конъюгировано с антителом против HER2 посредством линкера. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой любой из токсинов, описанных в данном документе.

В одном аспекте изобретения конъюгат антитела против HER2, описанный в данном документе, включает выделенное антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент, непосредственно или опосредованно соединенное с одним или более терапевтических или диагностических средств (D). В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгат антитела против HER2 также содержит один или более полимерных каркасов, соединенных с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причем каждое из одного или более D независимо соединены с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством одного или более полимерных каркасов.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждый из одного или более полимерных каркасов, которые соединены с выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом, независимо содержат поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформаль) (PHF), имеющий молекулярную массу в диапазоне от около 2 до около 40 кДа.

В некоторых вариантах реализации изобретения каждый из одного или более полимерных каркасов независимо представлен формулой (Ic)



где  $L^{D1}$  представляет собой карбонилсодержащий фрагмент;

каждое присутствие  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---}$  в  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$  независимо представляет собой первый линкер, который содержит такую биоразрушаемую связь, что когда связь разрушается, то D высвобождается в активной форме для проявления своего терапевтического действия; а присутствие  $\text{---}\xi\text{---}$  в  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$  между  $L^{D1}$  и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к

$L^{D1}$ ,

каждое присутствие  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}$  независимо представляет собой второй линкер, еще не соединенный с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в котором  $L^{P2}$  представляет собой фрагмент, содержащий функциональную группу, которая еще будет образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, а  $\xi$  между  $L^{D1}$  и  $L^{P2}$  обозначает непосредственное или опосредованное присоединение  $L^{P2}$  к  $L^{D1}$ , и каждое присутствие второго линкера отличается от каждого присутствия первого линкера;

каждое присутствие  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}\text{---}\xi\text{---}$  независимо представляет собой третий линкер, который соединяет каждый D-несущий полимерный каркас с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в котором концевой  $\xi$ , присоединенный к  $L^{P2}$ , обозначает непосредственное или опосредованное присоединение  $L$  к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту при образовании ковалентной связи между функциональной группой  $L^{P2}$  и функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; а каждое присутствие третьего линкера отличается от каждого присутствия первого линкера;

$m$  представляет собой целое число от 1 до около 300,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 18,  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 10, сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  находится в диапазоне от около 15 до около 300; а общее количество  $L^{P2}$ , соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, составляет 10 или меньше.

Конъюгат, описанный в документе, может включать один или более из следующих признаков:

Например, в формуле (Ic), выделенное антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент имеет молекулярную массу 40 кДа или больше (например, 60 кДа или больше, 80 кДа или больше, 100 кДа или больше, 120 кДа или больше, 140 кДа или больше, 160 кДа или больше, 180 кДа или больше, или 200 кДа или больше, или около 40-200, 40-180, 40-140, 60-200, 60-180, 60-140, 80-200, 80-180, 80-140, 100-200, 100-180, 100-140 или 140-150 кДа). В некоторых вариантах реализации изобретения выделенное антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент, если подразумевается любое антитело или антигенсвязывающий фрагмент по данному описанию, включают в качестве неограничивающего примера, например, антитело ХМТ 1517, антитело ХМТ 1518, антитело ХМТ 1519 и антитело ХМТ 1520, описанные в данном документе.

Например, в формуле (Ic),  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 120 (например, около 1-90) и/или  $m_3$  представляет собой целое число от 1 до около 10 (например, около 1-8).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 6 кДа до около 20 кДа (т.е. сумму  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  в диапазоне от около 45 до около 150),  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 20,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 9,  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 10 и/или  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 75 (например,  $m_1$  составляет около 4-45).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 8 кДа до около 15 кДа (т.е. сумму  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  в диапазоне от около 60 до около 110),  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 20,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 7,  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 10 и/или  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 55 (например,  $m_1$  составляет около 4-45).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа (т.е. сумму  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  в диапазоне от около 15 до около 150),  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 20,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 10 (например,  $m_3$  в диапазоне от 0 до около 9),  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 8 и/или  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 70, и общее количество  $L^{P2}$ , соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом находится в диапазоне от около 2 до около 8 (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

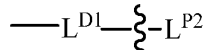
Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа (т.е. сумму  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  в диапазоне от около 20 до около 110),  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 15,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 8 (например,  $m_3$  в диапазоне от 0 до около 7),  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 8 и/или  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 50, и общее количество  $L^{P2}$ , соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом находится в диапазоне от около 2 до около 8 (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа (т.е. сумму  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  в диапазоне от около 40 до около 75),  $m_2$  пред-

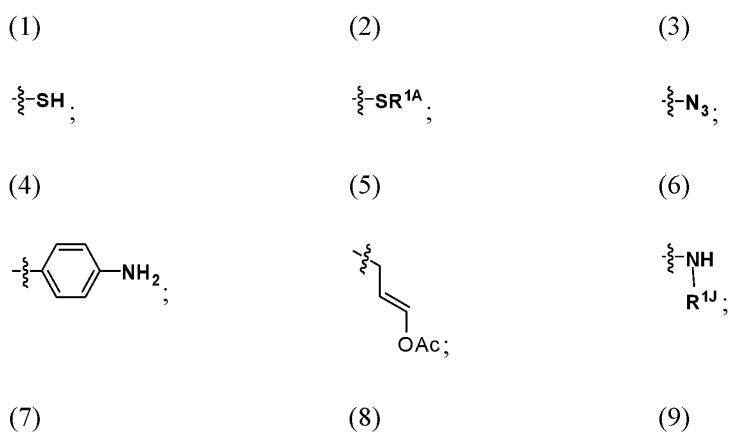
ставляет собой целое число от 2 до около 10 (например,  $m_2$  составляет около 3-10),  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 5 (например,  $m_3$  в диапазоне от 0 до около 4),  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 8 (например,  $m_4$  в диапазоне от 1 до около 5) и/или  $m_1$  представляет собой целое число от около 2 до около 35 (например,  $m_1$  составляет около 5-35), и общее количество  $L^{P2}$ , соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом находится в диапазоне от около 2 до около 8 (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

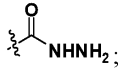
Например, каждое присутствие D независимо представляет собой терапевтическое средство, имеющее молекулярную массу  $\leq 5$  кДа.

Например, каждое присутствие D независимо представляет собой противораковое лекарственное вещество, например, выбранное из алкалоидов барвинка, ауристатинов, тубулизинов, дуокармицинов, не встречающихся в природе соединений камптотецинов, майтанзиноидов, соединений калихеамицинов, ингибиторов топоизомераз, связывающих ДНК лекарственных веществ, ингибиторов киназ, ингибиторов МЕК, ингибиторов KSP и их аналогов.



Например, каждый  $\xi$ , когда он не соединен с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, независимо содержит концевую группу  $W^P$ , в которой каждый  $W^P$  независимо представляет собой

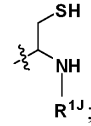




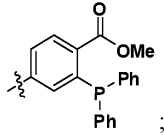
(10)



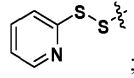
(11)



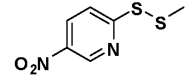
(12)



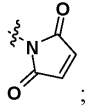
(13)



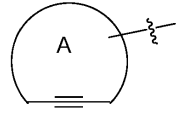
(14)



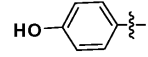
(15)



(16)



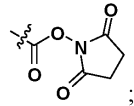
(17)



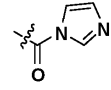
(18)



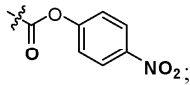
(19)



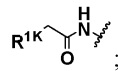
(20)



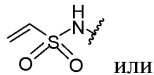
(21)



(22)

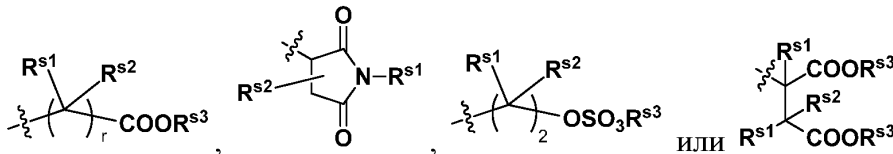


(23)



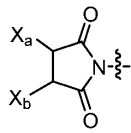
в которых  $R^{1K}$  представляет собой замещаемую группу (например, галогенида или  $RC(O)O-$ , в которой  $R$  представляет собой атом водорода, алифатический, гетероалифатический, карбоциклический или гетероциклоалкильный фрагмент),  $R^{1A}$  представляет собой серосодержащую защитную группу и кольцо  $A$  представляет собой циклоалкил или гетероциклоалкил, а  $R^{1J}$  представляет собой атом водорода, алифатический, гетероалифатический, карбоциклический или гетероциклоалкильный фрагмент.

Например, каждый  $R^{1A}$  независимо представляет собой



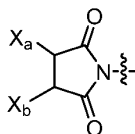
в котором  $r$  представляет собой 1 или 2, а каждый из  $R^{s1}$ ,  $R^{s2}$  и  $R^{s3}$  представляет собой атом водорода, алифатический, гетероалифатический, карбоциклический или гетероциклоалкильный фрагмент.

Например, функциональная группа  $L^{P2}$ , которая еще будет образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, выбирается из  $-SR^P$ ,  $-S-S-LG$ ,



и галоген, в котором  $LG$  представляет собой замещаемую группу,  $R^P$  представляет собой  $H$  или серо-

содержащую защитную группу, один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидоблокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$ , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную углерод-углеродную связь. Например, функциональная группа  $L^{P2}$ , которая еще будет образовывать ковалентную связь, представляет собой функциональную группу, которая не реагирует с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, например

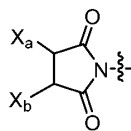


в виде функциональной группы  $L^{P2}$ , в которой один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидоблокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$ .

Например,  $L^{D1}$  содержит  $-X-(CH_2)_v-C(=O)-$  с X непосредственно соединенный с карбонильной группой

$—C(=O)-L^{D1}-\xi—$ , в которой X представляет собой  $CH_2$ , O или NH, а v представляет собой целое число от 1 до 6.

Например, каждое присутствие  $—C(=O)-L^{D1}-\xi-L^{P2}$  независимо представляет собой  $-C(=O)-X-(CH_2)_v-C(=O)-NH-(CH_2)_u-NH-C(=O)-(CH_2)_w-(OCH_2)_x-NHC(=O)-(CH_2)_y-M$ , в котором X представляет собой  $CH_2$ , O или NH, каждый из v, u, w, x и y независимо представляет собой целое число от 1 до 6, а M представляет собой



где один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидоблокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$ , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную углерод-углеродную связь.

Например, каждый из v, u, w, x и y представляет собой 2.

Например, соотношение между D и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет около 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

Например, соотношение между D и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет около 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 2:1 или 1:1.

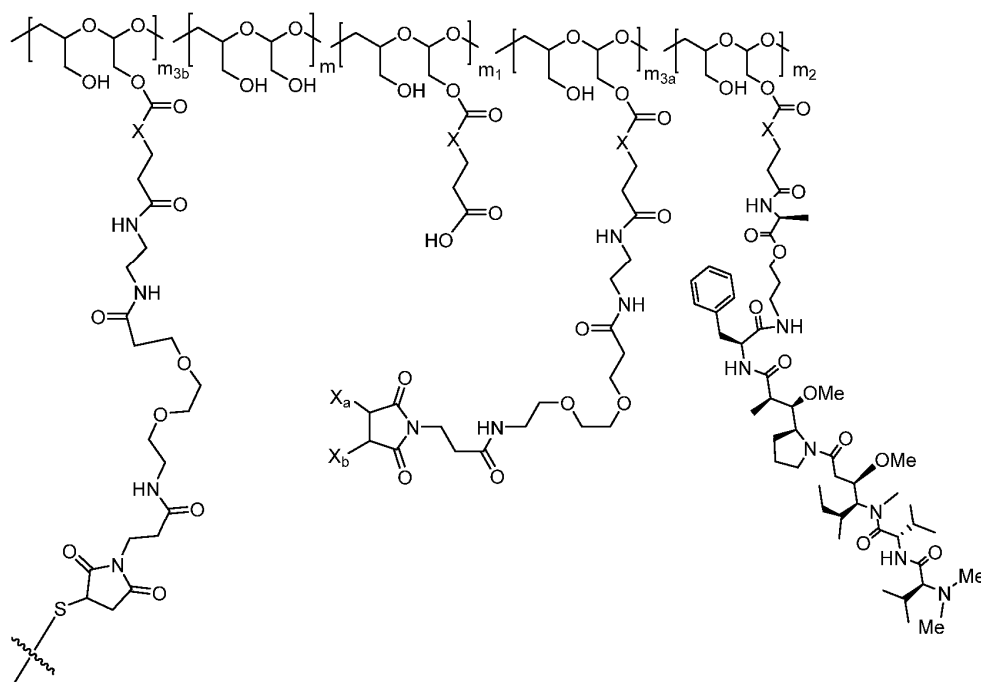
Например, соотношение между D и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет около 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

Например, соотношение между D и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет около 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

Например, соотношение между D и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет около 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

Например, соотношение между D и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

Например, каждый из одного или более D-несущих полимерных каркасов независимо представлен формулой (Id)



(Id),

где  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17,

$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, а

концевой  $\sum_{m_{3b}}$  обозначает прямое присоединение одного или более полимерных каркасов к выделенному антителу против HER2 или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему молекулярную массу около 40 кДа или больше.

Каркас формулы (Id), может включать один или более из следующих признаков.

Сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  составляет между 1 и 18.

Когда PNF в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 до около 40 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 18, а соотношение между PNF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом составляет 10 или меньше.

Когда PNF в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 150,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 70,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 20,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 9,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 10, а соотношение между PNF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8.

Когда PNF в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 20 до около 110,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 50,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 15,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 7,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 8, а соотношение между PNF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, от около 2 до около 6 или от около 2 до около 4).

Когда PNF в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 40 до около 75,  $m_1$  представляет собой целое число от около 2 до около 35,  $m_2$  представляет собой целое число от около 2 до около 10,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 4,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 5, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 5, а соотношение между PNF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, от около 2 до около 6 или от около 2 до около 4).

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между гидроксипропиламидом аури-

статина F ("AF HPA") и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF HPA и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между AF HPA и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF HPA и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF HPA и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF HPA и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом может составлять около 4:1, 3:1 или 2:1.

Водорастворимые малеимидоблокирующие фрагменты (например, X<sub>a</sub> или X<sub>b</sub>) представляют собой фрагменты, которые могут быть ковалентно присоединенными к одному из двух углеродных атомов олефина при реакции малеимидной группы с тиолсодержащим соединением формулы (II)



(II),

где R<sub>90</sub> представляет собой NHR<sub>91</sub>, OH, COOR<sub>93</sub>, CH(NHR<sub>91</sub>)COOR<sub>93</sub> или замещенную фенильную группу;

R<sub>93</sub> представляет собой атом водорода или C<sub>1-4</sub> алкил;

R<sub>91</sub> представляет собой атом водорода, CH<sub>3</sub> или CH<sub>3</sub>CO; а

d представляет собой целое число от 1 до 3.

В одном варианте реализации изобретения водорастворимое малеимидоблокирующее соединение формулы (II) может быть цистеином, N-ацетилцистеином, метиловым эфиром цистеина, N-метилцистеином, 2-меркаптоэтанолом, 3-меркаптопропионовой кислотой, 2-меркаптоуксусной кислотой, меркаптометанолом (т.е. HOCH<sub>2</sub>SH), бензилтиолом, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиолом. Один или более гидрофильных заместителей на фениле содержат OH, SH, метокси, этокси, COOH, CHO, СОС<sub>1-4</sub>алкил, NH<sub>2</sub>, F, циано, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H и тому подобное.

В другом аспекте изобретения водорастворимая малеимидоблокирующая группа представляет собой -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-R<sub>90</sub>, в которой

R<sub>90</sub> представляет собой OH, COOH или CH(NHR<sub>91</sub>)COOR<sub>93</sub>;

R<sub>93</sub> представляет собой атом водорода или CH<sub>3</sub>;

R<sub>91</sub> представляет собой атом водорода или CH<sub>3</sub>CO; а

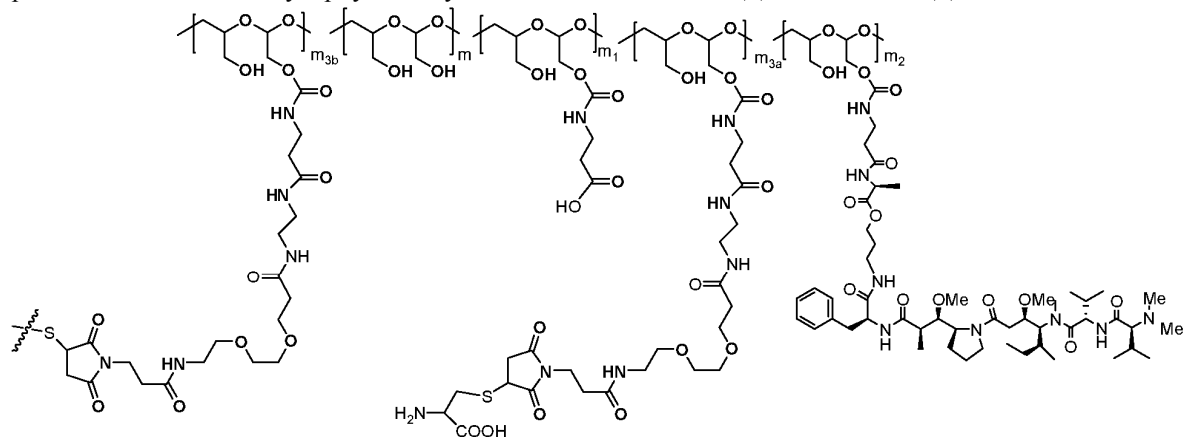
d представляет собой 1 или 2.

В другом варианте реализации изобретения водорастворимая малеимидоблокирующая группа представляет собой -S-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)COOH.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгат, описанный в данном документе, содер-



жит один или более D-несущих PHF, каждый из которых независимо представляет собой формулу (If), причем PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа



(If),

где  $m$  представляет собой целое число от 1 до около 300;

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140;

$m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40;

$m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17;

$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8;

сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 и до около 18;

сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300;

концевой  $\text{---}\xi\text{---}$  обозначает присоединение одного или более полимерных каркасов PHF к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека и содержит варибельный определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDRH1), содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 25); варибельный определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (CDRH2), содержащий аминокислотную последовательность YISSSSSTIYYADSVKKG (SEQ ID NO: 26); варибельный определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (CDRH3), содержащий аминокислотную последовательность GGHGDFDL (SEQ ID NO: 27); варибельный определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (CDRL1), содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); варибельный определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (CDRL2), содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21) и варибельный определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (CDRL3), содержащий аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29); а соотношение между PHF и антителом составляет 10 или меньше.

Каркас формулы (If) может включать один или более из следующих признаков.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 150,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 70,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 20,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 9,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 10, а соотношение между PHF и антителом представляет собой целое число от 2 до около 8.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 20 до около 110,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 50,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 15,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 7,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 8, а соотношение между PHF и антителом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, от около 2 до около 6 или от около 2 до около 4).

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 40 до около 75,  $m_1$  представляет собой целое число от около 2 до около 35,  $m_2$  представляет собой целое число от около 2 до около 10,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 4,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 5, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 5, а соотношение между PHF и антителом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, от около 2 до около 6 или от около 2 до около 4).

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между гидроксипропиламидом аури-статина F ("AF HPA") и антителом может составлять около 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1,

22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

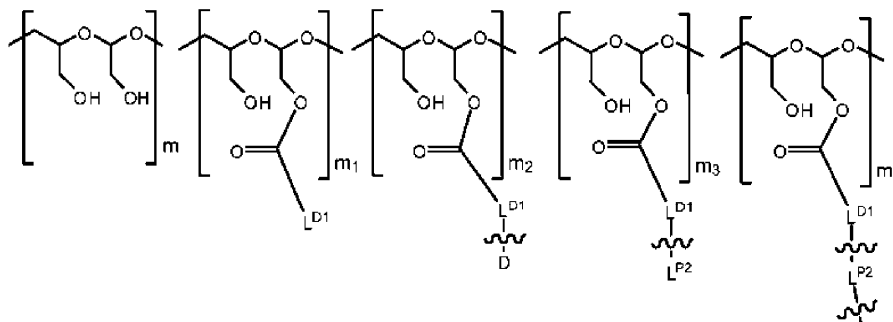
В других вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между PHF и антителом может составлять около 4:1, 3:1 или 2:1.

В другом аспекте изобретения конъюгат, описанный в данном документе, представляет собой формулу (Ib)



Антитело против HER2

(Ib),

где обозначение "Антитело против HER2" обозначает выделенное антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе;

— $\xi$ — между  $L^{P2}$  и "Антителом против HER2" обозначено непосредственное или опосредованное присоединение антитела против HER2 к  $L^{P2}$ ,

каждое присутствующее антитело против HER2 независимо имеет молекулярную массу меньше чем 200 кДа,

$m$  представляет собой целое число от 1 до около 2200,

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 660,

$m_2$  представляет собой целое число от 3 до около 300,

$m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 110,

$m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 60, а

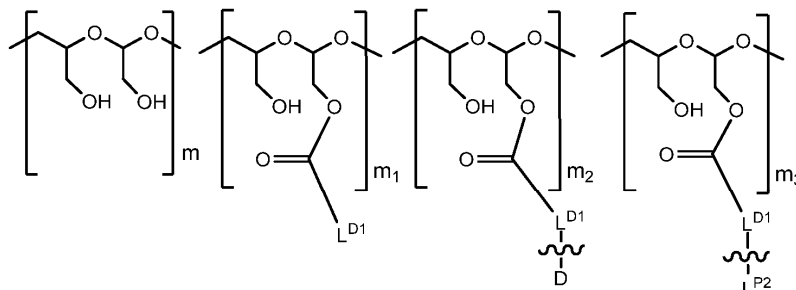
сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  находится в диапазоне от около 150 до около 2200.

В формуле (Ib)  $m_1$  представляет собой целое число от около 10 до около 660 (например, около 10-250).

Когда PHF в формуле (Ib) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 50 кДа до около 100 кДа (т.е. сумму  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  в диапазоне от около 370 до около 740),  $m_2$  представляет собой целое число от 5 до около 100,  $m_3$  представляет собой целое число от 1 до около 40,  $m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 20 и/или  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 220 (например,  $m_1$  составляет около 15-80).

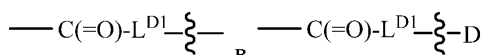
В формуле (Ib) каждое антитело против HER2 независимо имеет молекулярную массу 120 кДа или меньше, 80 кДа или меньше, 70 кДа или меньше, 60 кДа или меньше, 50 кДа или меньше, 40 кДа или меньше, 30 кДа или меньше, 20 кДа или меньше, или 10 кДа или меньше, или от около 4 до 80 кДа (например, 4-20, 20-30 или 30-70 кДа).

Другой аспект изобретения относится к способу получения конъюгата, описанного в данном документе. Данный способ включает приведение в реакцию выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с полимерным каркасом формулы (Ia) так, чтобы конъюгат представлял формулу

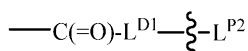


(Ia),

где  $L^{D1}$  представляет собой карбонилсодержащий фрагмент;



каждое присутствие  $\xi$  независимо представляет собой первый линкер, который содержит такую биоразрушаемую связь, что когда связь разрушается, то D высвобождается в активной форме для проявления своего терапевтического действия; а присутствие  $\xi$  в  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$  между  $L^{D1}$  и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к  $L^{D1}$ ;



каждое присутствие  $\xi$  представляет собой независимо второй линкер, еще не соединенный с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в котором  $L^{P2}$  представляет собой фрагмент, содержащий функциональную группу, которая еще будет образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, а  $\xi$  между  $L^{D1}$  и  $L^{P2}$  обозначает непосредственное или опосредованное присоединение  $L^{P2}$  к  $L^{D1}$ , и каждое присутствие второго линкера отличается от каждого присутствия первого линкера;

$m$  представляет собой целое число от 1 до около 300,

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140,

$m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40,

$m_3$  представляет собой целое число от 1 до около 18, а

сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300.

В формулах полимерных каркасов, описанных в данном документе, разъединение или промежуток между полиацетальными единицами указывает, что данные единицы могут соединяться друг с другом в любом порядке. Другими словами, вводимые группы, которые содержат, например, D,  $L^{P2}$  и выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, могут случайным образом распределяться вдоль полимерного скелета.

В настоящем изобретении также представлены способы лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома одной или более патологий, связанных с аномальной экспрессией, функционированием и/или активацией HER2, или облегчения симптома, связанного с такими патологиями, путем введения моноклонального антитела, его фрагмента и/или его конъюгата, описанных в данном документе, субъекту, для которого такое лечение или предотвращение является желательным. Субъект, подлежащий лечению, является, например, человеком. Моноклональное антитело, его фрагмент и/или его конъюгат вводят в количестве, достаточном для лечения, предотвращения или облегчения симптома, связанного с данной патологией.

В настоящем изобретении также представлены способы лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома одной или более патологий, связанных с экспрессией, функционированием и/или активацией HER2, или облегчения симптома, связанного с такими патологиями, путем введения моноклонального антитела, его фрагмента и/или его конъюгата, описанных в данном документе, субъекту, для которого такое лечение или предотвращение является желательным. Субъект, подлежащий лечению, является, например, человеком. Моноклональное антитело, его фрагмент и/или его конъюгат вводят в количестве, достаточном для лечения, предотвращения или облегчения

симптома, связанного с данной патологией.

Патологии, излечиваемые и/или предотвращаемые с использованием данных моноклональных антител, их фрагментов и/или их конъюгатов, описанные в данном документе, включают, например, рак. Например, антитела, их фрагменты и/или их конъюгаты, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, гемангиомы, рака пищевода, рака глаза, рака гортани, рака рта, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака ротовой полости, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака простаты, рака легких, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почек и рака желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или их конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака молочной железы.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или их конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака желудочно-кишечного тракта.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или их конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома немелкоклеточного рака легких (НМРЛ).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или их конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака яичника.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против Her2, или его антигенсвязывающий фрагмент, применяемое для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака (например, рака, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, гемангиомы, рака пищевода, рака глаза, рака гортани, рака рта, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака ротовой полости, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака простаты, рака легких, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почек и рака желудочно-кишечного тракта), конкурирует за связывание с тем же эпитопом Her-2 с антителом, содержащим (1) вариабельный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 25); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность YISSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 26); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность GGHG YFDL (SEQ ID NO: 27), и вариабельный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29); (2) вариабельный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSGRSMN (SEQ ID NO: 30); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность YISSDSRTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 31); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность GGHG YFDL (SEQ ID NO: 27), и вариабельный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29); (3) вариабельный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYGMH (SEQ ID NO: 17); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 18); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность EAPYYAKDYMDV (SEQ ID NO: 19), и вариабельный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO: 20); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYVSYWT (SEQ ID NO: 22), или (4) вариабельный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYGMH (SEQ ID NO: 17); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность GIWWDGSNEKYADSVKG (SEQ ID NO: 23); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность EAPYYAKDYMDV (SEQ ID NO: 19), и вариабельный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO: 20); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASRRAT (SEQ ID NO: 24), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYVSYWT (SEQ ID NO: 22).

В другом варианте реализации изобретения антитело против Her2, или его антигенсвязывающий фрагмент, применяемое для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака (например, рака, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, гемангиомы, рака пищевода, рака глаза, рака гортани, рака рта, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака ротовой полости, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака простаты, рака легких, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почек и рака желудочно-кишечного тракта), конкурирует за связывание с тем же эпитопом Her-2 с антителом, содержащим (1) переменный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 25); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность YISSSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 26); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность GGHGYFDL (SEQ ID NO: 27), и переменный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29); (2) переменный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSGRSMN (SEQ ID NO: 30); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность YISSDRTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 31); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность GGHGYFDL (SEQ ID NO: 27); переменный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29); (3) переменный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYGMH (SEQ ID NO: 17); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO: 18); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность EAPYYAKDYMDV (SEQ ID NO: 19), и переменный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO: 20); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYVSYWT (SEQ ID NO: 22), или (4) переменный участок тяжелой цепи CDRH1, содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYGMH (SEQ ID NO: 17); CDRH2, содержащий аминокислотную последовательность GIWWDGSNEKYADSVKG (SEQ ID NO: 23); CDRH3, содержащий аминокислотную последовательность EAPYYAKDYMDV (SEQ ID NO: 19), и переменный участок легкой цепи CDRL1, содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO: 20); CDRL2, содержащий аминокислотную последовательность GASRRAT (SEQ ID NO: 24), и CDRL3, содержащий аминокислотную последовательность QQYVSYWT (SEQ ID NO: 22), причем антитело против Her2, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгировано непосредственно или опосредовано по меньшей мере с одним терапевтическим средством, при этом терапевтическое средство представляет собой низкомолекулярную молекулу, имеющую молекулярную массу  $\leq$  около 5 кДа,  $\leq$  около 4 кДа,  $\leq$  около 3 кДа,  $\leq$  около 1,5 кДа или  $\leq$  около 1 кДа. В изобретении также представлены наборы и/или методы выявления или иного разделения, например стратификации, популяции пациентов, которой подходит терапевтическое введение антитела против HER2 или его антигенсвязывающего фрагмента и/или его конъюгатов PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанных в данном документе, путем выявления пациента, имеющего низкую экспрессию HER2 до лечения антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом и/или его конъюгатами, описанными в данном документе. Низкая экспрессия HER2 представлена у тех пациентов, которые имеют количество меньше или равное 100000, меньше или равное 90000, или меньше или равное 80000 молекул HER2 на клетку, например, которое измерено на клетку в исследуемой популяции клеток. Уровень экспрессии HER2, т.е. количество молекул HER2 на клетку, может измеряться с использованием любого признанного в данной области техники метода, включая, но не ограничиваясь ими, использование анализов, основанных на жизнеспособности клеток, анализы показаны в рабочих примерах, предложенных в данном документе (см., например, пример 18).

В изобретении также представлены наборы и/или методы выявления или иного разделения, например стратификации, популяции пациентов, которой подходит терапевтическое введение антитела против HER2 или его антигенсвязывающего фрагмента и/или его конъюгатов, описанных в данном документе, путем выявления показателя HER2 у пациента, до лечения антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом и/или его конъюгатами, описанными в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта идентифицируют как имеющего показатель экспрессии HER2 1+ или 2+. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта идентифицируют как имеющего показатель экспрессии HER2 1+ или 2+, как выявляется иммуногистохимическим (ИГХ) анализом, выполняемым на исследуемой популяции клеток, и при этом в исследуемой популяции клеток не амплифицируется ген HER2. В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемую популяцию клеток получают из свежей размороженной ткани из биопсийного образца. В некоторых вариантах реализации изобретения исследуемую популяцию клеток получают из замороженной ткани из биопсийного образца.

При ИГХ исследовании измеряется количество белка рецептора HER2 на поверхности клеток в образце раковой ткани, например образце раковой ткани молочной железы или раковом образце желудочно-кишечного тракта, и присваивают выявленному уровню рецептора HER2 поверхности клеток показатель HER2 0, 1+, 2+ или 3+. Если у субъекта показатель HER2 находится в диапазоне от 0 до 1+, то рак считается "HER2-отрицательным". Если показатель составляет 2+, то рак относится к "пограничному", а показатель 3+ означает, что рак является "HER2-положительным".

В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта идентифицируют как имеющего показатель 1+ или 2+ для экспрессии HER2 и рефрактерного к химиотерапии, включающей стандартные химиотерапевтические средства первой линии. Как используется в данном документе, термин "субъект" включает людей и других млекопитающих. В некоторых вариантах реализации изобретения субъекта идентифицируют как имеющего показатель 1+ или 2+ для экспрессии HER2 и страдающего от рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) или рака яичника.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака молочной железы у пациентов, которые имеют результат ИГХ HER2 1+ или ИГХ HER2 2+ без амплификации генов, например FISH- (или отрицательный результат по флуоресценции при гибридизации *in situ*).

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака молочной железы у пациентов, у которых имеется поздняя стадия HER2-положительного рака железы и которые раньше получали лечение с помощью препарата Кадсила.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака молочной железы у пациентов, у которых имеется поздняя стадия HER2-положительного рака железы и которые раньше не получали лечение с помощью Кадсилы.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака желудочно-кишечного тракта у пациентов, которые имеют результат ИГХ HER21+ или ИГХ HER22+ без амплификации гена, например, FISH-.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты и/или конъюгаты PBRM-полимера-лекарственного вещества, описанные в данном документе, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома немелкоклеточного рака легких у пациентов (НМРЛ), которые имеют результат ИГХ HER22+ или ИГХ HER23+, любую амплификацию гена HER2 или статус мутации.

В некоторых вариантах реализации изобретения субъект является рефрактерным к химиотерапии, включающей стандартные химиотерапевтические средства первой линии. В некоторых вариантах реализации изобретения субъект является устойчивым к лечению с помощью Кадсилы.

На любой стадии заболевания может вводиться антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированное антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент, применяемые в любом из вариантов реализации способов и применений, предложенных в данном документе. Например, пациенту, страдающему от рака на любой стадии от ранней до метастатической, может вводиться такое антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2.

Антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2, применяемое в любом из вариантов реализации изобретения по этим способам и применениям, может вводиться самостоятельно или в комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами или другими средствами. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой любой из токсинов, описанных в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой (1) ингибиторы HER2, (2) ингибиторы EGFR (например, ингибиторы тирозинкиназ или таргетированные анти-EGFR антитела), (3) ингибиторы BRAF, (4) ингибиторы ALK, (5) ингибиторы рецепторов гормонов, (6) ингибиторы mTOR, (7) ингибиторы ФРЭС или (8) противораковые вакцины. В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой стандартное химиотерапевтическое средство первой линии, такое как, например, трастузумаб, пертузумаб, адо-трастузумаб эмтанзин (Кадсила), лапатиниб, анастрозол, летрозол, экземестан, эверолимус, фульвестрант, тамоксифен, торемифен, мегестрола ацетат, флуоксиместрон, этинила эстрадиол, паклитаксел, капецитабин, гемцитабин, эрибулин, винорелбин, циклофосфамид, карбоплатин, доцетаксел, альбумин-связанный паклитаксел, цисплатин, эпирубицин, иксабепилон, доксорубин, фторурацил, оксалиплатин, фторпиримидин, иринотекан, рамуцирумаб, митомидин, лейковорин, цетуксимаб, бевацизумаб, эрлотиниб, афатиниб, кризотиниб, перметрексед, церитиниб, этопозид, винбластин, винкрестин, ифосфамид, липосомальный доксорубин, топоте-

кан, альтретамин, мелфалан или лейпролида ацетат. В некоторых вариантах реализации изобретения второе средство представляет собой Кадсилу.

В некоторых вариантах реализации изобретения средство представляет собой, по меньшей мере, второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает HER2. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 вводят в комбинации с антителом против HER2, антителом-ингибитором димеризации HER2 или комбинации антитела против HER2 и антитела-ингибитора димеризации HER2, такого как, например, трастузумаб или пертузумаб, или их комбинацией. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 вводят в комбинации с биосимиляром трастузумаба или биосимиляром пертузумаба, или их комбинацией.

Данные комбинации антител против HER2 и/или конъюгированных антител против HER2 пригодны при лечении патологий, таких как, например, рак. Например, эти комбинации антител против HER2 и/или конъюгированных антител против HER2, например антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент и/или конъюгированные антитела против HER2 (например, конъюгаты антитело против HER2-полимер-лекарственное вещество), описанные в данном документе, в комбинации с трастузумабом и пертузумабом или как трастузумабом, так и пертузумабом, или биосимиляром трастузумаба, биосимиляром пертузумаба или обоими биосимилярами, пригодны для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного облегчения симптома рака (например, рака, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, гемангиомы, рака пищевода, рака глаза, рака гортани, рака рта, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака ротовой полости, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака простаты, рака легких, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почек и рака желудочно-кишечного тракта).

Данные комбинации также пригодны для увеличения разрушения HER2, когда экспрессирующая HER2 клетка приводится в контакт с данными комбинациями. Уровень разрушения HER2 выявляют с использованием любого признанного в данной области техники метода выявления разрушения HER2, включая, но не ограничиваясь ими, выявление уровней разрушения HER2 в присутствии и отсутствии комбинации антител против HER2 (или их биосимиляров), как показано в рабочих примерах, предложенных в данном документе (см., например, пример 14). Например, уровень разрушения HER2 определяют с использованием вестерн анализа лизатов экспрессирующих HER2 клеток, которые были обработаны комбинацией антител против HER2, по сравнению с уровнем разрушения HER2 в экспрессирующих HER2 клетках, которые не были обработаны комбинацией антител против HER2.

В некоторых вариантах реализации изобретения антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 и дополнительное(ые) средство(а) приготовлены в виде единственной терапевтической композиции, и антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 и дополнительное средство вводят одновременно. В альтернативном варианте антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 и дополнительное средство отделены друг от друга, например каждое приготовлено в виде отдельной терапевтической композиции, и антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 и дополнительное средство вводят одновременно, или антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 и дополнительное средство вводят во ходе режима лечения в различные моменты времени. Например, антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 вводят до введения дополнительного средства, антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 вводят после введения дополнительного средства, или антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 вводят чередующимся образом. Как описано в данном документе, антитело против HER2 и/или конъюгированное антитело против HER2 и дополнительное средство вводят в однократных дозах или многократных дозах.

Фармацевтические композиции в соответствии с данным изобретением могут включать антитело, его фрагмент и/или его конъюгат, описанные в данном документе, и пригодный носитель. Данные фармацевтические композиции могут включать в наборы, такие как, например, диагностические наборы.

Специалисту в данной области техники будет ясно, что антитела, описанные в данном документе, имеют множество применений. Например, белки, описанные в данном документе, применяются как терапевтические средства. Антитела, описанные в данном документе, также применяются как реактивы в диагностических наборах или диагностических средствах, или данные антитела могут применяться в конкурентных анализах для создания терапевтических реактивов.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют одинаковое значение, как обычно понимается специалистом в данной области техники, к которой принадлежит данное изобретение. В данном описании формы единственного числа также включают множественное число, если из контекста очевидно не следует иное. Хотя при практической реализации или проверке настоящего изобретения могут применяться способы и материалы, сходные или эквивалентные тем, которые описаны в данном документе, ниже описаны пригодные способы и материалы. В случае конфликта, под защитой будет находиться настоящее описание, включая определения. В допол-

нение к этому, материалы, способы и примеры являются лишь иллюстративными и не предназначены для ограничения.

Другие признаки и преимущества по данному изобретению будут очевидными из следующего подробного описания и формулы изобретения.

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

На фиг. 1а показан эпитоп, связывающийся антителами ХМТ 1517 и ХМТ 1518 посредством октетного связывания эпитопов Red384;

на фиг. 1b - эпитоп, связывающийся антителами ХМТ 1519 и ХМТ 1520 посредством октетного связывания эпитопов Red384;

на фиг. 2 - связывание с клеточной поверхностью антител ХМТ 1517, ХМТ 1518, ХМТ 1519 и ХМТ 1520 с клетками JIMT-1;

на фиг. 3а - аффинности связывания антител ХМТ 1517, ХМТ 1518 с рекомбинантным HER2 человека и HER2 яванского макака;

на фиг. 3b - аффинности связывания антител ХМТ 1519, ХМТ 1520 с рекомбинантным HER2 человека и HER2 яванского макака;

на фиг. 3с - аффинности связывания антител ХМТ 1519 и примера 16Н с рекомбинантным HER2 человека;

на фиг. 3d - аффинности связывания антител ХМТ 1519 и примера 16Н с HER2 яванского макака;

на фиг. 4 показано, что антитела ХМТ 1518 и ХМТ 1519 конкурируют за связывание с HER2;

на фиг. 5 показана антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) трастузумаба и антител ХМТ 1518, ХМТ 1519 и ХМТ 1520;

на фиг. 6 - скорость интернализации трастузумаба и антител НТХМТ 1518, ХМТ 1519 и ХМТ 1520;

на фиг. 7 - интернализация антител HER2 в клетки SKBR3;

на фиг. 8 - разрушение HER2, индуцированное комбинацией анти-HER2 антител;

на фиг. 9 иллюстрируется противоопухолевая эффективность примера 16А, трастузумаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 16D, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели NCI-N87 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 10 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16А, трастузумаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 16D, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели JIMT-1 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 11 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; пертузумаба; комбинации Кадсилы и пертузумаба и примера 16D, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели JIMT-1 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 12 - противоопухолевая эффективность примера 16F, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))); комбинации трастузумаба и пертузумаба или тройной комбинации трастузумаба, пертузумаба и примера 16F, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели NCI-N87 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 13 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели SNU5 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 14 - противоопухолевая эффективность Кадсилы и примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели TOV-21G ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 15 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели H522 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 16 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели SKOV3 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 17 - противоопухолевая эффективность примера 16F, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели Calu-3 ксенотрансплантата опухоли;

на фиг. 18 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16Н, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на модели BRE-0333 HER2 1+ ксенотрансплантата, полученного от пациента;

на фиг. 19 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16Н, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на модели MAXF\_1162 HER23+ ксенотрансплантата, полученного от пациента;

на фиг. 20 - противоопухолевая эффективность Кадсилы; примера 16Н, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), и примера 17С, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), как измерено на мышинной модели BT474 ксенотрансплантата опухоли.

#### **Подробное описание изобретения**

В изобретении предложены моноклональные антитела, которые специфически связывают HER2 человека в растворимой форме или мембраносвязанной (т.е. при экспрессии на клеточной поверхности). В



данном изобретении дополнительно предложены моноклональные антитела, которые специфически связывают HER2. Эти антитела в данном документе в совокупности называются антителами против "HER2". Антитела по настоящему изобретению связываются с эпитопом HER2 с равновесной константой диссоциации ( $K_d$  или  $K_D$ )  $\leq 1$  мкМ, например  $\leq 100$  нМ, предпочтительно  $\leq 10$  нМ и предпочтительнее  $\leq 1$  нМ. Например, антитела против HER2, предложенные в данном документе, проявляют  $K_d$  в диапазоне приблизительно между от  $\leq 1$  нМ до около 1 пМ.

Антитела против HER2, описанные в данном документе, служат для модуляции, блокирования, ингибирования, снижения, обеспечения антагонизма, нейтрализации или иного нарушения функциональной активности HER2. Функциональные активности HER2 включают, например, модуляцию активности механизма PI3K-Akt. Например, антитела против HER2 полностью или частично ингибируют функциональную активность HER2 путем частичной или полной модуляции, блокирования, ингибирования, снижения, обеспечения антагонизма, нейтрализации или иного нарушения активности механизма PI3K-Akt. Активность механизма PI3K-Akt оценивают с использованием любого признанного в данной области техники метода выявления активности механизма PI3K-Akt, включая, но не ограничиваясь ими, выявление уровней фосфорилированной Akt в присутствии и отсутствии антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе.

Считается, что антитела против HER2 полностью модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, обеспечивают антагонизм, нейтрализуют или иным образом нарушают функциональную активность HER2, если уровень функциональной активности HER2 в присутствии антитела против HER2 уменьшается по меньшей мере на 95%, например на 96, 97, 98, 99 или 100%, по сравнению с уровнем функциональной активности HER2 в отсутствие связывания с антителом против HER2, описанным в данном документе. Считается, что антитела против HER2 частично модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, обеспечивают антагонизм, нейтрализуют или иным образом нарушают функциональную активность HER2, если уровень активности HER2 в присутствии антитела против HER2 уменьшается на меньше чем 95%, например 10, 20, 25, 30, 40, 50, 60, 75, 80, 85 или 90%, по сравнению с уровнем активности HER2 в отсутствие связывания с антителом против HER2, описанным в данном документе.

#### Определения

Если не определено иное, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, будут иметь значения, которые обычно понятны специалистам в данной области техники. Дополнительно, если контекстом не требуется иное, формы единственного числа включают множественное число, а термины во множественном числе будут включать единственное число. В целом, номенклатурные названия, используемые в связи с, а также с методиками, культурами клеток и тканей, молекулярной биологией и химией белков и олиго- или полинуклеотидов, а также гибридизацией, описанными в данном документе, являются хорошо известными и обычно применяемыми в данной области техники. Стандартные методики применяют для получения рекомбинантной ДНК, при олигонуклеотидном синтезе, получении культуры тканей и трансформации (например, электропорация, липофекция). Ферментативные реакции и методики очистки выполняют в соответствии с описанием производителей или как обычно выполняется в данной области техники, или как описано в данном документе. Изложенные выше методики и процедуры, как правило, обычно выполняются в соответствии с традиционными методами, хорошо известными в данной области техники, и как описано в различных общих и более специфических источниках, цитируемых и обсуждаемых во всем тексте настоящего описания. См., например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатурные названия, используемые в связи с, а также с лабораторными процедурами и методиками, аналитической химии, синтетической органической химии и медицинской и фармацевтической химии, описанные в данном документе, являются хорошо известными и обычно применяемыми в данной области техники. Стандартные методики применяют при химических синтезах, химических анализах, приготовлении фармацевтических препаратов, лекарственной формы и доставке, а также лечении пациентов.

Как используется в соответствии с настоящим описанием, следующие термины, если не указано иное, должны пониматься как имеющие следующие значения.

Как используется в данном документе, обозначение терминами "HER2" (также известный как ErbB-2, NEU, HER-2 и CD340) при применении в данном документе, относится к рецептору 2 эпидермального фактора роста человека (SwissProt P04626) и включает любые варианты, изоформы и видовые гомологи HER2, которые естественным образом экспрессируются клетками, включающими опухолевые клетки, или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном HER2. Видовые гомологи включают HER2 макака-резус (*Macaca mulatta*, № GI: 109114897 в базе данных Genbank). Эти термины являются синонимичными и могут использоваться взаимозаменяемо.

Как используется в данном документе, термин "антитело против HER2" или "анти-HER2 антитело" представляет собой антитело, которое специфически связывается с антигеном HER2.

Как используется в данном документе, термин "антитело" относится к молекулам иммуноглобулинов и иммунологически активным частям молекул иммуноглобулинов (Ig), т.е. молекул, которые содер-

жат антигенсвязывающий сайт, который специфически связывает антиген (иммунологически реагирует с ним). Термином "специфически связывать" или "иммунологически реагирует с", или "направленный против" обозначают то, что антитело реагирует с одной или более антигенных детерминант требуемого антигена и не реагирует с другими полипептидами или связывает их с намного меньшей аффинностью ( $K_d > 10^{-6}$ ). Антитела включают, но не ограничиваются ими, поликлональные, моноклональные, химерные, dAb (доменное антитело), одноцепочечные, фрагменты  $F_{ab}$ ,  $F_{ab}$  и  $F_{(ab)2}$ , scFv и экспрессионную библиотеку  $F_{ab}$ .

Известно, что основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи включает варибельный участок от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом отвечающий за распознавание антигенов. Карбоксиконцевая часть каждой цепи определяет константный участок, главным образом отвечающий за эффекторную функцию. В общем, молекулы антител, полученные из организма людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также содержат субклассы, такие как IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и другие. Кроме того, в организме людей тяжелая цепь может быть цепью к или цепью λ.

Термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела", как используется в данном документе, относится к популяции молекул антитела, которая содержит только один молекулярный вид молекулы антитела, состоящей из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность участки (CDR) моноклонального антитела являются идентичными у всех молекул популяции. mAb содержит антигенсвязывающий сайт, способный к иммунологической реакции с конкретным эпитопом антигена, который характеризуется уникальной аффинностью связывания с ним.

В общем, молекулы антител, полученные из организма людей, относятся к любому из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга природой тяжелой цепи, присутствующей в молекуле. Некоторые классы также содержат субклассы, такие как IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2</sub> и другие. Кроме того, в организме людей тяжелая цепь может быть цепью к или цепью λ.

Термин "антигенсвязывающий сайт" или "связывающая часть" относится к части молекулы иммуноглобулина, которая принимает участие в связывании антигенов. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых варибельных ("V") участков тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три высокодивергентных промежутка в пределах V-участков тяжелой и легкой цепей, называемые "гиперварибельные участки", размещены между более консервативных фланкирующих промежутков, известных как "каркасные участки" или "FR". Таким образом, термин "FR" относится к аминокислотным последовательностям, которые в природе обнаружены в иммуноглобулинах между и в смежном положении с гиперварибельными участками. В молекуле антитела три гиперварибельных участка легкой цепи и три гиперварибельных участка тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве с образованием антигенсвязывающей поверхности. Антигенсвязывающая поверхность является комплементарной трехмерному пространству связанного антигена и данные три гиперварибельные участки каждой из тяжелой и легкой цепей называются "определяющими комплементарность участками" или "CDR". Присвоение аминокислоты каждого домена происходит в соответствии с определениями Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991)) или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

Термины "фрагмент", "фрагмент антитела", "антигенсвязывающий фрагмент" и "связывающий антиген фрагмент" применяют в данном документе взаимозаменяемо, если не указано иное.

Как используется в данном документе, термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или его фрагментом, или рецептором Т-клеток. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную специфически связываться с иммуноглобулином или рецептором Т-клеток. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Считается, что антитело специфически связывает антиген, когда константа диссоциации составляет  $\leq 1$  мкМ; например  $\leq 100$  нМ, предпочтительно  $\leq 10$  нМ и предпочтительнее  $\leq 1$  нМ.

При использовании в данном документе в контексте двух или более антител, термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" указывает на то, что два или более антител конкурируют за связывание с HER2, например конкурируют за связывание с HER2 в анализе, описанном в примерах 5 или 8. Антитело "блокирует" или "перекрестно блокирует" одно или более других антител при связывании с HER2, если антитело конкурирует с одним или более других антител на 25% или более, 25-74% представляет "частичное блокирование" и 75-400% представляет "полное блокирование", как предпочтительно определено с использованием анализа в примерах 5 и 8. Для некоторых пар антител конкуренцию или блокирование в анализе в примерах 5 и 8 наблюдают, только когда одно антитело нанесено на планшет, а

другое используют для конкуренции, а не наоборот. Если иное не определено или не отрицается в контексте, термины "конкурирует с", "перекрестно конкурирует с", "блокирует" или "перекрестно блокирует" при использовании в данном документе, также предполагают охват таких пар антител.

Как используется в данном документе, антитело, которое "ингибирует димеризацию HER", должно означать антитело, которое ингибирует или нарушает образование димера HER. Предпочтительно, такое антитело связывается с HER2 по его гетеродимерному сайту связывания. В одном варианте реализации изобретения ингибирующее димеризацию антитело в данном документе представляет собой пертузумаб или MAb 2C4. Другие примеры антител, которые ингибируют димеризацию HER, включают антитела, которые связываются с EGFR и ингибируют его димеризацию с одним или более другими рецепторами HER, такими как, например, моноклональное антитело против EGFR 806, MAb 806, которое связывается с активированным или "непривязанным" EGFR (см. Johns et al., J. Biol. Chem. 279(29):30375-30384 (2004)); антитело, которое связывается с HER3 и ингибирует его димеризацию с одним или более другими рецепторами HER, и антитело, которое связывается с HER4 и ингибирует его димеризацию с одним или более другими рецепторами HER.

Термин "ингибитор димеризации HER2", как используется в данном документе, должен означать средство, которое ингибирует образование димера или гетеродимера, содержащего HER2.

Как используется в данном документе, термин "интернализация", если применяется в контексте антитела против HER2, включает любой механизм, посредством которого антитело интернализуется внутри экспрессирующей HER2 клетки с клеточной поверхности и/или из окружающей среды, например, посредством эндоцитоза.

Как используется в данном документе, термины "иммунологическое связывание" и "свойства иммунологического связывания" относятся к нековалентному взаимодействию такого типа, который происходит между молекулой иммуноглобулина и антигеном, к которому иммуноглобулин является специфическим. Сила или аффинность взаимодействий иммунологического связывания может выражаться в терминах константы диссоциации ( $K_d$ ) взаимодействия, причем меньшие значения  $K_d$  представляют большую аффинность. Свойства иммунологического связывания отдельных полипептидов можно количественно определять с использованием методов, хорошо известных в данной области техники. Один такой метод подразумевает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающего сайта/антигена, причем данные скорости зависят от концентраций партнеров комплекса, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как "константа скорости ассоциации" ( $K_{on}$ ), так и "константа скорости диссоциации" ( $K_{off}$ ) могут определяться расчетом концентраций и действительными скоростями ассоциации и диссоциации. (См. Nature 361:186-87 (1993)). Соотношение  $K_{off}/K_{on}$  дает возможность компенсировать все параметры, не связанные с аффинностью, и оно равно константе диссоциации  $K_d$ . (См., в целом, Davies et al. (1990) Annual Rev. Biochem. 59:439-473). Как указано, антитело по данному изобретению специфически связывается с HER2, когда равновесная константа диссоциации ( $K_d$  или  $K_D$ ) составляет  $\leq 1 \mu\text{M}$ , предпочтительно  $\leq 100 \text{ nM}$ , предпочтительнее  $\leq 10 \text{ nM}$  и наиболее предпочтительно от  $\leq 100 \text{ pM}$  до около  $1 \text{ pM}$ , как измерено анализами, такими как анализы радиолигандного связывания или сходные анализы, известные специалистам в данной области техники.

Термин "выделенный полинуклеотид", как используется в данном документе, должен означать полинуклеотид генома, кДНК или синтетического происхождения, или их некоторые комбинации, для которых, благодаря своему происхождению, "выделенный полинуклеотид" (1) не ассоциируется со всем или частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" обнаружен в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не встречается в природе, как часть более крупной последовательности. Полинуклеотиды в соответствии с данным изобретением включают последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 34 и 36, а также молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы тяжелых цепей иммуноглобулинов, представленные в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и последовательности нуклеиновых кислот SEQ ID NO: 35 и 37, а также молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие молекулы легких цепей иммуноглобулинов, представленные в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8.

Термин "выделенный белок", называемый в данном документе, означает белок кДНК, рекомбинантной РНК или синтетического происхождения, или их комбинации, для которых, благодаря своему происхождению или источнику происхождения, "выделенный белок" (1) не ассоциируется с белками, обнаруженными в природе, (2) является свободным от других белков из того же источника, (3) экспрессируется клеткой, полученной из различных видов, или (4) не встречается в природе.

Термин "полипептид" используется в данном документе по отношению к нативному белку, фрагментам или аналогам полипептидной последовательности. Следовательно, фрагменты нативного белка и аналоги являются видами данного рода полипептида. Полипептиды в соответствии с данным изобретением содержат молекулы тяжелых цепей иммуноглобулинов, представленных в SEQ ID NO: 1, 3, 5 и 7, и молекулы легких цепей иммуноглобулинов, представленных в SEQ ID NO: 2, 4, 6 и 8, а также молекулы антител, образованные комбинациями, содержащими молекулы тяжелых цепей иммуноглобулинов с мо-

лекулами легких цепей иммуноглобулинов, такие как молекулы легких цепей к иммуноглобулинов, и наоборот, а также их фрагменты и аналоги.

Термин "встречающийся в природе", как используется в данном документе, применимо к объекту, относится к тому факту, что объект может быть обнаружен в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не была намеренно модифицирована человеком в лаборатории или иным образом, является встречающейся в природе.

Термин "функционально связан", как используется в данном документе, относится к положениям компонентов, описываемым таким образом в связи с их возможностью функционировать предполагаемым для них способом. Регуляторная последовательность "функционально связана" с кодирующей последовательностью, связана таким образом, чтобы экспрессия кодирующей последовательности достигалась в условиях, сравнимых с регуляторными последовательностями.

Термин "регуляторная последовательность", как используется в данном документе, относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для влияния на экспрессию и процессинг кодирующей последовательности, с которыми они связаны. Природа таких регуляторных последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина у прокариот, такие контрольные последовательности в целом включают промотор, рибосомный сайт связывания и последовательность терминации транскрипции у эукариот, в целом, такие регуляторные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Предполагают, что термин "регуляторные последовательности" включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых является необходимым для экспрессии и процессинга, и также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых является предпочтительным, например лидерные последовательности и последовательности партнеров слияния. Термин "полинуклеотид", называемый в данном документе, означает полимерный набор нуклеотидов из по меньшей мере 10 оснований в длину, как рибонуклеотидов, так и дезоксирибонуклеотидов или модифицированной формы любого типа нуклеотида. Данный термин включает одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Термин "олигонуклеотид", называемый в данном документе, относится к встречающимся в природе и модифицированным нуклеотидам, связанным вместе встречающимися в природе и не встречающимися в природе олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подмножество полинуклеотидов, в целом, содержащие в длину 200 оснований или меньше. Предпочтительно олигонуклеотиды имеют в длину от 10 до 60 оснований и наиболее предпочтительно 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или от 20 до 40 оснований в длину. Олигонуклеотиды обычно являются одноцепочечными, например, для зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть и двухцепочечными, например, для применения в конструкции генного мутанта. Олигонуклеотиды, описанные в данном документе, являются либо смысловыми, либо антисмысловыми олигонуклеотидами.

Термин "встречающиеся в природе олигонуклеотиды", называемый в данном документе, включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды", называемый в данном документе, включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными группами сахаров и тому подобное. Термин "олигонуклеотидные связи", называемый в данном документе, включает олигонуклеотидные связи, такие как, фосфориоат, фосфордифитоат, фосфорселеноат, фосфордиселеноат, фосфоранилоатиоат, фосфораниладат, фосфорамидат и тому подобные. См., например, LaPlanche et al. Nucl. Acids Res. 14:9081 (1986); Stec et al. J. Am. Chem. Soc. 106:6077 (1984), Stein et al. Nucl. Acids Res. 16:3209 (1988), Zon et al. Anti Cancer Drug Design 6:539 (1991); Zon et al. Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed., Oxford University Press, Oxford England (1991)); Stec et al. патент США № 5151510; Uhlmann and Peyman Chemical Reviews 90:543 (1990). Олигонуклеотид, если необходимо, может включать метку для выявления.

Термин "селективно гибридизироваться", называемый в данном документе, означает способность к выявлению и селективному связыванию. Полинуклеотиды, олигонуклеотиды и их фрагменты в соответствии с изобретением селективно гибридизуют с нитями нуклеиновых кислот в условиях гибридизации и промывки, что минимизирует наблюдаемые количества выявляемого связывания с неспецифическими нуклеиновыми кислотами. Для достижения селективных условий гибридизации, как известно в данной области техники и обсуждается в данном документе, могут использоваться особо жесткие условия. В целом, гомология последовательностей нуклеиновых кислот между полинуклеотидами, олигонуклеотидами и фрагментами, описанными в данном документе, и интересующей последовательностью нуклеиновой кислоты будет составлять по меньшей мере 80%, и более, и обычно с предпочтительным увеличением гомологии до по меньшей мере 85, 90, 95, 99 и 100%. Две аминокислотные последовательности являются гомологичными, если существует частичная или полная идентичность между их последовательностями. Например, 85% гомологии означает, что 85% аминокислот являются идентичными, если две последовательности выравниваются с максимальным совпадением. Для гэпов (в любой из двух совпадающих последовательностей) допускается предпочтительное максимальное совпадение длин гэпов из 5 и меньше, а более предпочтительно с 2 или меньше. В альтернативном варианте и предпочтительно, две белковые последовательности (или полипептидные последовательности, полученные из них,

по меньшей мере с 30 аминокислотами в длину) являются гомологичными, как этот термин используется в данном документе, если они имеют показатель выравнивания больше чем 5 (в единицах стандартного отклонения) с использованием программы ALIGN с матрицей данных по мутации и штрафом за гэп равным 6 или больше. См. Dayhoff M.O., в Atlas of Protein Sequence and Structure, с 101-110 (том 5, National Biomedical Research Foundation (1972)) и Дополнение 2 к этому тому, с. 1-10. Две последовательности или их части предпочтительнее являются гомологичными, если их аминокислоты на более чем или в степени равной 50% идентичны, когда они оптимально выравнивались с использованием программы ALIGN. Термин "соответствует", используют в данном документе для обозначения того, что полинуклеотидная последовательность гомологична (т.е. идентична, неродственная строго эволюционно) для всей или части эталонной полинуклеотидной последовательности, или того, что полипептидная последовательность идентична эталонной полипептидной последовательности. В отличие от этого, термин "комплементарный", используют в данном документе для обозначения того, что комплементарная последовательность гомологична для всей или части эталонной полинуклеотидной последовательности. Для иллюстрации, нуклеотидная последовательность "TATAC" соответствует эталонной последовательности "TATAC" и является комплементарной эталонной последовательности "GTATA".

Следующие термины используются для описания взаимосвязей последовательностей между двумя или более полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей: "эталонная последовательность", "окно сравнения", "идентичность последовательностей", "процент идентичности последовательностей" и "значительная идентичность". "Эталонная последовательность" представляет собой определенную последовательность, используемую как основа для сравнения последовательностей, эталонная последовательность может быть подмножеством более крупной последовательности, например, как сегмент полноразмерной кДНК или геновой последовательности, данной в перечне последовательностей, или может содержать полную кДНК или геновую последовательность. В целом, эталонная последовательность имеет в длину по меньшей мере 18 нуклеотидов или 6 аминокислот, часто по меньшей мере 24 нуклеотидов или 8 аминокислот в длину и зачастую по меньшей мере 48 нуклеотидов или 16 аминокислот в длину. Поскольку две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности каждая может (1) содержать последовательность (т.е. часть целой полинуклеотидной или аминокислотной последовательности), которая сходна между двумя молекулами, и (2) может дополнительно содержать последовательность, которая является дивергентной между двумя полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями, то сравнения последовательностей между двумя (или более) молекул, как правило, выполняются сравнением последовательностей двух молекул по "окну сравнения" для идентификации и сравнения локальных участков сходства последовательностей. "Окно сравнения", как используется в данном документе, относится к концептуальному сегменту из по меньшей мере 18 последовательных нуклеотидных положений или 6 аминокислот, в которых полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность может сравниваться с эталонной последовательностью из по меньшей мере 18 последовательных нуклеотидов или 6 аминокислотных последовательностей и при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может содержать добавления, делеции, замены и тому подобное (т.е. гэпы) в 20 процентах или меньше по сравнению с эталонной последовательностью (которая не содержит добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для проведения выравнивания с окном сравнения может проводиться алгоритмом поиска локальной гомологии из Smith and Waterman Adv. Appl. Math. 2:482 (1981), алгоритмом выравнивания по гомологии из Needleman and Wunsch J. Mol. Biol. 48:443 (1970), методом поиска сходства из Pearson and Lipman Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 (1988), компьютеризированными реализациями этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, выпуск 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., г. Мадисон, штат Висконсин), программным обеспечением Geneworks или MacVector) или путем просмотра, и при этом выбирают наилучшее выравнивание (т.е. получающее наибольший процент гомологии по окну сравнения), достигаемое различными методами.

Термин "идентичность последовательностей" означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности являются идентичными (т.е. на основе сравнения нуклеотид-нуклеотид или остаток-остаток) по окну сравнения. Термин "процент идентичности последовательностей" рассчитывают путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей по окну сравнения определением числа положений, в которых идентичное основание нуклеиновой кислоты (например, А, Т, С, G, U или I) или остаток встречается в обеих последовательностях с получением числа совпавших положений, делением числа совпавших положений на общее количество положений в окне сравнения (т.е. размер окна) и умножением результата на 100 с получением процента идентичности последовательности. Термины "значительная идентичность", как используется в данном документе, обозначает характеристику полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, в которой полинуклеотид или аминокислота содержит последовательность, которая имеет по меньшей мере 85% идентичности последовательности, предпочтительно по меньшей мере от 90 до 95% идентичности последовательности, скорее по меньшей мере 99% идентичности последовательности по сравнению с эталонной последовательностью по окну сравнения из по меньшей мере 18 нуклеотидных (6 аминокислот) положений, часто по окну из

по меньшей мере 24-48 нуклеотидных (8-16 аминокислот) положений, причем процент идентичности последовательностей рассчитывают сравнением эталонной последовательности с последовательностью, которая может включать делеции или добавления, которые составляют всего 20 процентов или меньше от эталонной последовательности по окну сравнения. Эталонная последовательность может представлять собой подмножество более крупной последовательности.

Как используется в данном документе, двадцать основных аминокислот и их аббревиатуры соответствуют традиционному использованию. См. *Immunology - A Synthesis* (2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Стереизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати основных аминокислот, не встречающиеся в природе аминокислоты, такие как  $\alpha$ -,  $\alpha$ -дизамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие нетрадиционные аминокислоты также могут быть пригодными компонентами для полипептидов по данному изобретению. Примеры нетрадиционных аминокислот включают 4-гидроксипролин,  $\gamma$ -карбоксиглутамат,  $\epsilon$ -N,N,N-триметиллизин,  $\epsilon$ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин,  $\sigma$ -N-метиларгинин и другие сходные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). В обозначении полипептидов, используемом в данном документе, в соответствии со стандартным применением и правилом, левостороннее направление является аминоконцевым направлением, а правостороннее направление является карбоксиконцевым направлением.

Сходным образом, если не указано иное, левосторонний конец одноцепочечных полинуклеотидных последовательностей представляет собой 5'-конец, левостороннее направление двухцепочечных полинуклеотидных последовательностей относится к 5'-направлению. Направление от 5' к 3', добавление образующихся транскриптов РНК, относится к направлению транскрипции участков последовательностей на ДНК-цепи, имеющей такую же последовательность как РНК, а которые являются 5' по отношению к 5'-концу транскрипта РНК относятся к "восходящим последовательностям", участки последовательностей на цепи ДНК, имеющие такую же последовательность как РНК, и которые являются 3' по отношению к 3'-концу транскрипта РНК относятся к "нисходящим последовательностям".

Как применяется к полипептидам, термин "значительная идентичность" означает, что две пептидные последовательности, при оптимальном выравнивании, таком как выполненное программами GAP или BESTFIT с использованием веса гэпов по умолчанию, разделяют по меньшей мере 80% идентичности последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 90% идентичности последовательностей, предпочтительнее по меньшей мере 95% идентичности последовательностей и предпочтительнее всего по меньшей мере 99% идентичности последовательностей.

Предпочтительно, положения остатков, которые не идентичны, отличаются по заменам консервативных аминокислот.

Замены консервативных аминокислот относятся к взаимозаменяемости остатков, имеющих сходные боковые связи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, представлена глицином, аланином, валином, лейцином и изолейцином; группа аминокислот, имеющих алифатически-гидроксильные боковые цепи, представлена серином и треонином; группа аминокислот, имеющих амидосодержащие боковые цепи, представлена аспарагином и глутамином; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, представлена фенилаланином, тирозином и триптофаном; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, представлена лизином, аргинином и гистидином, и группа аминокислот, имеющих серосодержащие боковые цепи, представлена цистеином и метионином. Предпочтительными группами замен консервативных аминокислот являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминовая-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Как обсуждается в данном документе, второстепенные вариации в аминокислотных последовательностях антител или молекулах иммуноглобулинов подразумеваются как охватываемые настоящим изобретением, при условии, что вариации в аминокислотной последовательности сохраняют по меньшей мере 75%, предпочтительнее по меньшей мере 80, 90, 95% и наиболее предпочтительно 99%. В частности, подразумеваются замены консервативных аминокислот. Консервативные аминокислоты являются такими, которые происходят из семейства аминокислот, которые являются родственными по своим боковым цепям. Генетически кодируемые аминокислоты, в целом, разделяют на два семейства: (1) кислотные аминокислоты - аспартат, глутамат; (2) основные аминокислоты - лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярные аминокислоты - аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан и (4) незаряженные полярные аминокислоты - глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые являются алифатически гидроксильным семейством; (ii) аспарагин и глутамин, которые являются амидосодержащим семейством; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые являются алифатическим семейством, и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые являются ароматическим семейством. Например, целесообразно ожидать, что выделенная замена лейци-

на изолейцином или валином, аспартата глутаматом, треонина серином или сходная замена аминокислоты структурно родственной аминокислотой не будет оказывать значительного влияния на связывание или свойства получаемой молекулы, особенно если замена не вовлекает аминокислоту внутри каркасного сайта. Будет ли изменение аминокислоты влиять на функциональный пептид, легко может быть определено анализом специфической активности производного полипептида. Анализы подробно описаны в данном документе. Фрагменты или аналоги антител, или молекул иммуноглобулинов легко могут быть получены средним специалистом в данной области техники. Предпочитаемые амино- и карбоксиконцы фрагментов или аналогов встречаются возле границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены могут быть идентифицированы путем сравнения данных нуклеотидных и/или аминокислотных последовательностей с общедоступными или запатентованными последовательностями из баз данных. Предпочтительно, для идентификации мотивов последовательностей или ожидаемых белковых конформационных доменов, которые встречаются в других белках, известной структуры и/или функционирования, применяют компьютеризированные методы сравнения. Известны методы для идентификации белковых последовательностей, которые сворачиваются в известную трехмерную структуру. Bowie et al. *Science* 253:164 (1991). Таким образом, изложенные выше примеры демонстрируют, что специалисты в данной области техники могут распознавать мотивы последовательностей и структурные конформации, которые могут использоваться для определения структурных или функциональных доменов в соответствии с данным изобретением.

Предпочтительные аминокислотные замены - это те, которые: (1) снижают чувствительность к протеолизу, (2) снижают чувствительность к окислению, (3) изменяют аффинность связывания в отношении образования белковых комплексов, (4) изменяют аффинности связывания и (4) наделяют другими или модифицируют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов. Аналоги могут включать различные мутации последовательности, отличающейся от встречающейся в природе пептидной последовательности. Например, единственная или множество аминокислотных замен (предпочтительно замен консервативных аминокислот) могут быть сделаны во встречающейся в природе последовательности (предпочтительно в части полипептида за пределами домена(ов), образующих межмолекулярные контакты). Консервативная аминокислотная замена практически не должна изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислоты не должна способствовать разрыву спирали, которая происходит в исходной последовательности, или разрушать другие типы вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность). Примеры распознаваемых в данной области техники вторичных полипептидов и третичных структур описаны в *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W.H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)) и *Thornton et al. Nature* 354:105 (1991).

Термин "полипептидный фрагмент", как используется в данном документе, относится к полипептиду, который имеет аминоконцевую и/или карбоксиконцевую деление, но в котором оставшаяся аминокислотная последовательность является идентичной соответствующим положениям во встречающейся в природе последовательности, установленной, например, из полноразмерной последовательности кДНК. Фрагменты, как правило, составляют по меньшей мере 5, 6, 8 или 10 аминокислот в длину, предпочтительно по меньшей мере 14 аминокислот в длину, предпочтительнее по меньшей мере 20 аминокислот в длину, обычно по меньшей мере 50 аминокислот в длину и даже предпочтительнее по меньшей мере 70 аминокислот в длину. Термин "аналог", как используется в данном документе, относится к полипептидам, которые содержат сегмент по меньшей мере из 25 аминокислот, который имеет значительную идентичность с частью установленной аминокислотной последовательности и который обладает специфическим связыванием с HER2 в подходящих условиях связывания. Как правило, полипептидные аналоги содержат замену консервативной аминокислоты (или добавление или делецию) применительно к встречающейся в природе последовательности. Аналоги, как правило, содержат по меньшей мере 20 аминокислот в длину, предпочтительно по меньшей мере 50 аминокислот в длину или длиннее, и часто могут быть такой же длины, как полноразмерный встречающийся в природе полипептид.

Пептидные аналоги обычно применяются в фармацевтической промышленности, как небелковые лекарственные вещества со свойствами, аналогичными таким свойствам матричного пептида. Эти типы непептидного соединения называют "пептидными миметиками" или "пептидомиметиками". Fauchere, J. *Adv. Drug Res.* 15:29 (1986), Veber and Freidinger *TINS* p.392 (1985) и Evans et al. *J. Med. Chem.* 30:1229 (1987). Такие соединения часто разрабатывают с помощью компьютеризированного молекулярного моделирования. Пептидные миметики, которые структурно сходны с терапевтически полезными пептидами могут применяться для получения эквивалентного терапевтического или профилактического эффекта. В целом, пептидомиметики структурно сходны с образцовым полипептидом (т.е. полипептидом, который имеет биохимическое свойство или фармакологическую активность), таким как антитело человека, но имеет одну или более пептидных связей, необязательно замененных связью, выбранной из группы, состоящей из: --CH<sub>2</sub>NH--, --CH<sub>2</sub>S--, --CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>--, --CH=CH--(цис и транс), --COCH<sub>2</sub>--, CH(OH)CH<sub>2</sub>-- и -CH<sub>2</sub>SO--, хорошо известными в данной области техники способами. Систематическая замена одной или более аминокислот консенсусной последовательности D-аминокислотой того же типа (например, D-ли-

зин вместо L-лизина) может использоваться для создания более стабильного пептида. В дополнение к этому, стерически затрудненный пептид, содержащий консенсусную последовательность или практически идентичную вариацию консенсусной последовательности, могут создавать известными в данной области техники способами (Rizo and Gierasch *Ann. Rev. Biochem.* 61:387 (1992)); например, добавлением внутренних остатков цистеина, способных к образованию внутримолекулярных дисульфидных мостиков, которые циклизуют пептид.

Термин "средство" используют в данном документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологического материала.

Как используется в данном документе, термин "метка" или "меченый" относится к внедрению выявляемого маркера, например, путем внедрения радиоизотопно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду фрагмента биотина, который может выявляться маркированным авидином (например, стрептавидин, содержащий флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно выявлять оптическими или калориметрическими методами). В определенных ситуациях метка или маркер также может быть терапевтическим. В данной области техники хорошо известны и могут применяться различные методы введения метки в полипептиды и гликопротеины. Примеры меток для полипептидов включают, но не ограничиваются ими, следующее: радиоизотопы или радионуклиды (например,  $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}$ ,  $^{35}\text{S}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{99}\text{Tc}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, р-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминисцентные биотинилированные группы, предварительно определенные полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парами последовательностей лейциновой застежки-молнии, сайтами связывания вторичных антител, доменами связывания металлов, эпитопными маркерами). В некоторых вариантах реализации изобретения метки присоединяют с помощью спейсерных плечей различной длины для снижения потенциальных стерических препятствий. Термин "фармацевтическое средство или лекарственное вещество", как используется в данном документе, относится к химическому соединению или композиции, способной к индуцированию требуемого терапевтического эффекта при надлежащем введении пациенту.

Другие химические термины в данном документе применяют в соответствии с общепринятым использованием в данной области техники, как иллюстрируется словарем *The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (Parker S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

Как используется в данном документе, "практически чистый" означает, что целевой вид представлен преобладающим видом (т.е. на молярной основе он более распространен, чем любой другой отдельный вид в композиции), а предпочтительно практически очищенная фракция является композицией, причем целевой вид содержит по меньшей мере около 50% (на молярной основе) от всех присутствующих макромолекулярных видов.

В целом, практически чистая композиция будет содержать более чем около 80% от всех макромолекулярных видов, представленных в композиции, предпочтительнее более чем около 85, 90, 95 и 99%. Предпочтительнее всего целевой вид очищают до существенной гомогенности (загрязняющий вид не может быть выявлен в композиции традиционными методами выявления), причем композиция состоит по существу из единственного макромолекулярного вида.

Применение форм единственного числа как в следующем описании, так и в формуле изобретения, интерпретируется как охватывающее единственные и множественные формы, если только в данном документе не указано иное или нет четкого противоречия из контекста. Термины "составляющий", "имеющий", "представленный", в виде "представленный химической формулой", "включающий" и "содержащий" интерпретируются как неограничивающие термины (т.е. означающие "включающий, но не ограничивающийся"), если только не отмечается иное. Например, полимерный каркас определенной формулы включает все мономерные единицы, показанные в формуле, и также может включать дополнительные мономерные единицы, показанные в формуле. В дополнение к этому, когда бы в варианте реализации изобретения не применяли "составляющий" или другой неограничивающий термин, он должен пониматься так, что такой же вариант реализации изобретения может заявляться более узко с использованием промежуточного термина "состоящий по существу из" или ограничивающего термина "состоящий из".

Термин "около", "приблизительно" или "приближенно", если используется в связи с числовым значением, означает, что включен набор или диапазон значений. Например, "около X" включает диапазон значений, которые составляют  $\pm 20$ ,  $\pm 10$ ,  $\pm 5$ ,  $\pm 2$ ,  $\pm 1$ ,  $\pm 0,5$ ,  $\pm 0,2$  или  $\pm 0,1\%$  от X, где X представляет собой числовое значение. В одном варианте реализации изобретения термин "около" относится к диапазону значений, которые на 5% больше или меньше указанного значения. В другом варианте реализации изобретения термин "около" относится к диапазону значений, которые на 2% больше или меньше указанного значения. В другом варианте реализации изобретения термин "около" относится к диапазону значений, которые на 1% больше или меньше указанного значения.

Перечисление диапазонов значений исключительно предполагает выполнение функции сокращенного способа самостоятельного отношения к каждому отдельному значению, попадающему в данный диапазон, если только в данном документе не указано иное, а каждое отдельное значение включается в



описание, как если бы оно было самостоятельно указано в данном документе. Если не указано иное, используемый в данном документе диапазон включает два предела диапазона. Например, оба выражения "х является целым числом между 1 и 6" и "х является целым числом от 1 до 6" означают "х является 1, 2, 3, 4, 5 или 6", т.е. термин "между X и Y" и "диапазон от X до Y", являются включающими X и Y, и целые числа между ними.

Все способы, описанные в данном документе, могут выполняться в любом подходящем порядке, если только в данном документе не указано иное или нет четкого противоречия из контекста. Применение любого или всех примеров, или типовая формулировка (например, "такой как"), предложенная в данном документе, исключительно предназначено для лучшего иллюстрированию данного изобретения и не должно истолковываться как ограничение объема формулы изобретения, если только однозначно не заявляется иное. Ни одна формулировка в описании не должна истолковываться как указание, что не заявленный элемент является существенным для того, что заявляется.

"Молекула распознавания на основе белка" или "PBRM" относится к молекуле, которая распознает и связывается с маркером или рецептором клеточной поверхности, такой как трансмембранный белок, иммобилизованный поверхностный белок или протогликан. Примеры PBRM включают, но не ограничиваются ими, антитело XMT 1517, антитело XMT 1518, антитело XMT 1519 и антитело XMT 1520, описанные в данном документе, как были все другие антитела (например, трастузумаб, цетуксимаб, ритуксимаб, бевацизумаб, эпрутузумаб, велтузумаб, лабетузумаб, B7-H4, B7-H3, CA125, CD33, CXCR,2 EGFR, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, HER2, NaPi2b, c-Met, MUC-1, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, PD-L1-и-анти-5T4) и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, или пептиды (таргетирующие рецептор LHRH пептиды, пептид EC-1), липокалина, такие как, например, антикалина, белки, такие как, например, интерфероны, лимфокины, факторы роста, колониестимулирующие факторы и тому подобные, пептиды или пептидные имитаторы и тому подобные. Молекула распознавания на основе белка в дополнение к таргетингу конъюгата с модифицированным полимером, конъюгирующая со специфической клеткой, тканью или местом, может также обладать определенным терапевтическим эффектом, таким как антипролиферативная (цитостатическая и/или цитотоксическая) активность против клетки-мишени или механизма. Молекула распознавания на основе белка содержит или может быть сконструирована так, чтобы содержать по меньшей мере одну химически реакционноспособную группу, такую как, -COOH, первичный амин, вторичный амин, -NHR, -SH или химически реакционноспособный аминокислотный фрагмент или боковые цепи, такие как, например, тирозин, гистидин, цистеин или лизин.

"Биосовместимый", как используется в данном документе, предназначен для описания соединений, которые проявляют минимальные деструктивные или другие влияния в виде ответа организма, при приведении в контакт с жидкостями организма или живыми клетками, или тканями. Таким образом, биосовместимая группа, как используется в данном документе, относится к алифатическому, циклоалкильному, гетероалифатическому, гетероциклоалкильному, арильному или гетероарильному фрагменту, который попадает под определение термина биосовместимый, как определено выше и в данном документе. Термин "биосовместимость", как используется в данном документе, также подразумевает то, что соединения проявляют минимальные взаимодействия с белками распознавания, например, встречающимися в природе антителами, клеточными белками, клетками и другими компонентами биологических систем, если только такие взаимодействия являются особенно желательными. Таким образом, считается, что вещества и функциональные группы, предназначенные исключительно для обеспечения вышеуказанных минимальных взаимодействий, например лекарственных веществ и пролекарств, должны быть биосовместимыми. Предпочтительно (за исключением соединений, предполагаемых как цитотоксические, такие как, например, противоопухолевые средства), соединения являются "биосовместимыми", если их добавление к нормальным клеткам *in vitro* в концентрациях, сходных с предполагаемыми системными концентрациями *in vivo*, приводит к меньшей чем или равной 1% степени гибели клеток за период времени, требуемый для 50% от количества соединения, вводимого *in vivo* с учетом выделения/выведения), а их введение *in vivo* индуцирует минимальное и с медицинской точки зрения приемлемое воспаление, реакцию на введение чужеродного тела, иммунотоксичность, химическую токсичность и/или другие подобные неблагоприятные эффекты. В вышеприведенном предложении термин "нормальные клетки" относится к клеткам, которые не предназначены для разрушения или иным образом значительного воздействия подлежащим исследованию соединением.

"Биоразлагаемый". Как используется в данном документе, "биоразлагаемые" полимеры представляют собой полимеры, которые чувствительны к биологическому процессингу *in vivo*. Как используется в данном документе, "биоразлагаемые" соединения или фрагменты - это те, которые поглощаются клетками, могут разрушаться лизосомальным или другим химическим механизмом, или гидролизом на компоненты, которые клетки могут либо повторно использовать, либо высвободить без значительного токсического влияния на клетки. Термин "биоразщепляемый", как используется в данном документе, имеет то же значение "биоразлагаемый". Фрагменты деградации предпочтительно индуцируют слабую или не индуцируют перегрузку органов или клеток, или патологических процессов, вызванных такой перегрузкой или другие неблагоприятные эффекты *in vivo*. Примеры процессов биоразложения включают фер-

ментативный и неферментативный гидролиз, окисление и восстановление. Подходящие условия для неферментативного гидролиза биоразлагаемых конъюгатов белок-полимер-лекарственное вещество (или их компонентов, например, биоразлагаемый полимерный носитель и линкер между носителем и антителом или молекулой лекарственного вещества), описанные в данном документе, например, включают воздействие на биоразлагаемые конъюгаты воды при воздействии температуры и pH лизосомального внутриклеточного компартмента. Биоразложение некоторых конъюгатов белок-полимер-лекарственное вещество (или их компоненты, например, биоразлагаемый полимерный носитель и линкер между носителем и антителом или молекулой лекарственного вещества), также может усиливаться внеклеточным воздействием, например, в областях с низким pH в организме животных, например, в воспаленной области, в близком окружении активированных макрофагов или других клеток, высвобождающих факторы, способствующие разрушению. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения эффективный размер полимерного носителя при pH~7,5 не изменяется на выявляемом уровне в течение от 1 до 7 суток и сохраняет в пределах 50% оригинального размера полимера в течение по меньшей мере нескольких недель. С другой стороны, при pH~5 полимерный носитель предпочтительно выявляемо разрушается в течение от 1 до 5 суток и полностью превращается в фрагменты с низкой молекулярной массой в пределах временных рамок от двух недель до нескольких месяцев. Целостность полимера может измеряться в таких испытаниях как, например, эксклюзионной ВЭЖХ. Хотя в некоторых случаях может быть предпочтительным более быстрое разрушение, в общем, может быть более необходимым, чтобы полимер разрушался в клетках со скоростью, которая не превышает скорость метаболического превращения или экскреции фрагментов полимера клетками. В предпочтительных вариантах реализации изобретения полимеры и побочные продукты биodeградации являются биосовместимыми.

"Малеимидоблокирующее соединение". Как используется в данном документе, относится к соединению, которое может реагировать с малеимидом для превращения его в сукцинимид, и "малеимидоблокирующее соединение" относится к химическому фрагменту, присоединенному к сукцинимиду при его превращении. В некоторых вариантах реализации изобретения малеимидоблокирующее соединение представляет собой соединение, имеющее концевую тиольную группу для протекания реакции с малеимидом. В одном варианте реализации изобретения малеимидоблокирующее соединение представляет собой цистеин, N-ацетилцистеин, метиловый эфир цистеина, N-метилцистеин, 2-меркаптоэтанол, 3-меркаптопропионовую кислоту, 2-меркаптоуксусную кислоту, меркаптометанол (т.е. HOCH<sub>2</sub>SH), бензилтиол, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиол.

"Гидрофильный". Термин "гидрофильный", когда он относится к заместителям, например на полимерных мономерных единицах или на малеимидоблокирующем фрагменте для придания им гидрофильности или водорастворимости, по существу, не отличается от обычного значения этого термина в данной области техники и обозначает химический фрагмент, который содержит ионизируемые, полярные или поляризуемые атомы, или которые иным образом могут быть сольватированы молекулами воды. Таким образом, гидрофильная группа, как используется в данном документе, относится к алифатическому, циклоалкильному, гетероалифатическому, гетероциклоалкильному, арильному или гетероарильному фрагменту, который попадает под определение термина гидрофильный, как определено выше. Примеры конкретных гидрофильных органических фрагментов, которые являются пригодными, включают, без ограничения, алифатические или гетероалифатические группы, содержащие цепь атомов в диапазоне между около одним и двенадцатью атомами, гидроксил, гидроксилалкил, амин, карбоксил, амид, карбоксильный эфир, тиоэфир, альдегид, нитрил, изонитрил, нитрозо, гидроксилламин, меркаптоалкил, гетероцикл, карбаматы, карбоновые кислоты и их соли, сульфоновые кислоты и их соли, сложные эфиры сульфоновых кислот, фосфорные кислоты и их соли, сложные эфиры фосфатов, сложные эфиры полигликолей, полиамины, поликарбоксилаты, полиэфиры и политииоэфиры. В некоторых вариантах реализации изобретения гидрофильные заместители содержат карбоксильную группу (COOH), альдегидную группу (CHO), кетонную группу (COC<sub>1-4</sub> алкил), метиловый (CH<sub>2</sub>OH) или гликоль (например, СНОН-СН<sub>2</sub>ОН или СН-(СН<sub>2</sub>ОН)<sub>2</sub>), NH<sub>2</sub>, F, циано, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H и тому подобные.

Термин "гидрофильный", если он относится к полимеру, описанному в данном документе, в целом, не отличается от использования этого термина в данной области техники и обозначает полимеры, содержащие гидрофильные функциональные группы, как определено выше. В предпочтительном варианте реализации изобретения гидрофильный полимер представляет собой водорастворимый полимер. Гидрофильность полимера может быть непосредственно измерена посредством определения энергии гидратации или определением посредством исследования между двумя жидкими фазами, или хроматографией на твердых фазах с известной гидрофобностью, таких как, например, C4 или C18.

"Полимерный носитель". Термин "полимерный носитель", как используется в данном документе, относится к полимеру или модифицированному полимеру, который является пригодным для ковалентного присоединения к или может быть ковалентно присоединен к одной или более молекул лекарственного вещества с намеченным линкером и/или одним или более PBRM с намеченным линкером.

"Физиологические условия". Фраза "физиологические условия", как используется в данном документе, относится к диапазону химических (например, pH, ионная сила) и биохимических (например, концентрации ферментов) условий, которые вероятно имеют место во внеклеточных жидкостях живых

тканей. Для большинства нормальных тканей физиологические рН лежат в диапазоне около от 7,0 до 7,4. Циркулирующая плазма крови и нормальная межклеточная жидкость представляют типовые примеры нормальных физиологических условий.

"Лекарственное вещество". Как используется в данном документе, термин "лекарственное вещество" относится к соединению, которое является биологически активным и оказывает требуемый физиологический эффект после введения нуждающемуся субъекту (например, активный фармацевтический ингредиент).

"Цитотоксический". Как используется в данном документе, термин "цитотоксический" означает токсический для клеток или выбранной популяции клеток (например, раковых клеток). Токсический эффект может приводить к гибели и/или лизису клеток. В некоторых случаях токсический эффект может оказывать сублетально деструктивный эффект на клетку, например, замедлять или останавливать рост клеток. Для того чтобы достичь цитотоксического эффекта, лекарственное вещество или пролекарство может быть выбрано, среди прочего, из группы, состоящей из повреждающего ДНК средства или цитотоксического белка, или полипептида.

"Цитостатический". Как используется в данном документе, термин "цитостатический" относится к лекарственному веществу или другому соединению, которое ингибирует или останавливает рост и/или размножение клеток.

"Малая молекула". Как используется в данном документе, термин "малая молекула" относится к молекулам, либо встречающимся в природе, либо созданным искусственно (например, посредством химического синтеза), которые имеют относительно низкую молекулярную массу. Предпочтительные малые молекулы являются биологически активными благодаря тому, что они оказывают местное или системное воздействие на организм животных, предпочтительно млекопитающих, предпочтительнее людей. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения малая молекула представляет собой лекарственное вещество и малая молекула, называется как "молекула лекарственного вещества" или "лекарственное вещество", или "терапевтическое средство". В некоторых вариантах реализации изобретения молекула лекарственного вещества имеет ММ меньше или равную около 5 кДа. В других вариантах реализации изобретения молекула лекарственного вещества имеет ММ меньше или равную около 1,5 кДа. В вариантах реализации изобретения молекулу лекарственного вещества выбирают из алкалоидов барвинка, ауристатинов, дуокармицинов, тубулизинов, дуокармицинов, не встречающихся в природе соединений камптотецинов, ингибиторов топоизомераз, связывающих ДНК лекарственных веществ, ингибиторов киназ, ингибиторов МЕК, ингибиторов KSP, калихеамицинов, SN38, пирролобензодиазепинов и их аналогов. Предпочтительно, хоть и необязательно, лекарственное вещество является тем, которое уже признано безопасным и эффективным для применения соответствующим государственным агентством или органом, например FDA. Например, лекарственные вещества для медицинского применения, перечислены FDA в разделе Свода Федеральных законов 21 C.F.R. §§ 330.5, пункты от 331 до 361 и от 440 до 460; лекарственные вещества для ветеринарного применения, перечислены FDA в 21 C.F.R. §§ от 500 до 589, включенные в данный документ путем ссылки, все считаются подходящими для применения с настоящими гидрофильными полимерами.

"Производное лекарственного вещества" или "модифицированное лекарственное вещество" или тому подобное, как используется в данном документе, относится к соединению, которое содержит молекулу лекарственного вещества, предназначенную для доставки конъюгатом, описанным в данном документе, и функциональную группу, способную присоединять молекулу лекарственного вещества с полимерным носителем.

"Активная форма", как используется в данном документе, относится к форме соединения, которая проявляет предполагаемую фармацевтическую эффективность *in vivo* или *in vitro*. В частности, если молекула лекарственного вещества, предназначенная для доставки конъюгатом, описанным в данном документе, высвобождается из конъюгата, то активная форма может быть самим лекарственным веществом или его производным, которое проявляет предполагаемые терапевтические свойства. Высвобождение лекарственного вещества из конъюгата может достигаться расщеплением биоразрушаемой связи линкера, который присоединяет лекарственное вещество к полимерному носителю. Производные активного лекарственного вещества соответственно могут содержать часть линкера.

"РНФ" относится к поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметил-формалью).

Как используется в данном документе, термин "полимерная единица", "мономерная единица", "номер", "мономерная единица", "единица" - все относятся к повтору структурной единицы в полимере.

Как используется в данном документе, "молекулярная масса" или "ММ" полимера или полимерного носителя/каркаса или полимерных конъюгатов относится к массе средней молекулярной массы немодифицированного полимера, если только не указано иное.

Предполагается, что настоящее изобретение включает все изотопы атомов, встречающихся в настоящих соединениях. Изотопы включают такие атомы, имеющие одинаковый атомный номер, но различные числа масс. В качестве общего примера и без ограничения, изотопы атома водорода включают тритий и дейтерий. Изотопы углерода включают C-13 и C-14.

Предполагается, что настоящее изобретение включает все изомеры соединения, которое относится

к и включает оптические изомеры и таутомерные изомеры, причем оптические изомеры включают энантиомеры и диастереомеры, хиральные изомеры и нехиральные изомеры, а оптические изомеры включают выделенные оптические изомеры, а также смеси оптических изомеров, включающих рацемические и нерацемические смеси; при этом изомер может быть в выделенной форме или в смеси с одним или более другими изомерами.

Антитела против HER2.

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, обладают способностью ингибировать опосредованную HER2 активность механизма PI3K-Akt.

Типовые моноклональные антитела, описанные в данном документе, включают, например, антитело XMT 1517, антитело XMT 1518, антитело XMT 1519 и антитело XMT 1520. Эти антитела демонстрируют специфичность к HER2 человека, и было показано, что они ингибируют функциональную активность HER2 *in vitro*.

Каждое из моноклональных антител против HER2, описанных в данном документе, включает тяжелую цепь (HC), переменный участок тяжелой цепи (VH), легкую цепь (LC) и переменный участок легкой цепи (VL), как показано в аминокислотных последовательностях и соответствующих последовательностях нуклеиновых кислот, представленных ниже. Переменный участок тяжелой цепи и переменный участок легкой цепи для каждого антитела обозначен фоном в аминокислотных последовательностях ниже. Определяющие комплементарность участки (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, представленных ниже. Аминокислоты, охватывающие определяющие комплементарность участки (CDR), определены по E.A. Kabat et al. (См. Kabat E.A., et al. Sequences of Protein of immunological interest, Fifth Edition, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)).

>XMT 1517, аминокислотная последовательность тяжелой цепи (переменный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 9) + IgG1, константный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 32))

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV**  
**AVIWDGSGNKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**  
**KEAPYYAKDYMDVWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC**  
LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQT  
YICNVNIKPSNTKVDKKEPKSCDKTITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTL  
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV  
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR  
DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS  
KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\* (SEQ ID NO: 1)

CDRH1: FTFSSYGMH (SEQ ID NO: 17)

CDRH2: VIWDGSGNKYYADSVK (SEQ ID NO: 18)

CDRH3: EAPYYAKDYMDV (SEQ ID NO: 19)

>XMT 1517, последовательность нуклеиновой кислоты переменного участка тяжелой цепи

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTC  
CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTCAGTAGCTATGGCAT  
GCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTA  
TATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAGACTCCGTGAAGGGCCGA  
TTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAAC  
AGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTAATACTGCGCCAAGGAAGCTCC  
CTACTACGCTAAAGATTACATGGACGTATGGGGCAAGGGTACAACCTGTCA  
CCGTCTCCTCA (SEQ ID NO: 34)

>XMT 1517, аминокислотная последовательность легкой цепи (переменный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 10) + константный участок легкой цепи (SEQ ID NO:33))

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDYLAWYQQKPGQAPRLLIYG**  
**ASSRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYVSYWTFGGGT**  
**KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL**  
**QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK**  
**SFNRGEC (SEQ ID NO: 2)**

CDRL1: RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO: 20)

CDRL2: GASSRAT (SEQ ID NO: 21)

CDRL3: QQYVSYWT (SEQ ID NO: 22)

>XMT 1517, последовательность нуклеиновой кислоты переменного участка легкой цепи

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA  
 AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCGACTACTTA  
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT  
 GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTC  
 TGGGACAGACTTCACTCTACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC  
 AGTGTATTACTGTCAGCAGTACGTCAGTTACTGGACTTTTGCGGAGGGAC  
 CAAGGTTGAGATCAAA (SEQ ID NO: 35)

>XMT 1518, аминокислотная последовательность тяжелой цепи (переменный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 11) + IgG1, константный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 32))

**QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWV**  
**AGIWWDGSNEKYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA**  
**KEAPYYAKDYMDVWGKGTITVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC**  
**LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQT**  
**YICNVNIKPSNTKVDKKVEPKSCDKTIITCPPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL**  
**MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV**  
**VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR**  
**DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYS**  
**KLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\* (SEQ ID NO: 3)**

CDRH1: FTFSSYGMH (SEQ ID NO: 17)

CDRH2: GIWWDGSNEKYADSVKG (SEQ ID NO: 23)

CDRH3: EAPYYAKDYMDV (SEQ ID NO: 19)

>XMT 1518, аминокислотная последовательность легкой цепи (переменный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 12) + константный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 33))

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSDYLAWYQQKPGQAPRLLIYG**  
**ASRRATGIPDRFSGSGGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYVSYWTFGGGT**  
**KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL**  
**QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK**  
**SFNRGEC (SEQ ID NO: 4)**

CDRL1: RASQSVSSDYLA (SEQ ID NO: 20)

CDRL2: GASRRAT (SEQ ID NO: 24)

CDRL3: QQYVSYWT (SEQ ID NO: 22)

>XMT 1519, аминокислотная последовательность тяжелой цепи (переменный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 13) + IgG1, константный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 32))

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVS**  
**YISSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG**  
**HGYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE**  
 PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
 PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
 TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  
 SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
 WQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\* (SEQ ID NO: 5)

CDRH1: FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 25)

CDRH2: YISSSSTIYYADSVKGR (SEQ ID NO: 26)

CDRH3: GGHGYFDL (SEQ ID NO: 27)

>XMT 1519, последовательность нуклеиновой кислоты варибельного участка тяжелой цепи

GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTC  
 CCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATAGCAT  
 GAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTTTCATACA  
 TTAGTAGTAGTAGTAGTACCATATACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGAT  
 TCACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAAGTCACTGTATCTGCAAATGAAC  
 AGCCTGAGAGCTGAGGACACGGCGGTGTACTACTGCGCCAGAGGTGGACA  
 CGGATATTTTCGACCTATGGGGGAGAGGTACCTTGGTCACCGTCTCCTCA  
 (SEQ ID NO: 36)

>XMT 1519, аминокислотная последовательность легкой цепи (варибельный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 14) + константный участок легкой цепи (SEQ ID NO:33))

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG**  
**ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYHHSPLTFFGGG**  
**TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA**  
 LQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
 KSFNRGEC (SEQ ID NO: 6)

CDRL1: RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28)

CDRL2: GASSRAT (SEQ ID NO: 21)

CDRL3: QQYHHSPLT (SEQ ID NO: 29)

>XMT 1519, последовательность нуклеиновой кислоты варибельного участка легкой цепи

GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAA  
 AGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAGCAGCTACTTA  
 GCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCTATGGT  
 GCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGGGTC  
 TGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGC  
 AGTGTATTACTGTCAGCAGTACCACCACAGTCCTCTCACTTTTGGCGGAGG  
 GACCAAGGTTGAGATCAAAA (SEQ ID NO: 37)

>XMT 1520, аминокислотная последовательность тяжелой цепи (варибельный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 15) + IgG1, константный участок тяжелой цепи (SEQ ID NO: 32))

**EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGRSMNWVRQAPGKGLEWVS  
YISDSRTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG  
HGYFDLWGRGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE  
PVTVSWNSGALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHK  
PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV  
TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH  
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV  
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR  
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG\* (SEQ ID NO: 7)**

CDRH1: FTFSGRSMN (SEQ ID NO: 30)

CDRH2: YISDSRTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 31)

CDRH3: GGHGYFDL (SEQ ID NO: 27)

>XMT 1520, аминокислотная последовательность легкой цепи (вариабельный участок легкой цепи (SEQ ID NO: 16) + константный участок легкой цепи (SEQ ID NO:33))

**EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYG  
ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQYHHSPLTFGGG  
TKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA  
LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVT  
KSFNRGEC (SEQ ID NO: 8)**

CDRL1: RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28)

CDRL2: GASSRAT (SEQ ID NO: 21)

CDRL3: QQYHHSPLT (SEQ ID NO: 29)

В данное изобретение также включены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с таким же эпитопом или перекрестно конкурируют за связывание с таким же эпитопом, что и антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе. Например, антитела и антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, специфически связываются с HER2, причем антитело или фрагмент связывается с эпитопом, который включает один или более аминокислотных остатков на HER2 человека (например, № P04626.1 в базе данных GenBank).

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, специфически связываются с эпитопом на полноразмерном рецепторе HER2 человека, содержащем аминокислотную последовательность

039374

1 MELAALCRWG LLLALLPPGA ASTQVCTGTD MKLRLPASPE  
THLDMLRHLY

51 QGCQVVQGNL ELTYLPTNAS LSFLQDIQEV QGYVLIHNSQ  
VRQVPLQRLR

101 IVRGTQLFED NYALAVLDNG DPLNNTTPVT GASPGLREL  
QLRSLTEILK

151 GGVLIQRNPQ LCYQDTILWK DIFHKNNQLA LTLIDTNSR  
ACHPCSPMCK

201 GSRCWGESSE DCQSLTRTVC AGGCARCKGP LPTDCCHEQC  
AAGCTGPKHS

251 DCLACLHFNH SGICELHCPA LVTYNTDTFE SMPNPEGRYT  
FGASCVTACP

301 YNYLSTDVGS CTLVCPLHNQ EVTAEDGTQR CEKCSKPCAR  
VCYGLGMEHL

351 REVRAVTSAN IQEFAGCKKI FGSLAFLPES FDGD PASNTA  
PLQPEQLQVF

401 ETLEEITGYL YISAWPDSLP DLSVFQNLQV IRGRILHNGA YSLTLQGLGI

451 SWLGLRSLRE LGSGLALIIH NTHLCFVHTV PWDQLFRNPH  
QALLHTANRP



501 EDECVGEGLA CHQLCARGHC WPGPTQCVN CSQFLRGQEC  
VEECRVLQGL

551 PREYVNARHC LPCHPECQPQ NGSVTCFGPE ADQCVACAHY  
KDPPFCVARC

601 PSGVKPDLSY MPIWKFPDEE GACQPCPINC THSCVDLDDK  
GCPAEQRASP

651 LTSIISAVVG ILLVVVLGVV FGILIKRRQQ KIRKYTMRRL LQETELVEPL

701 TPSGAMPNQA QMRILKETEL RKVKVLGSGA FGTVYKGIWI  
PDGENVKIPV

751 AIKVLRENTS PKANKEILDE AYVMAGVGSP YVSRLLGICL  
TSTVQLVTQL

801 MPYGCLLDHV RENRGLGSQ DLLNWCMIQA KGMSYLEDVR  
LVHRDLAARN

851 VLVKSPNHVK ITDFGLARLL DIDETEHAD GGKVIKWMA  
LESILRRRFT

901 HQSDVWSYGV TVWELMTFGA KPYDGIPARE IPDLLEKGER  
LPQPPICTID

951 VYMIMVKCWM IDSECRPRFR ELVSEFSRMA RDPQRFVVIQ  
NEDLGPASPL

1001 DSTFYRSLLE DDDMGDLVDA EEYLVPPQGF FCPDPAPGAG  
GMVHHRHRSS

1051 STRSGGDLT LGLEPSEEEA PRSPLAPSEG AGSDVFDGDL  
GMGAAKGLQS

1101 LPTHDPSPQL RYSEDPTVPL PSETDGYVAP LTCSPQPEYV  
NQPDVRPQPP

1151 SPREGPLPAA RPAGATLERP KTLSPGKNGV VKDVFAFGGA  
VENPEYLTPQ

1201 GGAAPQPHPP PAFSPAFDNL YYWDQDPPER GAPPSTFKGT  
PTAENPEYLG

1251 LDVPV (SEQ ID NO: 38)

Антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, описанные в данном документе, специфически связываются с эпитопом на внеклеточном домене (ECD) рецептора HER2 человека, содержащем аминокислотную последовательность

1 TQVCTGTDKMK LRLPASPETH LDMLRHL YQG CQVVQGNLEL  
TYLPTNASLS

51 FLQDIQEVQG YVLIAHNQVR QVPLQRLRIV RGTQLFEDNY  
ALAVLDNGDP

101 LNNTPVTGA SPGGLRELQL RSLTEILKGG VLIQRNPQLC YQDTILWKDI

151 FHKNNQLALT LIDTNRSRAC HPCSPMCKGS RCWGESSEDC  
QSLTRTV CAG

201 GCARCKGPLP TDCCHEQCAA GCTGPKHSDC LACLHFNHSG  
ICELHCPALV

251 TYNTDTFESM PNPEGRYTFG ASCVTACPYN YLSTDVGSCT  
LVCPLHNQEV

301 TAEDGTQRCE KCSKPCARVC YGLGMEHLRE VRAVTSANIQ  
EFAGCKKIFG

351 SLAFLPESFD GDPASNTAPL QPEQLQVFET LEEITGYLYI SAWPDSL PDL

401 SVFQNLQVIR GRILHNGAYS LTLQGLGISW LGLRSLRELG SGLALIHNT

451 HLCFVHTVPW DQLFRNPHQA LLHTANRPED ECVGEG LACH  
QLCARGHCWG

501 PGPTQCVNCS QFLRGQECVE ECRVLQGLPR EYVNARHCLP  
CHPECQPQNG

551 SVTCFGPEAD QCVACAHYKD PPFVCVARCPS GVKPDL SYMP  
IWKFPDEEGA

601 CQPCPINCTH SCVDLDDKGC PAEQRASPLT (SEQ ID NO: 39)

Специалисту в данной области техники будет ясно, что без ненужного проведения экспериментов существует возможность для определения того, имеет ли моноклональное антитело такую же специфичность, что и моноклональное антитело, описанное в данном документе (например, XMT 1517, XMT 1518, XMT 1519 и XMT 1520) путем определения того, предотвращает ли первое антитело связывание последнего с природным партнером связывания или другой молекулой, известной как ассоциирующаяся с HER2. Если исследуемое моноклональное антитело конкурирует с моноклональным антителом, описанным в данном документе, как показано путем уменьшения связывания моноклональным антителом, описанным в данном документе, тогда оба моноклональных антитела связываются с таким же или близко родственным эпитопом.

Альтернативный способ для определения того, имеет ли моноклональное антитело специфичность моноклонального антитела, описанного в данном документе, заключается в предварительном инкубировании моноклонального антитела, описанного в данном документе, с растворимым HER2 (с которым оно является нормально реактивным) и последующем добавлении моноклонального антитела, исследуемого в отношении определения того, ингибируется ли исследуемое моноклональное антитело в отношении своей способности связывания HER2. Если исследуемое моноклональное антитело ингибируется, тогда, по всей вероятности, оно имеет такую же или функционально эквивалентную эпитопную специфичность, как моноклональное антитело, описанное в данном документе.

Скрининг моноклональных антител, описанных в данном документе, также может выполняться, например, путем измерения опосредованного HER2 механизма активности PI3K-Akt и определения того, способно ли моноклональное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, снижать, антагонизировать, нейтрализовать или иным образом нарушать активность механизма PI3K-Akt.

Антитела против HER2 создаются, например, с использованием способов, описанных в примерах, предложенных в данном документе. В альтернативном варианте или в дополнение к этому, для получе-

ния моноклональных антител, направленных против HER2 или против производных, фрагментов, аналогов их гомологов или ортологов, могут использоваться различные процедуры, известные в пределах данной области техники. (См., например, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow E., and Lane D., 1988, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, включенную в данный документ путем ссылки). Полностью человеческие антитела представляют собой молекулы антител, в которых целая последовательность как легкой, так и тяжелой цепи, включая CDR, образованы из человеческих генов. Такие антитела в данном документе называют "антителами человека" или "полностью человеческими антителами". Моноклональные антитела человека получают, например, с использованием методик, описанных в примерах, предложенных в данном документе. Моноклональные антитела человека также можно получать путем использования триомной методики; гибридомной методики с В-клетками человека (см. Kozbor et al., 1983 *Immunol. Today* 4: 72) и гибридомной методики EBV для получения моноклональных антител человека (см. Cole et al., 1985 в: *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96). Моноклональные антитела человека могут применяться и могут получаться путем использования гибридом человека (см. Cote et al., 1983. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 2026-2030) или путем трансформации В-клеток человека вирусом Эпштейна-Барр *in vitro* (see Cole et al., 1985 в *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96).

Антитела очищают хорошо известными методиками, такими как аффинная хроматография с использованием белка А или белка G, которая главным образом обеспечивает получение фракции IgG иммунной сыворотки. Впоследствии или в альтернативном варианте, специфический антиген, который является мишенью искомого иммуноглобулина, или его эпитопа, может быть иммобилизован на колонке для очистки иммуноспецифического антитела путем иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов обсуждается, например, в статье D. Wilkinson (*The Scientist*, опубликованной The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Моноклональные антитела, которые модулируют, блокируют, ингибируют, снижают, антагонизируют, нейтрализуют или иным образом нарушают активность опосредованного HER2 механизма PI3K-Акт, получают, например, путем иммунизации животного мембраносвязанным и/или растворимым HER2, таким как, например, мышинный, крысиный или человеческий HER2, или его иммуногенный фрагмент, производное или вариант. В альтернативном варианте животное иммунизируют клетками, трансфицированными вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую HER2, таким образом, что HER2 экспрессируется и ассоциируется с поверхностью трансфицированных клеток. В альтернативном варианте антитела получают путем скрининга библиотеки, которая содержит последовательности антитела или антигенсвязывающего домена, на связывание с HER2. Данную библиотеку получают, например, на бактериофаге в виде белков или пептидов слияния с белком оболочки бактериофага, который экспрессируется на поверхности собранных фаговых частиц, кодирующих ДНК последовательности, содержащиеся внутри фаговых частиц (т.е. "библиотека фагового дисплея"). Гибридомы, получающиеся из слияния миеломных/В-клеток, затем подвергают скринингу на реактивность к HER2. В дополнение к этому, антитела отбирают и, необязательно, оптимизируют, в дрожжевых библиотеках-дисплеях антител и дрожжевых системах презентации библиотек, как описано, например, в Blaise L., Wehnert A., Steukers M.P., van den Beucken T., Hoogenboom H.R., Hufton S.E. Construction and diversification of yeast cell surface displayed libraries by yeast mating: application to the affinity maturation of Fab antibody fragments. *Gene*. 2004 Nov 24;342(2):211-8; Boder E.T., Wittrup K.D. Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries. *Nat. Biotechnol.* 1997 Jun; 15(6):553-7; Kuroda K., Ueda M. Cell surface engineering of yeast for applications in white biotechnology. *Biotechnol. Lett.* 2011 Jan; 33(1):1-9. DOI: 10.1007/s10529-010-0403-9. Обзор: Lauer T.M., Agrawal N.J., Chennamsetty N., Egodage K., Helk B., Trout B.L. Developability index: a rapid *in silico* tool for the screening of antibody aggregation propensity. *J. Pharm. Sci.* 2012 Jan; 101(1): 102-15; Orcutt K.D. and Wittrup K.D. (2010), 207-233 DOI: 10.1007/978-3-642-01144-315; Rakestraw J.A., Aird D., Aha P.M., Baynes B.M., Lipovsek D. Secretion-and-capture cell-surface display for selection of target-binding proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 2011 Jun; 24(6):525-30; патенты США № 8258082; 6300064; 6696248; 6165718; 6500644; 6291158; 6291159; 6096551; 6368805; 6500644. Типовые дрожжевые системы презентации библиотек описаны, например, в WO 2008118476; WO 2009/036379; WO 2010105256 и WO 2012009568. В некоторых вариантах реализации изобретения такие дрожжевые библиотеки-дисплеи или дрожжевые системы презентации библиотек направлены на имитацию или отображение характеристики разнообразия предиммунного репертуара антител человека. В некоторых вариантах реализации изобретения такое разнообразие дрожжевой библиотеки-дисплея или разнообразие дрожжевой системы презентации библиотеки создают *in silico*. В некоторых вариантах реализации изобретения такие дрожжевые библиотеки-дисплеи или дрожжевые системы презентации библиотек содержат дрожжевые клетки *Saccharomyces*, такие как клетки *Saccharomyces cerevisiae*. В некоторых вариантах реализации изобретения такие дрожжевые библиотеки-дисплеи или дрожжевые системы презентации библиотек содержат дрожжевые клетки *Saccharomyces*, такие как клетки *Saccharomyces cerevisiae*.

Моноклональные антитела получают, например, с использованием гибридомных методов, таких как описанные Kohler and Milstein, *Nature*, 256:495 (1975). В гибридном методе, мышью, хомяком или другое соответствующее животное-хозяин, как правило, иммунизируют с помощью иммунизирующего

агента для выявления лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически связываться с данным иммунизирующим агентом. В альтернативном варианте, лимфоциты могут быть иммунизированы *in vitro*.

Иммунизирующее средство, как правило, будет включать белковый антиген, его фрагмент или его белок слияния. В целом, применяют любые периферические лимфоциты крови, если требуются клетки человеческого происхождения, или применяют клетки селезенки или клетки лимфатических узлов, если требуются источники нечеловеческих млекопитающих. Затем лимфоциты сливают с линией immortalized клеток с использованием подходящих средств для слияния, таких как полиэтиленгликоль, с образованием гибридных клеток (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Линиями immortalized клеток обычно трансформируют клетки млекопитающих, в частности миеломные клетки, происходящие из организма грызуна, быка или человека. Обычно применяют линии миеломных клеток крысы или мыши. Гибридные клетки могут культивироваться в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или более веществ, которые ингибируют рост или выживание неслитых immortalized клеток. Например, если у исходных клеток отсутствует гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), то культуральная среда будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин ("среда ГАТ"), причем данные вещества предотвращают рост HGPRT-дефицитных клеток.

Предпочтительными линиями immortalized клеток являются те, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень экспрессии антитела отобранными продуцирующими антитело клетками и чувствительны к среде, такой как среда ГАТ. Более предпочтительными линиями immortalized клеток являются мышинные миеломные линии, которые могут быть получены, например, из Центра распределения клеток института Солка, г. Сан-Диего, штат Калифорния, и Американской коллекции типовых культур, г. Манассас, штат Вирджиния. Линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека также были описаны в отношении продукции моноклональных антител (см. Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York, (1987) pp. 51-63)).

Культуральную среду, в которой культивировали гибридные клетки, затем могут проанализировать на присутствие моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно, специфичность связывания моноклональных антител, продуцированных гибридными клетками, определяют иммунопреципитацией или анализом связывания *in vitro*, таким как радиоиммунный анализ (РИА) или твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА). Такие методики и анализы известны в данной области техники. Аффинность связывания моноклонального антитела может, например, определяться анализом Скэтчарда по Munson and Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980). Более того, в терапевтических применениях моноклональных антител важным является идентификация антител, имеющих высокую степень специфичности и высокую аффинность связывания с антигеном-мишенью.

После идентификации требуемых гибридных клеток клоны могут субклонировать процедурами предельного разведения и выращивания стандартными способами (см. Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, (1986) pp. 59-103). Подходящая культуральная среда для этой цели включает, например, среду Игла в модификации Дульбекко и среду RPMI-1640. В альтернативном варианте гибридные клетки могут выращивать *in vivo* в виде асцитных клеток в организме млекопитающего.

Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, могут выделять или очищать из культуральной среды или асцитной жидкости традиционными процедурами очистки иммуноглобулинов, такими как, например, сефарозой с белком А, хроматографией на гидроксипатите, гель-электрофорезом, диализом или аффинной хроматографией.

Моноклональные антитела также могут получать методами рекомбинантных ДНК, такими как описанные в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующие моноклональные антитела, описанные в данном документе, могут легко выделять и секвенировать с использованием традиционных методик (например, путем использования олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышинных антител). Гибридные клетки, описанные в данном документе, служат предпочтительным источником таких ДНК. Сразу после выделения ДНК могут помещать в экспрессионный вектор, который затем трансфецируют в клетки-хозяева, такие как обезьяньи COS клетки, клетки яичника китайского хомячка (СНО) или миеломные клетки, которые иначе не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для обеспечения синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также могут модифицировать, например, заменой кодирующей последовательности на константные домены тяжелой и легкой цепей человека вместо гомологичных мышинных последовательностей (см. патент США № 4816567; Morrison, *Nature* 368, 812-13 (1994)) или ковалентным соединением кодирующей последовательности иммуноглобулина, всей или части, с кодирующей последовательностью полипептида неиммуноглобулина. В таком полипептиде неиммуноглобулина могут быть замены на константные домены антитела, описанного в данном документе, или могут быть замены на вариабельные домены одного антиген-комбинирующего сайта антитела, описанного в данном документе, для создания химерного бивалентного антитела.

Моноклональные антитела, описанные в данном документе, включают полностью человеческие ан-

титела или гуманизированные антитела.

Данные антитела пригодны для введения людям, не вызывая в организме человека иммунного ответа против введенного иммуноглобулина.

Гуманизированное или полностью человеческое антитело против HER2 получают, например, с использованием процедур, описанных в примерах, предложенных в данном документе.

В других альтернативных способах антитело против HER2 разрабатывают, например, с использованием методов фагового дисплея с использованием антител, содержащих лишь последовательности человека. Такие подходы хорошо известны в данной области техники, например, в WO 92/01047 и патенте США № 6521404, которые тем самым включены путем ссылки. В данном подходе комбинаторную библиотеку фага, несущую случайные пары легкой и тяжелой цепей, подвергают скринингу с использованием природного или рекомбинантного источника HER2 или его фрагментов. В другом подходе антитело против HER2 могут получать процессом, в котором по меньшей мере одна стадия процесса включает иммунизацию трансгенного нечеловеческого животного белком HER2 человека. В данном подходе некоторые из эндогенных локусов тяжелой и/или легкой цепи к этого ксеногенного нечеловеческого животного были отключены и не способны к перестановке, требуемой для образования генов, кодирующих иммуноглобулины в ответ на антиген. В дополнение к этому в организм животного был стабильно трансфицирован по меньшей мере один локус тяжелой цепи человека и по меньшей мере один локус легкой цепи человека. Таким образом, в ответ на введенный антиген локусы человека претерпевают перестановку с получением генов, кодирующих вариабельные участки человека, иммуноспецифические к антигену. Поэтому при иммунизации ксеногенная мышь продуцирует В-клетки, которые секретируют полностью человеческий иммуноглобулин.

Для получения ксеногенных нечеловеческих животных в данной области техники хорошо известны разнообразные методики. Например, см. патенты США № 6075181 и 6150584, которые тем самым включены в полном объеме путем ссылки. Данная общая стратегия была продемонстрирована в связи с созданием первых штаммов XenoMouse™, как опубликовано в 1994 г. См. статью Green et al. *Nature Genetics* 7:13-21 (1994), которая тем самым включена в полном объеме путем ссылки. См. также патенты США № 6162963, 6150584, 6114598, 6075181 и 5939598 и японские патенты № 3068180 B2, 3068506 B2 и 3068507 B2, европейский патент № EP 0463151 B1 и международные заявки на патент № WO 94/02602, WO 96/34096, WO 98/24893, WO 00/76310 и родственные документы семейства патентов-аналогов.

В альтернативном подходе другие авторы использовали подход "минилокуса", в котором экзогенный локус Ig имитировали посредством включения частей (отдельных генов) из локуса Ig. Таким образом, один или более генов V<sub>H</sub>, один или более генов D<sub>H</sub>, один или более генов J<sub>H</sub>, константный участок мю и второй константный участок (предпочтительно константный участок γ) оформляют в конструкцию для инсерции в организм животного. См., например, патенты США № 5545806; 5545807; 5591669; 5612205; 5625825; 5625126; 5633425; 5643763; 5661016; 5721367; 5770429; 5789215; 5789650; 5814318; 5877397; 5874299; 6023010 и 6255458; европейский патент № 0546073 B1 и международные заявки на патент № WO 92/03918, WO 92/22645, WO 92/22647, WO 92/22670, WO 93/12227, WO 94/00569, WO 94/25585, WO 96/14436, WO 97/13852 и WO 98/24884 и родственные документы семейства патентов-аналогов.

Также было продемонстрировано образование антител человека из организма мыши, в котором посредством микроклеточного слияния были внедрены большие части хромосом или целые хромосомы. См. европейские заявки на патент № 773288 и 843961.

Ответы в виде антимышиных антител человека (НАМА) привели к созданию промышленного подхода для получения химерных или иных гуманизированных антител. В то время как химерные антитела имеют константный участок человека и иммунный вариабельный участок, то ожидается, что будут наблюдаться определенные ответы в виде антихимерных антител человека (НАСА), в частности при длительных или мультидозовых применениях данного антитела. Таким образом, может быть необходимым предоставить полностью человеческие антитела против HER2 для того чтобы разрушить или иным образом ослабить проблемы или влияния, связанные с ответом НАМА или НАСА.

Получение антител со сниженной иммуногенностью также выполняется через гуманизацию, химеризацию и методики дисплеев с использованием подходящих библиотек. Следует учитывать, что мышинные антитела или антитела других видов могут быть гуманизированы или приматизированы с использованием хорошо известных в данной области техники методик. См., например, Winter and Harris *Immunol. Today* 14:43-46 (1993) и Wright et al. *Crit. Reviews in Immunol.* 12:125-168 (1992). Интересующие антитела могут конструировать методиками рекомбинантных ДНК для замены доменов CH1, CH2, CH3, шарнирных и/или каркасных доменов соответствующей последовательностью человека (см. WO 92102190 и патенты США № 5530101; 5585089; 5693761; 5693792; 5714350 и 5777085). Также в данной области техники известно применение кДНК Ig для конструкции химерных иммуноглобулиновых генов (Liu et al. *P.N.A.S.* 84:3439 (1987) и *J. Immunol.* 139:3521 (1987)). Выделяют из гибридомной или другой клетки, продуцирующей антитело, мРНК и применяют ее для получения кДНК. Интересующую кДНК могут амплифицировать полимеразной цепной реакцией с использованием специфических праймеров (пат.

США № 4683195 и 4683202). В альтернативном варианте библиотеку создают и подвергают скринингу для выделения интересующей последовательности. Последовательность ДНК, кодирующую вариабельный участок антитела, затем сливают с последовательностями константных участков человека. Последовательности генов константных участков человека могут быть найдены в Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of immunological Interest, публикация N.I.H. № 91-3242. Гены С-участка человека легко доступны из известных клонов. Выбор изоформа будет обусловлен требуемыми эффекторными функциями, такими как связывание комплемента или активность антителозависимой клеточной нитотоксичности. Предпочтительными изоформами являются IgG1, IgG3 и IgG4. Может использоваться любой из константных участков легкой цепи человека,  $\kappa$  или  $\lambda$ . Затем химерное гуманизованное антитело экспрессируют традиционными способами.

Фрагменты антител, такие как Fv, F(ab')<sub>2</sub> и Fab, могут получать расщеплением интактного белка, например, протеазами или химическим расщеплением. В альтернативном варианте, конструируют усеченный ген. Например, химерный ген, кодирующий часть фрагмента F(ab')<sub>2</sub>, может включать последовательности ДНК, кодирующие домен СН1 и шарнирный участок Н-цепи, с последующим стоп-кодоном трансляции для получения усеченной молекулы.

Консенсусные последовательности Н и L J-участков могут применяться для конструирования олигонуклеотидов для применения в качестве праймеров для внедрения полезных сайтов рестрикции в J-участок для последующего связывания сегментов V-участка с сегментами С-участка человека. С-участок кДНК могут модифицировать в аналогичном положении в последовательности человека сайт-направленным мутагенезом по месту сайта рестрикции.

Экспрессионные векторы включают плазмиду, ретровирусы, YAC, полученные из EBV эписомы и тому подобное. Удобный вектор является вектором, который кодирует функционально полную последовательность СН или СL иммуноглобулинов человека с соответствующими сайтами рестрикции, сконструированными таким образом, чтобы любая последовательность VH или VL могла легко быть вставлена и экспрессировалась. В таких векторах сплайсинг обычно происходит между донорным сплайс-сайтом во вставленном J-участке и акцепторным сплайс-сайтом, предшествующим С-участку человека, а также в сплайс-участках, которые встречаются в пределах экзонов СН человека. Полиаденилирование и терминация транскрипции происходит в нативных хромосомных сайтах за кодирующими участками в направлении считывания. Получаемое химерное антитело могут соединять с любым сильным промотором, включающим ретровирусные LTR, например ранний промотор SV-40, (Okayama et al. Mol. Cell. Bio. 3:280 (1983)), LTR вируса саркомы Рауса (Gorman et al. P.N.A.S. 79:6777 (1982)) и LTR вируса мышинного лейкоза Молони (Grosschedl et al. Cell 41:885 (1985)). Также, следует отметить, что могут применяться нативные промоторы Ig и тому подобное.

Дополнительно, антитела человека или антитела других видов могут быть получены посредством технологий дисплейного типа, включая, без ограничения, фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомальный дисплей и другие методики, с использованием методик, хорошо известных в данной области техники, и получаемые молекулы могут подвергаться дополнительному созреванию, такому как созревание аффинности, так как подобные методики хорошо известны в данной области техники. Wright et al. Crit. Reviews in Immunol. 12:125-168 (1992), Hanes and Pluckthun PNAS USA 94:4937-4942 (1997) (рибосомальный дисплей), Parmley and Smith Gene 73:305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott, TIBS, vol. 17:241-245 (1992), Cwirla et al. PNAS USA 87:6378-6382 (1990), Russel et al. Nucl. Acids Research 21:1081-1085 (1993), Hoganboom et al. Immunol. Reviews 130:43-68 (1992), Chiswell и McCafferty TIBTECH; 10:80-8A (1992) и патент США № 5733743. Если технологии дисплеев применяются для получения антител, которые не являются человеческими, такие антитела могут быть гуманизованы как описано выше.

При использовании этих методик антитела могут быть созданы к экспрессирующим HER2 клеткам, растворимым формам HER2, их эпитомам и пептидам, и к их экспрессионным библиотекам (см., например, патент США № 5703057), которые после этого могут пройти скрининг, как описано выше, на виды активности, описанные в данном документе.

Антитела против HER2, описанные в данном документе, могут экспрессироваться вектором, содержащим сегмент ДНК, кодирующий одноцепочечное антитело, описанное выше.

Эти методики могут включать применение векторов, липосом, голой ДНК, сопровождаемой адьювантом ДНК, генной пушки, катетеров и т.п. Векторы включают химические конъюгаты, такие как описанные в WO 93/64701, который имеет таргетирующий фрагмент (например, лиганд к рецептору клеточной поверхности) и связывающий нуклеиновую кислоту фрагмент (например, полилизин), вирусный вектор (например, вирусный вектор ДНК или РНК), белки слияния, такие как описаны в PCT/US 95/02140 (WO 95/22618), которые представляют собой белок слияния, содержащий фрагмент-мишень (например, антителоспецифический для клетки-мишени) и связывающий нуклеиновую кислоту фрагмент (например, протамин), плазмиду, фаг и т.п. Векторы могут быть хромосомными, нехромосомными или синтетическими.

Предпочтительные векторы включают вирусный вектор, гибридные белки и химические конъюгаты. Ретровирусные векторы включают вирус мышинного лейкоза Молони. Предпочтительными являются вирусные ДНК-векторы. Данные векторы включают векторы на основе вируса оспы, такие как векторы

ортопокс и авипокс, векторы на основе вируса герпеса, такой как вектор на основе вируса простого герпеса, типа I (ВПГ) (см. Geller A.I. et al., *J. Neurochem*, 64:487 (1995); Lim F. et al., в *DNA Cloning: Mammalian Systems*, D. Glover, Ed. (Oxford Univ. Press, Oxford England) (1995); Geller A.I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci.: U.S.A.* 90:7603 (1993); Geller A.I. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 87:1149 (1990), аденовирусные векторы (см. LeGal LaSalle et al., *Science*, 259:988 (1993); Davidson et al., *Nat. Genet* 3:219 (1993); Yang et al., *J. Virol.* 69:2004 (1995) и аденоассоциированные вирусные векторы (см. Kaplitt M.G. et al., *Nat. Genet.* 8:148(1994).

Вирусные покс-векторы внедряют ген в цитоплазму клеток. Вирусные авипокс-векторы приводят только к кратковременной экспрессии нуклеиновой кислоты. Аденовирусные векторы, аденоассоциированные вирусные векторы и вектор на основе вируса простого герпеса (ВПГ) являются предпочтительными для внедрения нуклеиновой кислоты в нервные клетки. Аденовирусный вектор приводит только к кратковременной экспрессии (около 2 месяцев), затем следует аденоассоциированный вирус (около 4 месяцев), который в свою очередь действует меньше, чем векторы ВПГ. Конкретный выбранный вектор будет зависеть от клеточных мишеней и патологического состояния, требующего лечения. Внедрение может выполняться стандартными методиками, например инфекцией, трансдукцией или трансформацией. Примеры способов переноса генов включают применение, например, голой ДНК, осаждения с  $\text{CaPO}_4$ , ДЭАЭ-декстрана, электропорации, слияния протопластов, липофекции, микроинъекции в клетки и вирусных векторов.

Вектор может применяться для таргетирования, по существу, любой требуемой клетки-мишени. Например, для введения векторов (например, аденовируса, ВПГ) в требуемое место может применяться стереотаксическая инъекция. В дополнение к этому, частицы могут доставляться путем интрацеребровентрикулярной (ИЦВ) инфузии с использованием инфузионной системы с миниасосом, такой как SynchroMed Infusion System. Способ, основанный на массовом расходе, называемый конвекция, также доказал эффективность при доставке больших молекул в отдаленные области головного мозга и может быть полезным для доставки вектора в клетку-мишень (см. Bobo et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2076-2080 (1994); Morrison et al., *Am. J. Physiol.* 266:292-305 (1994)). Другие способы, которые могут использоваться, включают катетеры, внутривенную, парентеральную, внутрибрюшинную и подкожную инъекцию, и пероральный или другие известные пути введения.

Эти векторы могут использовать для экспрессии больших количеств антител, которые могут использоваться различными способами. Например, для выявления присутствия HER2 в образце. Антитело также может применяться для попытки связаться и разрушить связанную с HER2 передачу сигнала.

Методики могут быть приспособлены для получения одноцепочечных антител, специфических к антигенному белку, описанному в данном документе (см., например, патент США № 4946778). В дополнение к этому, способы могут быть приспособлены для конструирования библиотек экспрессии  $F_{ab}$  (см., например, Huse et al., 1989 *Science* 246: 1275-1281), чтобы обеспечить быструю и эффективную идентификацию моноклональных фрагментов  $F_{ab}$  с требуемой специфичностью для белка или его производных, фрагментов, аналогов или гомологов. Фрагменты антител, которые содержат idiotипы к белковому антигену, могут получать методиками, известными в данной области техники, включающими, но не ограничивающимися ими: (i) фрагмент  $F_{(ab)_2}$ , образуемый расщеплением пепсином молекулы антитела; (ii) фрагмент  $F_{ab}$ , образуемый восстановлением дисульфидных мостиков фрагмента  $F_{(ab)_2}$ ; (iii) фрагмент  $F_{ab}$ , образуемый обработкой молекулы антитела папаином и восстановителем, и (iv) фрагменты  $F_v$ .

Данное изобретение также включает анти-HER2 фрагменты  $F_v$ ,  $F_{ab}$ ,  $F_{ab'}$  и  $F_{(ab)_2}$  или фрагменты анти-HER2, одноцепочечные анти-HER2 антитела, мультиспецифические антитела, в которых по меньшей мере одно плечо связывает HER2, и анти-HER2 антитела-гетероконъюгаты.

Биспецифические антитела представляют собой антитела, которые имеют специфичности связывания по меньшей мере с двумя различными антигенами. В данном случае одна из специфичностей связывания представляет собой специфичность к HER2. Вторая мишень связывания представляет собой любой другой антиген, включающий белок клеточной поверхности или рецептор, или рецепторную субъединицу.

Способы создания биспецифических антител известны в данной области техники. Традиционно рекомбинантное получение биспецифических антител основано на коэкспрессии двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулинов, в которых две тяжелые цепи имеют различные специфичности (Milstein and Cuello, *Nature*, 305:537-539 (1983)). Благодаря случайному распределению тяжелых и легких цепей иммуноглобулинов эти гибридомы (квадромы) образуют потенциальные смеси десяти различных молекул антител, из которых только одно имеет правильную биспецифическую структуру. Очистка правильной молекулы обычно проводится применением стадий аффинной хроматографии. Сходные процедуры описаны в заявке WO 93/08829, опубликованной 13 мая 1993 г., и в статье Traunecker et al., *EMBO J.*, 10:3655-3659(1991).

Вариабельные домены антитела с требуемыми специфичностями связывания (комбинирующие сайты антитело-антиген) могут сливаться с последовательностями константных доменов иммуноглобулинов. Слияние предпочтительно проводят с константным доменом тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащим по меньшей мере часть шарнирного участка, участков CH2 и CH3. Предпочтительно иметь первый константный домен тяжелой цепи (CH1), содержащий сайт, необходимый для связывания легкой цепи в

по меньшей мере одним из слияний. ДНК, кодирующие слияния тяжелой цепи иммуноглобулина и, если требуется, легкой цепи иммуноглобулина, вставляют в отдельный экспрессионный вектор, и котрансфецируют в подходящий организм-хозяин. Для дополнительных подробностей получения биспецифических антител см., например, Suresh et al., *Methods in Enzymology*, 121:210(1986).

В соответствии с другим подходом, описанным в WO 96/27011, сопряжение между парой молекул антитела может быть сконструировано так, чтобы обеспечить максимальное процентное содержание гетеродимеров, которых выделяют из культуры рекомбинантных клеток. Предпочтительное сопряжение содержит по меньшей мере часть участка СНЗ константного домена антитела. В данном способе одну или более малых боковых цепей аминокислот из сопряжения первой молекулы антитела заменяют более крупными боковыми цепями (например, тирозином или триптофаном). На сопряжении второй молекулы антитела создают компенсирующие "полости" идентичного или сходного размера по отношению к большой(им) боковой(ым) цепи(ям) путем замены более крупных боковых цепей аминокислот на меньшие (например, аланин или треонин). Это действие обеспечивает механизм для увеличения выхода гетеродимера по сравнению с другими нежелательными конечными продуктами, такими как гомодимеры.

Биспецифические антитела могут быть получены в виде полноразмерных антител или фрагментов антител (например, биспецифических антител  $F(ab')_2$ ). Методики для создания биспецифических антител из фрагментов антител описаны в литературе. Например, биспецифические антитела могут быть получены с использованием химического связывания. В статье Brennan et al., *Science* 229:81 (1985) описана методика, в которой интактные антитела протеолитически расщепляют для образования фрагментов  $F(ab')_2$ . Данные фрагменты восстанавливают в присутствии агента, образующего комплекс с дитиолом, арсенита натрия для стабилизации vicинальных дитиолов и предотвращения образования межмолекулярных дисульфидов. Созданные фрагменты  $Fab'$  затем превращают в производные тринитробензоата (ТНБ). Затем один из производных  $Fab'$ -ТНБ превращают в  $Fab'$ -тиол путем восстановления меркаптоэтиламинамином и смешивают с эквимольным количеством другого производного  $Fab'$ -ТНБ с образованием биспецифического антитела. Полученные биспецифические антитела могут применяться как агенты для селективной иммобилизации ферментов.

В дополнение к этому, фрагменты  $Fab'$  могут непосредственно выделять из *E. coli* и химически связывать с образованием биспецифических антител. В Shalaby et al., *J. Exp. Med.* 175:217-225 (1992) описано получение молекулы полностью гуманизированного биспецифического антитела  $F(ab')_2$ . Каждый фрагмент  $Fab'$  по отдельности секретировался *E. coli* и подвергался направленному химическому связыванию *in vitro* с образованием биспецифического антитела. Образованное таким образом биспецифическое антитело было способно связываться с клетками, сверхэкспрессирующими рецептор ErbB2, и нормальными Т-клетками человека, а также запускать литическую активность цитотоксических лимфоцитов человека против опухолевых мишеней молочной железы человека.

Были также описаны различные методики создания и выделения фрагментов биспецифических антител непосредственно из культуры рекомбинантных клеток. Например, биспецифические антитела получали с использованием лейциновых застежек-молний. Kostelny et al., *J. Immunol.* 148(5): 1547-1553 (1992). Пептиды лейциновых застежек-молний из белков Fos и Jim были связаны с частями  $Fab'$  двух различных антител путем слияния генов. Гомодимеры антител восстанавливали в шарнирном участке с образованием мономеров, а затем повторно окисляли с образованием гетеромеров антител. Данный способ также может использоваться для получения гомодимеров антител. Технология получения "диатела", описанная Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993), обеспечивает альтернативный механизм для создания фрагментов биспецифических антител. Фрагменты содержат переменный домен тяжелой цепи ( $V_H$ ), соединенный с переменным доменом легкой цепи ( $V_L$ ) линкером, который является слишком коротким для обеспечения спаривания между двумя доменами на той же цепи. Соответственно, домены  $V_H$  и  $V_L$  из одного фрагмента вынуждены образовывать пару с комплементарными доменами  $V_H$  и  $V_L$  другого фрагмента, тем самым формируя два антигенсвязывающих сайта. Сообщали также о другой стратегии для создания биспецифических фрагментов антител путем использования одноцепочечных димеров Fv (sFv). См., Gruber et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

Подразумеваются антитела с более чем двумя валентностями. Например, могут быть получены триспецифические антитела. Tutt et al., *J. Immunol.* 147:60(1991).

Типовые биспецифические антитела могут связываться с двумя различными эпитопами, по меньшей мере один из которых происходит из белкового антигена, описанного в данном документе. В альтернативном варианте анти-антигенное плечо молекулы иммуноглобулина может комбинироваться с плечом, которое связывается с триггерной молекулой на лейкоците, такой как молекула рецептора Т-клеток (например, CD2, CD3, CD28 или B7) или Fc-рецепторы для IgG (Fc  $\gamma$ -R), такие как Fc  $\gamma$ -RI (CD64), Fc  $\gamma$ -RII (CD32) и Fc  $\gamma$ -RIII (CD16), чтобы сфокусировать клеточные защитные механизмы в отношении экспрессии клетками конкретного антигена. Биспецифические антитела также могут применяться для направления цитотоксических средств на клетки, которые экспрессируют конкретный антиген. Данные антитела обладают антигенсвязывающим плечом, которое связывает цитотоксическое средство или радионуклидный хелатирующий агент, такой как EOTUBE, DPTA, DOTA или TETA. Другое интересующее



биспецифическое антитело связывает белковый антиген, описанный в данном документе, и дополнительно связывает тканевый фактор (TF).

Антитела-гетероконъюгаты также находятся в пределах объема данного изобретения. Антитела-гетероконъюгаты состоят из двух ковалентно соединенных антител. Такие антитела, например, предложены для таргетирования клеток иммунной системы на нежелательные клетки (см. патент США № 4676980), и для лечения инфекции ВИЧ (см. WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089). Подразумевается, что данные антитела могут получать *in vitro* с использованием известных методов химии синтетических белков, включая методы, задействующие применение перекрестно сшивающих агентов. Например, могут конструироваться иммунотоксины с использованием реакции дисульфидного обмена или путем образования тиоэфирной связи. Примеры подходящих для этой цели реактивов включают имиотиолат и метил-4-меркаптобутиримидат и реактивы, описанные, например, в патенте США № 4676980.

Может потребоваться модифицировать антитело, описанное в данном документе, применительно к эффекторной функции для того, чтобы усилить, например, эффективность антитела при лечении заболеваний и нарушений, ассоциированных с аномальной экспрессией и/или активностью HER2.

Например, остаток(ки) цистеина могут вводить в Fc-участок, тем самым обеспечивая образование межцепочечной дисульфидной связи в этом участке. Созданное таким образом антитело может иметь улучшенную способность интернализации и/или улучшенный комплемент-опосредованный киллинг клеток и антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) (см. Caron et al., *J. Exp Med.*, 176: 1191-1195 (1992) и Shopes, *J. Immunol.*, 148: 2918-2922 (1992)). В альтернативном варианте антитело могут конструировать так, чтобы оно имело двойной Fc-участок и тем самым имело улучшенную способность вызывать лизис под действием комплемента и свойства АЗКЦ (см. Stevenson et al., *Anti-Cancer Drug Design*, 3: 219-230 (1989)).

Конъюгаты антител против HER2.

Данное изобретение также относится к иммуноконъюгатам, содержащим антитело, конъюгированное с цитотоксическим средством, таким как токсин (например, ферментативно активный токсин бактериального, грибкового происхождения, или происходит из растений или животных, или их фрагментов) или радиоактивный изотоп (т.е. радиоконъюгат).

Ферментативно активные токсины или их фрагменты, которые могут применяться, включают цепь А дифтерийного токсина, несвязывающиеся активные фрагменты токсина дифтерии, цепь А экзотоксина (из *Pseudomonas aeruginosa*), цепь А рицина, цепь А абрина, цепь А модексина,  $\alpha$ -сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантины, белки *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII и PAP-S), ингибитор *Momordica charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин, эномицин или трикотецены. Для получения радиоактивно конъюгированных антител доступны различные радионуклиды. Примеры включают  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{131}\text{In}$ ,  $^{90}\text{Y}$  и  $^{186}\text{Re}$ .

Конъюгаты антитела и цитотоксического средства создают с использованием различных бифункциональных связывающих белки средств, таких как N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитиол)пропионат (SPDP), имиотиолат (IT), бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидат HCL), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидилсуберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил)гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазонийбензоил)этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и соединения с бис-активными фторами (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). Например, иммунотоксин ригин могут получать как описано в статье Vitetta et al., *Science* 238: 1098 (1987). Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатобензил-3-метилдиэтилен триаминопентауксусная кислота (MX-DTPA) является типовым хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом (см. WO 94/11026).

Средним специалистам в данной области техники будет ясно, что с получаемыми антителами, описанными в данном документе, может связываться большое разнообразие всевозможных фрагментов (см., например, "Conjugate Vaccines", *Contributions to Microbiology and Immunology*, J.M. Cruse и R.E. Lewis, Jr (eds), Carger Press, New York, (1989), полное содержание которых включено в данный документ путем ссылки).

Связывание может проводиться путем любой химической реакции, которая будет связывать две молекулы, при условии, что антитело и другой фрагмент сохраняют свои соответствующие активности. Эта связывание может включать много химических механизмов, например, ковалентное связывание, аффинное связывание, интеркаляцию, координационное связывание и комплексообразование. Предпочтительным связыванием, однако, является ковалентное связывание. Ковалентное связывание может достигаться как прямой конденсацией существующих боковых цепей, так и внедрением внешних мостиковых молекул. Многие бивалентные или поливалентные связывающие вещества пригодны для связывания белковых молекул, таких как антитела по данному изобретению, с другими молекулами. Например, репрезентативные связывающие агенты могут включать органические соединения, такие как тиоэфиры, карбодиимиды, сложные эфиры сукцинимиды, диизоцианаты, глутаральдегид, диазобензолы и гексаметилендиамины. Этот перечень не претендует на исчерпывающий характер для различных классов связывающих агентов, известных в данной области техники, но скорее является типовым для большинства

обычных связующих агентов (см. Killen and Lindstrom, *Jour. Immun.* 133:1335-2549 (1984); Jansen et al., *Immunological Reviews* 62:185-216 (1982) и Vitetta et al., *Science* 238:1098 (1987)).

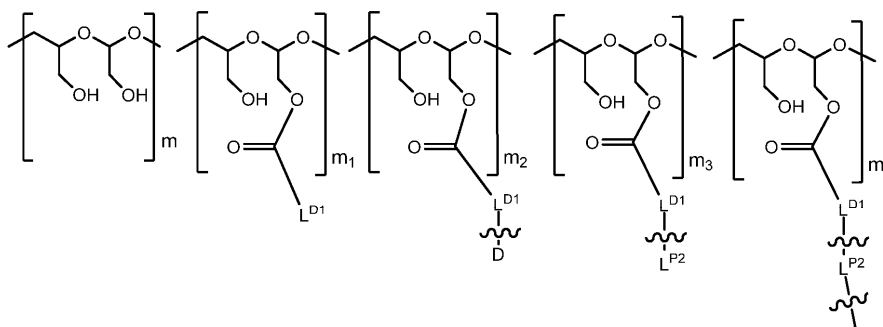
Предпочтительные линкеры описаны в литературе (см., например, Ramakrishnan S. et al., *Cancer Res.* 44:201-208 (1984), описывающую применение MBS (сложный эфир М-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид). См. также патент США № 5030719, описывающий применение галогенированного ацетилгидразидного производного, связанного с антителом путем олигопептидного линкера. В частности, предпочтительные линкеры включают: (i) EDC (1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид гидрохлорид; (ii) SMPT (4-сукцинимидил- $\alpha$ -метил- $\alpha$ -(2-пиридилдитио)толуол (Pierce Chem. Co., кат. 21558G); (iii) SPDP (сукцинимидил-6[3-(2-пиридилдитио)пропионамидо]гексаноат (Pierce Chem. Co., кат. № 21651G); (iv) сульфо-LC-SPDP (сульфосукцинимидил 6[3-(2-пиридилдитио)пропионамид] гексаноат (Pierce Chem. Co. кат. № 2165-G) и (v) сульфо-NHS (N-гидроксисульфосукцинимид: Pierce Chem. Co., кат. № 24510), конъюгированный с EDC.

Линкеры, описанные выше, содержат компоненты, которые обладают различными атрибутами, соответственно, приводящими к получению конъюгатов с различными физико-химическими свойствами. Например, сложные эфиры сульфо-NHS и алкилкарбоксилатов являются более стабильными, чем сложные эфиры сульфо-NHS и ароматических карбоксилатов. Линкеры, содержащие сложные эфиры NHS, являются менее растворимыми, чем сложные эфиры сульфо-NHS. Дополнительно линкер SMPT содержит стерически затрудненную дисульфидную связь и может образовывать конъюгаты с увеличенной стабильностью. Дисульфидные связи, в общем, являются менее стабильными, чем другие связи, потому что дисульфидная связь расщепляется *in vitro*, приводя к меньшей доступности конъюгата. В частности, сульфо-NHS может усиливать стабильность карбодимидных связей. Карбодимидное связывание (такое как EDC), при использовании с сульфо-NHS, образует сложные эфиры, которые более устойчивы к гидролизу, чем сама реакция карбодимидного связывания.

Антитела, описанные в данном документе, также могут быть приготовлены в лекарственной форме как иммунолипосомы. Липосомы, содержащие антитело, готовят способами, известными в данной области техники, такие как описанные в Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82: 3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 4030 (1980) и пат. США № 4485045 и 4544545. Липосомы с увеличенным периодом времени циркуляции описаны в патенте США № 5013556.

В частности, пригодные липосомы могут быть получены противофазным методом испарения из липидной композиции, содержащей фосфатидилхолин, холестерин и ПЭГ-дериватизированный фосфатидилэтаноламин (ПЭГ-ФЭ). Липосомы продавливают через фильтры с определенным размером пор для получения липосом с требуемым диаметром. Фрагменты Fab' антитела по данному изобретению могут конъюгироваться с липосомами, как описано в Martin et al., *J. Biol. Chem.*, 257: 286-288 (1982) посредством дисульфидообменной реакции.

В одном аспекте изобретения конъюгат, описанный в данном документе, включает выделенное антитело против HER2 или его антигенсвязывающий фрагмент, непосредственно или опосредованно связанный с одним или более D-несущих полимерных каркасов, независимо содержащих поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметил-формаль) (PHF), имеющий молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа, причем каждый из одного или более D-несущих полимерных каркасов независимо обладает формулой (Ic)



(Ic),

где каждое присутствие D, независимо представляет собой терапевтическое или диагностическое средство;

$L^{D1}$  представляет собой карбонилсодержащий фрагмент;

каждое присутствие  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\zeta\text{---}$  независимо представляет собой первый линкер, который содержит такую биоразрушаемую связь, что когда связь разрушается, то D высвобождается в активной форме для проявления своего терапевтического действия; а присутствие  $\text{---}\zeta\text{---}$  в

—C(=O)-L<sup>D1</sup>— $\xi$ —D между L<sup>D1</sup> и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к L<sup>D1</sup>,

каждое присутствие —C(=O)-L<sup>D1</sup>— $\xi$ —L<sup>P2</sup> представляет собой независимо второй линкер, еще не соединенный с выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом, в котором L<sup>P2</sup> представляет собой фрагмент, содержащий функциональную группу, которая еще будет образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, а  $\xi$  между L<sup>D1</sup> и L<sup>P2</sup> обозначает непосредственное или опосредованное присоединение L<sup>P2</sup> к L<sup>D1</sup>, и каждое присутствие второго линкера отличается от каждого присутствия первого линкера;

каждое присутствие —C(=O)-L<sup>D1</sup>— $\xi$ —L<sup>P2</sup>— $\xi$ — представляет собой независимо третий линкер, который соединяет каждый D-несущий полимерный каркас с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в концевой  $\xi$ , присоединенный к L<sup>P2</sup>, обозначает непосредственное или опосредованное присоединение L<sup>P2</sup> к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту при образовании ковалентной связи между функциональной группой L<sup>P2</sup> и функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; а каждое присутствие третьего линкера отличается от каждого присутствия первого линкера;

m представляет собой целое число от 1 до около 300,  
 m<sub>1</sub> представляет собой целое число от 1 до около 140,  
 m<sub>2</sub> представляет собой целое число от 1 до около 40,  
 m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 0 до около 18,  
 m<sub>4</sub> представляет собой целое число от 1 до около 10,

сумма m, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub> и m<sub>4</sub> находится в диапазоне от около 15 до около 300 и общее количество L<sup>P2</sup>, присоединенных к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, составляет 10 или меньше.

Конъюгат, описанный в документе, может включать один или более из следующих признаков.

Например, в формуле (Ic) m<sub>1</sub> представляет собой целое число от 1 до около 120 (например, около 1-90) и/или m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 1 до около 10 (например, около 1-8).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 6 кДа до около 20 кДа (т.е. сумму m, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub> и m<sub>4</sub> в диапазоне от около 45 до около 150), m<sub>2</sub> представляет собой целое число от 2 до около 20, m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 0 до около 9, m<sub>4</sub> представляет собой целое число от 1 до около 10 и/или m<sub>1</sub> представляет собой целое число от 1 до около 75 (например, m<sub>1</sub> составляет около 4-45).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 8 кДа до около 15 кДа (т.е. сумму m, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub> и m<sub>4</sub> в диапазоне от около 60 до около 110), m<sub>2</sub> представляет собой целое число от 2 до около 15, m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 0 до около 7, m<sub>4</sub> представляет собой целое число от 1 до около 10 и/или m<sub>1</sub> представляет собой целое число от 1 до около 55 (например, m<sub>1</sub> составляет около 4-30).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа (т.е. сумму m, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub> и m<sub>4</sub> в диапазоне от около 15 до около 150), m<sub>2</sub> представляет собой целое число от 1 до около 20, m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 0 до около 10 (например, m<sub>3</sub> в диапазоне от 0 до около 9), m<sub>4</sub> представляет собой целое число от 1 до около 8 и/или m<sub>1</sub> представляет собой целое число от 1 до около 70, и общее количество L<sup>P2</sup>, соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом находится в диапазоне от около 2 до около 8 (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа (т.е. сумму m, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub> и m<sub>4</sub> в диапазоне от около 20 до около 110), m<sub>2</sub> представляет собой целое число от 2 до около 15, m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 0 до около 8 (например, m<sub>3</sub> в диапазоне от 0 до около 7), m<sub>4</sub> представляет собой целое число от 1 до около 8 и/или m<sub>1</sub> представляет собой целое число от 2 до около 50, и общее количество L<sup>P2</sup>, соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом находится в диапазоне от около 2 до около 8 (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда РНФ в формуле (Ic) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа (т.е. сумму m, m<sub>1</sub>, m<sub>2</sub>, m<sub>3</sub> и m<sub>4</sub> в диапазоне от около 40 до около 75), m<sub>2</sub> представляет собой целое число от 2 до около 10 (например, m<sub>2</sub> составляет около 3-10), m<sub>3</sub> представляет собой целое число от 0 до около 5 (например, m<sub>3</sub> в диапазоне от 0 до около 4), m<sub>4</sub> представляет собой целое число от 1 до около 8 (например, m<sub>4</sub> в диапазоне от 1 до около 5) и/или m<sub>1</sub> представляет собой целое число от около 2 до около 35 (например, m<sub>1</sub> составляет около 5-35), и общее количество L<sup>P2</sup>, соединенных с

выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, находится в диапазоне от около 2 до около 8 (например, около 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 кДа до 40 кДа, (например, около 6-20 кДа или около 8-15 кДа, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа), то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например,  $m_2$ ) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или около 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу 40 кДа или больше (например, 60 кДа или больше; 80 кДа или больше; 100 кДа или больше; 120 кДа или больше; 140 кДа или больше; 160 кДа или больше; 180 кДа или больше, или 200 кДа или больше, или около 40-200, 40-180, 40-140, 60-200, 60-180, 60-140, 80-200, 80-180, 80-140, 100-200, 100-180, 100-140 или 140-150 кДа). В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5, между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 до 40 кДа, (например, около 6-20 кДа или около 8-15 кДа, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа), то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например,  $m_2$ ) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или около 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 140 до 180 кДа или от 140 до 150 кДа. В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5, между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в этом диапазоне молекулярных масс, включает, но не ограничивается ими, например, полноразмерные антитела, такие как, IgG, IgM.

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 до 40 кДа, то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например,  $m_2$ ) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или около 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 60 до 120 кДа. В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента к РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5, между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

Выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты в этом диапазоне молекулярных масс, включают, но не ограничиваются ими, например, фрагменты антител, такие как, например, Fab2 и фрагменты антител верблюдовых.

В одном варианте реализации изобретения D представляет собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическое средство представляет собой малую молекулу, имеющую молекулярную массу  $\leq$  около 5 кДа,  $\leq$  около 4 кДа,  $\leq$  около 3 кДа,  $\leq$  около 1,5 кДа или  $\leq$  около 1 кДа.

В некоторых вариантах реализации изобретения терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  менее чем около 1 нМ.

В другом варианте реализации изобретения терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  больше чем около 1 нМ, например терапевтическое средство имеет  $IC_{50}$  от около 1 до 50 нМ.

Некоторые терапевтические агенты, имеющие  $IC_{50}$  больше чем около 1 нМ (например, "менее активные лекарственные вещества"), являются неподходящими для конъюгации с антителом с использованием признанных в данной области техники методик конъюгации. Без привязки к какой-либо теории, такие терапевтические средства имеют активность, которая недостаточна для применения в таргетированных конъюгатах антитело-лекарственное вещество с использованием традиционных методик, так как не может быть конъюгировано достаточно копий лекарственного вещества (т.е. больше чем 8) с использованием признанных в данной области техники методик без получения ухудшенных фармакокинетических и физико-химических свойств конъюгата. Однако могут быть достигнуты значительно более высокие нагрузки таких менее активных лекарственных веществ с использованием стратегий конъюгации, описанных в данном документе, тем самым приводя к высоким нагрузкам терапевтического средства, при этом поддерживая требуемые фармакокинетические и физико-химические свойства. Таким образом,

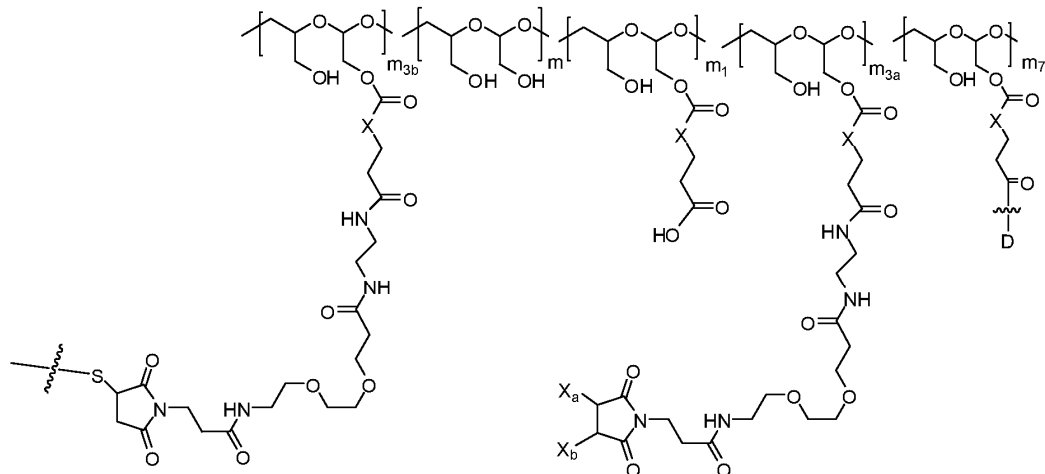
данное изобретение также относится к конъюгату антитело-полимер-лекарственное вещество, который включает выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, РНФ и по меньшей мере восемь фрагментов терапевтических средств, где D представляет собой ауристин, доластатин, монометилауристин Е (ММАЕ), монометилауристин F (ММАF), ауристин F, AF НРА, фенилендиамин (AFP).

Например, дуокармицин или его аналоги представляет собой дуокармицин А, дуокармицин В1, дуокармицин В2, дуокармицин С1, дуокармицин С2, дуокармицин D, дуокармицин SA, CC-1065, адозелезин, бизелезин или карзелезин.

Другие примеры D включают те, которые описаны, например, в публикации заявки США № 20130101546 и патенте США № 8815226, и в находящихся одновременно на рассмотрении заявках США с серийными № 14/512316, поданная 10 октября 2014 г., 61/988011, поданная 2 мая 2014 г. и 62/010972, поданная 11 июня 2014 г.; описание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме.

В некоторых вариантах реализации изобретения количество D-несущих полимерных каркасов, которые могут быть конъюгированы с антителом, ограничено количеством свободных цистеиновых остатков. В некоторых вариантах реализации изобретения свободные цистеиновые остатки внедряют в аминокислотную последовательность антитела способами, описанными в данном документе. Типовые конъюгаты, описанные в данном документе, могут включать антитела, которые имеют 1, 2, 3 или 4 сконструированные цистеиновые аминокислоты (Lyon R. et al. (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). В некоторых вариантах реализации изобретения один или более свободных цистеиновых остатков уже присутствуют в антителе без применения конструирования, в этом случае для конъюгации антитела с D-несущим полимерным каркасом могут использовать существующие свободные цистеиновые остатки. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело подвергают воздействию восстанавливающих условий до конъюгации антитела для того, чтобы создать один или более свободных цистеиновых остатков.

В некоторых вариантах реализации изобретения в конъюгате, описанном в данном документе, D-несущий полимерный каркас формулы (Ic) представляет собой формулу (Ie)



(Ie),

где РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа;

каждое присутствие D независимо представляет собой терапевтическое средство, имеющее молеку-

лярную массу  $\leq 5$  кДа, и  $\text{---}\xi\text{---}$  между D и карбонильной группой обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к карбонильной группе,

X представляет собой  $\text{CH}_2$ , O или NH;

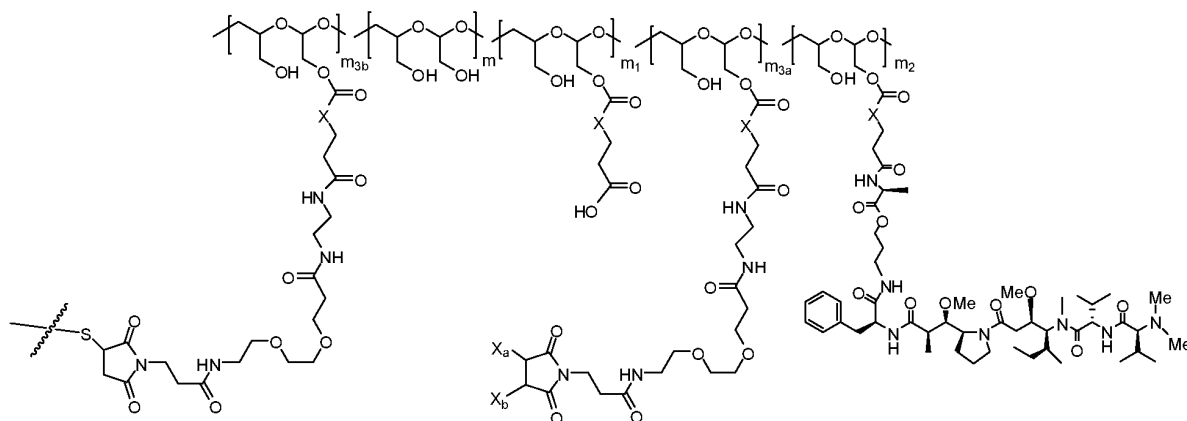
один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидоблокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$ , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную углерод-углеродную связь,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140,

$m_7$  представляет собой целое число от 1 до около 40, а сумма  $m_1$  и  $m_7$  составляет от около 2 до около 180,

$m$  представляет собой целое число от 1 до около 300,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17,

$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8 и сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  составляет между 1 и 18, а сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_7$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300.

В некоторых вариантах реализации изобретения в конъюгате, описанном в данном документе, D-несущий полимерный каркас формулы (Ie) представляет собой формулу (Id)



(Id),

где один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидоблокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$ , вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную углерод-углеродную связь;

$m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17,

$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8 и сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  составляет между 1 и 18, а сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет больше чем 1:1 и меньше или равное 10:1.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет около 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет между 2:1 и 8:1.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет около 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет между 2:1 и 4:1.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет около 4:1, 3:1 или 2:1.

Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет около 3:1 и 5:1.

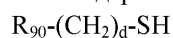
Например, соотношение между  $m_2$  и  $m_{3b}$  составляет около 3:1, 4:1 или 5:1.

Например, когда РНФ в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 150,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 70,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 20,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 9,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, а соотношение между РНФ и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8.

Например, когда РНФ в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 20 до около 110,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 50,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 15,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 7,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, а соотношение между РНФ и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, целое число от 2 до около 6 или целое число от 2 до около 4).

Например, когда РНФ в формуле (Id) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 40 до около 75,  $m_1$  представляет собой целое число от около 2 до около 35,  $m_2$  представляет собой целое число от около 2 до около 10,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 4,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 5, а соотношение между РНФ и выделенным антителом против HER2 или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, целое число от 2 до около 6 или целое число от 2 до около 4).

Например, водорастворимые малеимидоблокирующие фрагменты представляют собой фрагменты, которые могут быть ковалентно присоединены к одному из двух углеродных атомов олефина при реакции малеимидной группы с тиолсодержащим соединением формулы (II)



(II),

где  $R_{90}$  представляет собой  $NHR_{91}$ ,  $OH$ ,  $COOR_{93}$ ,  $CH(NHR_{91})COOR_{93}$  или замещенную фенильную группу;

$R_{93}$  представляет собой атом водорода или  $C_{1-4}$  алкил;

$R_{91}$  представляет собой атом водорода,  $CH_3$  или  $CH_3CO$ ; а

d представляет собой целое число от 1 до 3.

Например, водорастворимое малеимидоблокирующее соединение формулы (II) может быть цистеином, N-ацетилцистеином, метиловым эфиром цистеина, N-метилцистеином, 2-меркаптоэтанолом, 3-меркаптопропионовой кислотой, 2-меркаптоуксусной кислотой, меркаптометанолом (т.е. HOCH<sub>2</sub>SH), бензилтиолом, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиолом. Один или более гидрофильных заместителей на фениле содержат OH, SH, метокси, этокси, COOH, CHO, СОС<sub>1-4</sub> алкил, NH<sub>2</sub>, F, циано, SO<sub>3</sub>H, PO<sub>3</sub>H и тому подобное.

Например, водорастворимая малеимидоблокирующая группа представляет собой -S-(CH<sub>2</sub>)<sub>d</sub>-R<sub>90</sub>, в которой R<sub>90</sub> представляет собой OH, COOH или CH(NHR<sub>91</sub>)COOR<sub>93</sub>; R<sub>93</sub> представляет собой атом водорода или CH<sub>3</sub>; R<sub>91</sub> представляет собой атом водорода или CH<sub>3</sub>CO; a d представляет собой 1 или 2.

Например, водорастворимая малеимидоблокирующая группа представляет собой -S-CH<sub>2</sub>-CH(NH<sub>2</sub>)COOH.

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 до 40 кДа, (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа), то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например, m<sub>2</sub>) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или около 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу 40 кДа или больше (например, 60 кДа или больше; 80 кДа или больше; или 100 кДа или больше; 120 кДа или больше; 140 кДа или больше; 160 кДа или больше, 180 кДа или больше, или 200 кДа или больше, или около 40-200, 40-180, 40-140, 60-200, 60-180, 60-140, 80-200, 80-180, 80-140, 100-200, 100-180, 100-140 или 140-150 кДа). В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5, между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:8, между около 1:2 и около 1:6, между около 1:2 и около 1:5, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 до 40 кДа, (например, около 2-20 кДа, или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа), то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например, m<sub>2</sub>) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или около 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 140 до 180 кДа или от 140 до 150 кДа. В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5, между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:8, между около 1:2 и около 1:6, между около 1:2 и около 1:5, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

Выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты в этом диапазоне молекулярных масс включают, но не ограничиваются ими, например, полноразмерные антитела, такие как, IgG, IgM.

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 до 40 кДа (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа), то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например, m<sub>2</sub>) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 60 до 120 кДа. В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5, между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:8, между около 1:2 и около 1:6, между около 1:2 и около 1:5, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

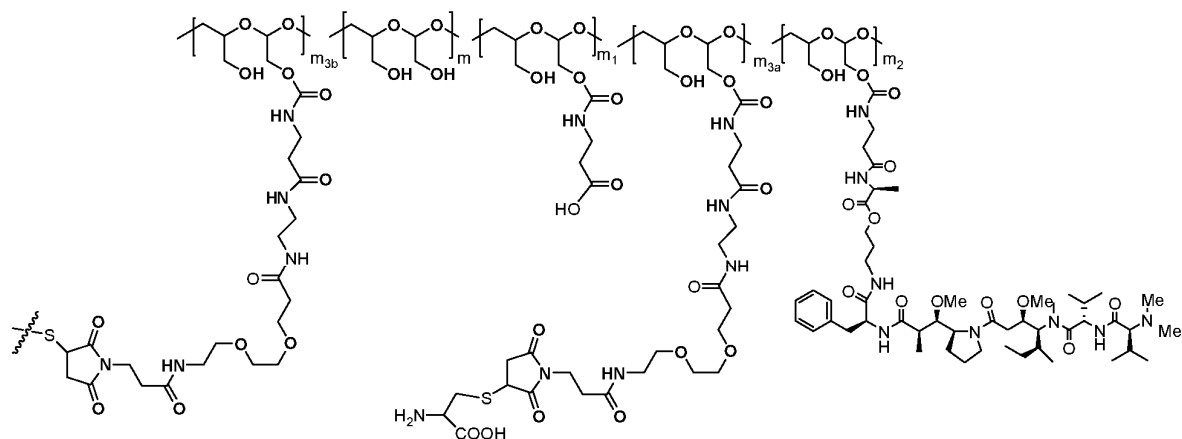
Выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты в этом диапазоне молекулярных масс включают, но не ограничиваются ими, например фрагменты антител, такие как, например, Fab2, scFv и фрагменты антител верблюдовых.

Например, когда РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от 2 до 40 кДа (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа), то количество молекул лекарственных веществ на РНФ (например, m<sub>2</sub>) представляет собой целое число от 1 до около 40 (например, около 1-20, или около 2-15, или около 3-10 или 2-10). Данный каркас может применяться, например, для конъюгирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 40 до 80 кДа. В этом варианте реализации изобретения соотношение выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и РНФ составляет между около 1:1 и около 1:10, между около 1:1 и около 1:9, между около 1:1 и около 1:8, между около 1:1 и около 1:7, между около 1:1 и около 1:6, между около 1:1 и около 1:5,

между около 1:1 и около 1:4, между около 1:1 и около 1:3, между около 1:1 и около 1:2, между около 1:2 и около 1:8, между около 1:2 и около 1:6, между около 1:2 и около 1:5, между около 1:2 и около 1:4, между около 1:2 и около 1:3, между около 1:3 и около 1:4 или между около 1:3 и около 1:5.

Выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты в этом диапазоне молекулярных масс, т.е. от около 40 до около 80 кДа, включают, но не ограничиваются ими, например, фрагменты антител, такие как, например, Fab.

В некоторых вариантах реализации изобретения в конъюгате, описанном в данном документе, D-несущий полимерный каркас формулы (Ie) представляет собой формулу (If), причем полимер представляет собой PHF, который имеет молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа



(If),

где  $m$  представляет собой целое число от 1 до около 300,

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140,


$m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40,

$m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17,

$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8;

сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 и до около 18,

сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300,

концевой  обозначает присоединение одного или более полимерных каркасов к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, который специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека и содержит варибельный определяющий комплементарность участок 1 тяжелой цепи (CDRH1), содержащий аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 25); варибельный определяющий комплементарность участок 2 тяжелой цепи (CDRH2), содержащий аминокислотную последовательность YISSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 26); варибельный определяющий комплементарность участок 3 тяжелой цепи (CDRH3), содержащий аминокислотную последовательность GGHGDFDL (SEQ ID NO: 27); варибельный определяющий комплементарность участок 1 легкой цепи (CDRL1), содержащий аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); варибельный определяющий комплементарность участок 2 легкой цепи (CDRL2), содержащий аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21) и варибельный определяющий комплементарность участок 3 легкой цепи (CDRL3), содержащий аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29), а соотношение между PHF и антителом составляет 10 или меньше.

Каркас формулы (If) может включать один или более из следующих признаков.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 150,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 70,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 20,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 9,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 10, а соотношение между PHF и антителом представляет собой целое число от 2 до около 8.

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 20 до около 110,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 50,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 15,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 7,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 8, а соотношение между PHF и антителом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, от около 2 до около 6 или от около 2 до около 4).

Когда PHF в формуле (If) имеет молекулярную массу, находящуюся в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа, то сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 40 до около 75,  $m_1$  представ-



ляет собой целое число от около 2 до около 35,  $m_2$  представляет собой целое число от около 2 до около 10,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 4,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 5, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 5, а соотношение между РНФ и антителом представляет собой целое число от 2 до около 8 (например, от около 2 до около 6 или от около 2 до около 4).

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между гидроксипропиламидом аури-статина F ("AF НРА") и антителом может составлять около 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между AF НРА и антителом может составлять около 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах реализации изобретения соотношение между РНФ и антителом может составлять около 4:1, 3:1 или 2:1.

Выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты в этом диапазоне молекулярных масс включают, но не ограничиваются ими, например, фрагменты антител, такие как, Fab.

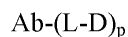
Другие варианты реализации изобретения конъюгатов антитело-полимер лекарственного вещества представляют собой те, которые описаны, например, в патенте США № 8815226 и заявках США с серийными № 14/512316, поданная 10 октября 2014 г., и 61/988011, поданная 2 мая 2014 г.; описание каждой из которых включено в данный документ в полном объеме.

Данное изобретение также относится к производному лекарственного вещества, модифицированному так, чтобы оно могло быть непосредственно конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом в отсутствие полимерного носителя, и образовывать его конъюгаты лекарственного вещества-антитело.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты антитело-лекарственное вещество включают антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное, к фрагменту лекарственного вещества. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, ковалентно присоединено к фрагменту лекарственного вещества через линкер, например, неполимерный линкер.

Фрагмент лекарственного вещества (D) конъюгатов антитело-лекарственное вещество (ADC) может включать любое соединение, фрагмент или группу, которая обладает цитотоксическим или цитостатическим эффектом, как определено в данном документе. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгат антитело-лекарственное вещество (ADC) содержит антитело (Ab), которое таргетирует опухолевую клетку, фрагмент лекарственного вещества (D) и линкерный фрагмент (L), который присоединяет Ab к D. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело присоединяют к линкерному фрагменту (L) через один или более аминокислотных остатков, таких как лизин и/или цистеин.

В некоторых вариантах реализации изобретения ADC имеет формулу (Ig)



(Ig),

где p представляет собой целое число от 1 до около 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения количество фрагментов лекарственных веществ, которые могут быть конъюгированы с антителом, ограничено количеством свободных цистеиновых ос-

татков. В некоторых вариантах реализации изобретения свободные цистеиновые остатки внедряют в аминокислотную последовательность антитела способами, описанными в данном документе. Типовые ADC формулы Ig включают, но не ограничиваются ими, антитела, которые имеют 1, 2, 3 или 4 сконструированные цистеиновые аминокислоты (Lyon, R. et al (2012) *Methods in Enzym.* 502:123-138). В некоторых вариантах реализации изобретения один или более свободных цистеиновых остатков уже присутствуют в антителе без применения конструирования, в этом случае для конъюгации антитела с лекарственным веществом могут использовать существующие свободные цистеиновые остатки. В некоторых вариантах реализации изобретения антитело подвергают воздействию восстанавливающих условий до конъюгации антитела для того, чтобы создать один или более свободных цистеиновых остатков.

В некоторых вариантах реализации изобретения "линкер" (1) представляет собой бифункциональный или мультифункциональный фрагмент, который может применяться для связывания одного или более фрагментов лекарственных веществ (D) с антителом (Ab) для образования конъюгата антитело-лекарственное вещество (ADC) формулы Ig. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты антитело-лекарственное вещество (ADC) могут получать с использованием линкера, имеющего реакционноспособные функциональные группы для ковалентного присоединения к лекарственному веществу и к антителу. Например, в некоторых вариантах реализации изобретения цистеиновый тиол антитела (Ab) может формировать связь с реакционноспособной функциональной группой линкера или интермедиатом лекарственное вещество-линкер для создания ADC.

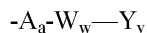
В одном аспекте изобретения линкер имеет функциональную группу, которая способна реагировать со свободным цистеином, присутствующим на антителе с образованием ковалентной связи. Неограничивающие примеры таких реакционноспособных функциональных групп включают малеимид, галогенацетамиды,  $\alpha$ -галогенацетил, активированные сложные эфиры, такие как 4-нитрофенильные сложные эфиры, пентафторфенильные сложные эфиры, тетрафторфенильные сложные эфиры, ангидриды, хлориды кислот, сульфонилахлориды, изоцианаты и изотиоцианаты. См., например, способ конъюгации на странице 766 Klussman et al. (2004), *Bioconjugate Chemistry* 15(4):765-773 и примеры в данном документе.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет функциональную группу, которая способна реагировать с электрофильной группой, присутствующей на антителе. Примеры таких электрофильных групп включают, но не ограничиваются ими, альдегидные и кетоновые карбонильные группы. В некоторых вариантах реализации изобретения гетероатом реакционноспособной функциональной группы линкера может реагировать с электрофильной группой на антителе с образованием ковалентной связи с единицей антитела. Неограничивающие примеры таких реакционноспособных функциональных групп включают, но не ограничиваются ими, гидразид, оксим, amino, гидразин, тиосемикарбазон, гидразинкарбоксилат и арилгидразид.

Линкер может содержать один или более линкерных компонентов. Типовые линкерные компоненты включают 6-малеимидокапроил ("MC"), малеимидопропаноил ("MP"), валин-цитруллин ("val-cit" или "vc"), аланин-фенилаланин ("ala-phe"), *p*-аминобензоилоксикарбонил ("PAB"), *N*-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио) пентаноат ("SPP") и 4-(*N*-малеимидометил)циклогексан-1 карбоксилат ("MCC"). Различные линкерные компоненты известны в данной области техники, некоторые из которых описаны ниже.

Линкер может быть "расщепляемым линкером", облегчая высвобождение лекарственного вещества. Неограничивающие типичные расщепляемые линкеры включают кислотолабильные линкеры (например, содержащие гидразон), протеазочувствительные (например, пептидазочувствительные) линкеры, фотоллабильные линкеры или дисульфид-содержащие линкеры (Chari et al., *Cancer Research* 52:127-131 (1992); пат. США № 5208020).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер имеет следующую формулу (IIg)



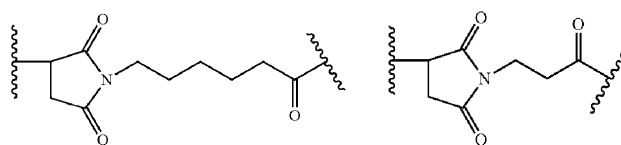
(IIg),

где A представляет собой "растягивающую единицу", и а является целым числом от 0 до 1;

W представляет собой "аминокислотную единицу", и w является целым числом от 0 до 12;

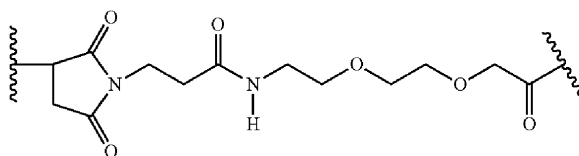
Y представляет собой "спейсерную единицу", и у является целым числом 0, 1 или 2. ADC, содержащий линкер формулы (IIg), имеет формулу I(A): Ab-(Aa-Ww-Yy-D)<sub>p</sub>, где Ab, D и p определены как выше для формулы (Ig). Типовые варианты реализации таких линкеров описаны в пат. США № 7498298, который включен в данный документ в полном объеме путем ссылки.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкерный компонент содержит "растягивающую единицу" (A), которая связывает антитело с другим линкерным компонентом или с фрагментом лекарственного вещества. Неограничивающие примеры растягивающих единиц показаны ниже (где волнистыми линиями показаны места ковалентного присоединения к антителу, лекарственному веществу или дополнительным линкерным компонентам)

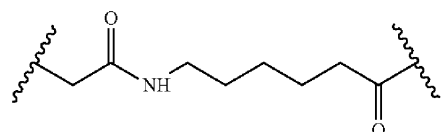


MC

MP



mПЭГ или

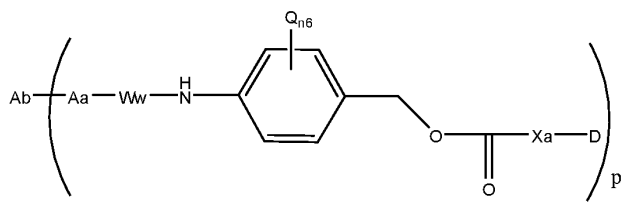


В некоторых вариантах реализации изобретения линкерный компонент содержит "аминокислотную единицу" (W). В некоторых таких вариантах реализации изобретения аминокислотная единица обеспечивает расщепление линкера протеазой, тем самым облегчая высвобождение лекарственного вещества из иммуноконъюгата при воздействии внутриклеточных протеаз, таких как лизосомальные ферменты (Dagonina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784). Типовые аминокислотные единицы включают, но не ограничиваются ими, дипептиды, трипептиды, тетрапептиды и пентапептиды. Типовые дипептиды включают, но не ограничиваются ими, валин-цитруллин (vc или val-cit), аланин-фенилаланин (af или ala-phe); фенилаланин-лизин (fk или phe-lys); фенилаланин-гомолизин (phe-homolys) и N-метил-валин-цитруллин (Me-val-cit). Типовые трипептиды включают, но не ограничиваются ими, глицин-валин-цитруллин (gly-val-cit) и глицин-глицин-глицин (gly-gly-gly). Аминокислотная единица может содержать аминокислотные остатки, которые встречаются в природе и/или минорные аминокислоты и/или не встречающиеся в природе аминокислотные аналоги, такие как цитруллин. Аминокислотные единицы могут быть разработаны и оптимизированы для ферментативного расщепления конкретным ферментом, например, опухолесенсибилизированной протеазой, катепсином В, С и D или протеазой плазминоном.

Как правило, линкеры пептидного типа могут получать путем образования пептидной связи между двумя или более фрагментами аминокислот и/или пептидов. Такие пептидные связи могут быть получены, например, в соответствии с жидкофазным методом синтеза (например, E. Schrider and K. Lubke (1965) "The Peptides", volume 1, pp 76-136, Academic Press).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкерный компонент содержит "спейсерную" единицу, которая связывает антитело с фрагментом лекарственного вещества либо непосредственно, либо через растягивающую единицу и/или аминокислотную единицу. Спейсерная единица может быть "саморасщепляющейся" или "несаморасщепляющейся". Несаморасщепляющаяся спейсерная единица является единицей, в которой часть или все из спейсерных единиц остаются связанными с фрагментом лекарственного вещества при расщеплении ADC. Примеры несаморасщепляющихся спейсерных единиц включают, но не ограничиваются ими, глициновой спейсерной единицей и глицин-глициновой спейсерной единицей. В некоторых вариантах реализации изобретения ферментативное расщепление ADC, содержащего глицин-глициновую спейсерную единицу, ассоциированной с опухолевой клеткой протеазой приводит к высвобождению фрагмента глицин-глицин-лекарственное вещество от остального ADC. В некоторых таких вариантах реализации изобретения фрагмент глицин-глицин-лекарственное вещество подвергается стадии гидролиза в опухолевой клетке, таким образом отщепляя глицин-глициновую спейсерную единицу от фрагмента лекарственного вещества.

"Саморасщепляющаяся" спейсерная единица обеспечивает высвобождение фрагмента лекарственного вещества. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица линкера содержит п-аминобензильную единицу. В некоторых таких вариантах реализации изобретения п-аминобензильный спирт присоединяют к аминокислотной единице через амидную связь, и между бензиновым спиртом и лекарственным веществом создается карбамат, метилкарбамат или карбонат (Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103). В некоторых вариантах реализации изобретения спейсерная единица содержит п-аминобензилоксикарбонил (PAB). В некоторых вариантах реализации изобретения ADC, содержащий саморасщепляющийся линкер имеет структуру



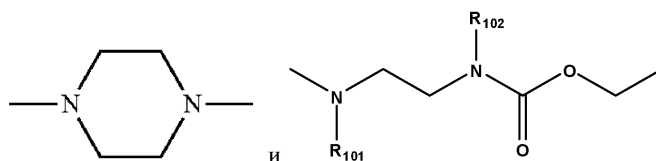
где Q представляет собой  $-C_1-C_8$  алкил,  $-O-(C_1-C_8$  алкил), галоген, нитро или циано;

$n_6$  представляет собой целое число от 0 до 4;

$X_a$  может быть одной или более дополнительными спейсерными единицами или может отсутствовать; а

p представляет собой целое число от 1 до около 20.

В некоторых вариантах реализации изобретения p представляет собой целое число от 1 до 10, от 1 до 7, от 1 до 5 или от 1 до 4. Неограничивающие типовые спейсерные единицы  $X_a$  включают

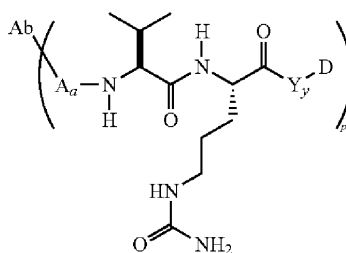


где  $R_{101}$  и  $R_{102}$  независимо выбирают из H и  $C_1-C_6$  алкила. В некоторых вариантах реализации изобретения  $R_{101}$  и  $R_{102}$  каждый представляет собой  $-CH_3$ .

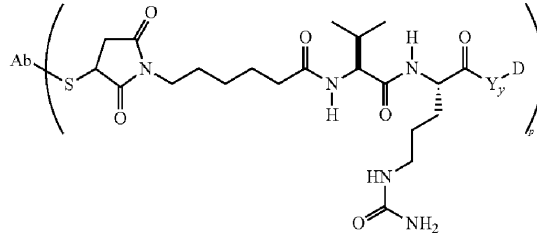
Другие примеры саморасщепляющихся спейсеров включают, но не ограничиваются ими, ароматическими соединениями, которые в электронной форме являются сходными с группой PAB, такие как производные 2-аминоимидазол-5-метанола (пат. США № 7375078; Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237), и орто- или пара-аминобензилацетальями. В некоторых вариантах реализации изобретения спейсер может применяться таким образом, чтобы претерпевать циклизацию при гидролизе амидной связи, такие как замещенные и незамещенные амиды 4-аминомасляной кислоты (Rodrigues et al (1995) *Chemistry Biology* 2:223), соответственно, замещенные бицикло[2.2.1] и бицикло[2.2.2] кольцевые системы (Storm et al. (1972) *J. Amer. Chem. Soc.* 94:5815) и амиды 2-аминофенилпропионовых кислот (Amsberry et al. (1990) *J. Org. Chem.* 55:5867). Присоединение лекарственного вещества к  $\alpha$ -углероду глицинового остатка представляет собой другой пример саморасщепляющегося спейсера, который может использоваться в ADC (Kingsbury et al (1984) *J. Med. Chem.* 27:1447).

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер L может быть линкером дендритного типа для ковалентного присоединения более чем одного фрагмента лекарственного вещества к антителу посредством разветвленного мультифункционального линкерного фрагмента (Sun et al. (2002) *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:2213-2215; Sun et al. (2003) *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 11:1761-1768). Дендритные линкеры могут увеличивать молярное соотношение лекарственного вещества к антителу, т.е. нагрузку, которая соотносится с активностью ADC. Таким образом, если антитело несет только одну реакционноспособную тиольную группу цистеина, то через дендритный линкер может присоединяться множество фрагментов лекарственных веществ.

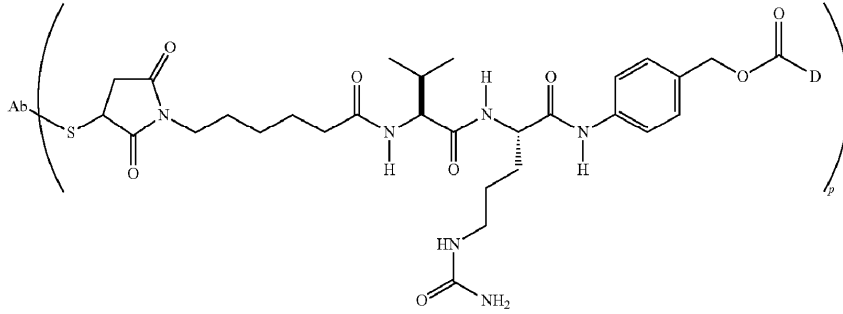
Неограничивающие типовые линкеры показаны ниже для ADC формулы (Ig)



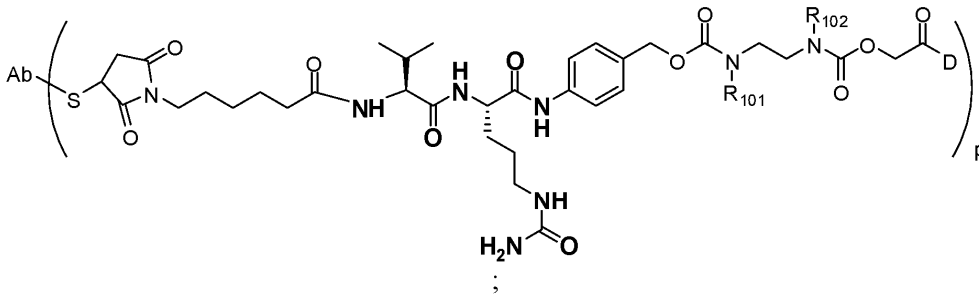
Val-cit;



MC-val-cit;



MC-val-cit-PAB;



Phe-Lys-PAB-Ab;

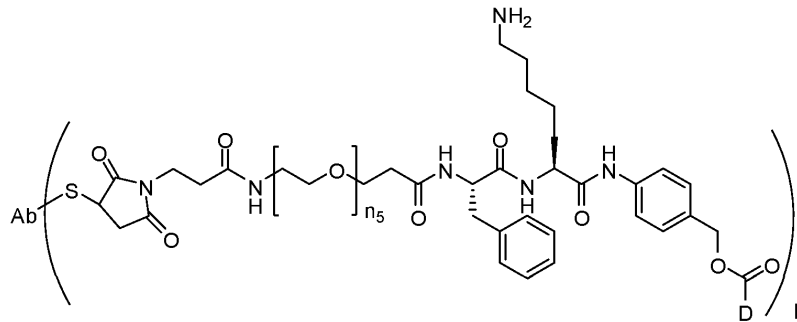
где  $R_{101}$  и  $R_{102}$  независимо выбирают из H и  $C_1-C_6$  алкила;

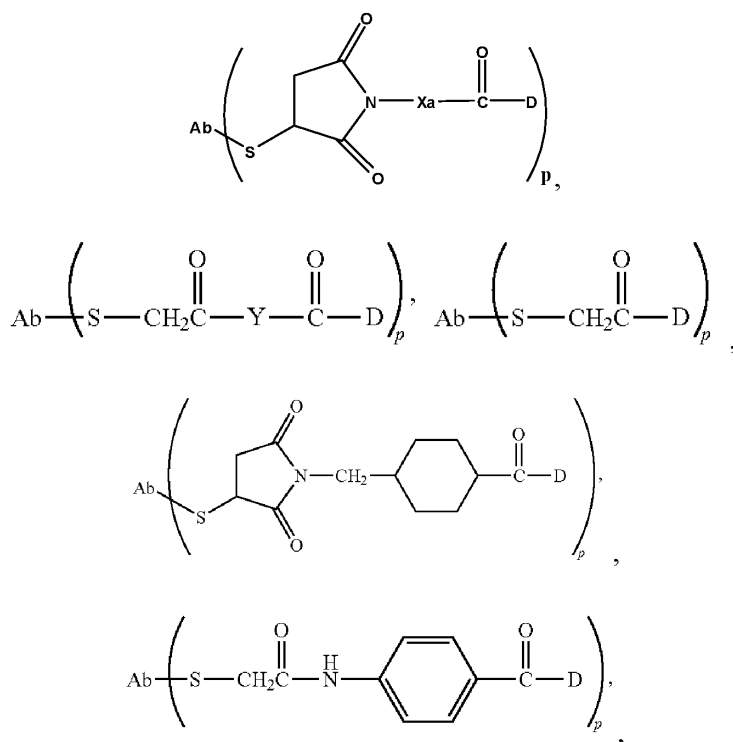
$n_5$  представляет собой целое число от 0 до 12.

В некоторых вариантах реализации изобретения  $p$  представляет собой целое число от 2 до 10. В некоторых вариантах реализации изобретения  $p$  представляет собой целое число от 4 до 8.

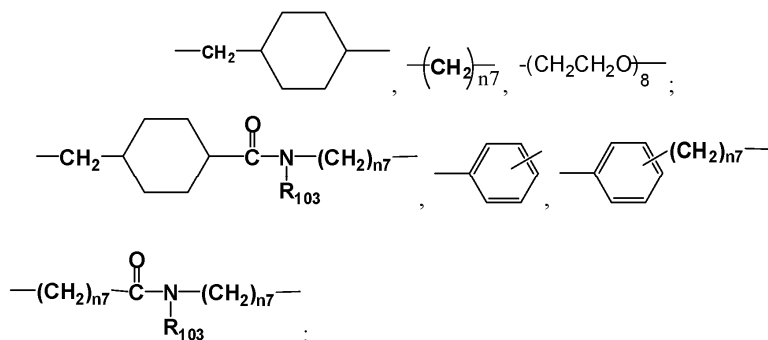
В некоторых вариантах реализации изобретения  $R_{101}$  и  $R_{102}$  каждый представляет собой  $-CH_3$ .

Дополнительные неограничивающие примеры ADC включают структуры

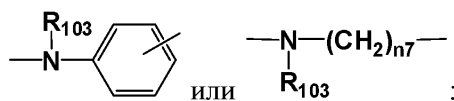




где Xa представляет собой



или Y представляет собой

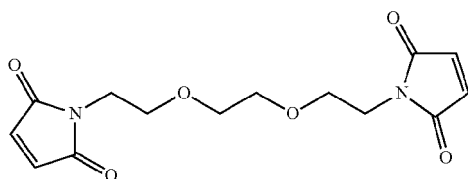
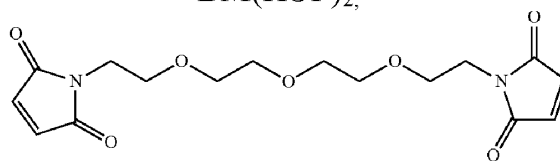


каждый R<sub>103</sub> независимо представляет собой H или C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub> алкил; а n<sub>7</sub> представляет собой целое число от 1 до 12.

В некоторых вариантах реализации изобретения линкер замещают группами, которые модулируют растворимость и/или реакционную способность. В качестве неограничивающего примера заряженный заместитель, такой как сульфат (-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) или аммоний, может увеличивать растворимость в воде линкерного реактива и облегчать реакцию связывания линкерного реактива с антителом и/или фрагментом лекарственного вещества, или облегчать реакцию связывания Ab-L (интермедиата антитело-линкер) с D, или D-L (интермедиат лекарственное вещество-линкер) с Ab, в зависимости от пути синтеза, используемого для получения ADC. В некоторых вариантах реализации изобретения часть линкера связывается с антителом, а часть линкера связывается с лекарственным веществом, и затем Ab-(линкерная часть)<sup>a</sup> связывается с лекарственным веществом-(линкерная часть)<sup>b</sup> с образованием ADC формулы Ig.

Соединения, описанные в данном документе, явным образом подразумевают, но не ограничиваются ими, ADC, полученные с применением следующих линкерных реактивов: бис-малеимидотриоксиэтиленгликоль (BMPEO), сложный эфир N-(β-малеимидопропилокси)-N-гидроксисукцинимид (BMPS), сложный эфир N-(ε-малеимидокапроилокси)сукцинимид (EMCS), сложный эфир N-[γ-малеимидобутирилокси]сукцинимид (GMBS), 1,6-гексан-бис-винилсульфон (HBVS), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбокси-(6-амидокапроат) (LC-SMCC), сложный эфир м-малеимидобензоил-N-гидроксисукцинимид (MBS), гидразид 4-(4-N-малеимидофенил)масляной кислоты (MPBH), сукцинимидил 3-(бромацетиламино)пропионат (SBAP), сукцинимидил йодацетат (SIA), сукцинимидил (4-йодацетил)аминобензоат (SIAB), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат (SPDP), N-сукцинимидил-4-

(2-пиридилтио)пентаноат (SPP), сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), сукцинимидил 4-(п-малеимидофенил)бутират (SMPB), сукцинимидил 6-[(β-малеимидо-пропионамидо)гексаноат] (SMPH), иминотиолан (IT), сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC и сульфо-SMPB и сукцинимидил-(4-винилсульфон)бензоат (SVSB), и включая бис-малеимидные реактивы: дитиобисмалеимидозтан (DTME), 1,4-бисмалеимидобутан (BMB), 1,4-бисмалеимидил-2,3-дигидроксибутан (BMDV), бисмалеимидогексан (BMH), бисмалеимидозтан (BMOE), BM(ПЭГ)<sub>2</sub> (показан ниже) и BM(ПЭГ)<sub>3</sub> (показан ниже); бифункциональные производные имидоэфиров (такие как диметиладипимидата HCl), активные сложные эфиры (такие как дисукцинимидила суберат), альдегиды (такие как глутаральдегид), бис-азидосоединения (такие как бис-(п-азидобензоил) гександиамин), производные бис-диазония (такие как бис-(п-диазониябензоил)-этилендиамин), диизоцианаты (такие как толуол-2,6-диизоцианат) и бис-активные фторсоединения (такие как 1,5-дифтор-2,4-динитробензол). В некоторых вариантах реализации изобретения бис-малеимидные реактивы обеспечивают присоединение тиольной группы цистеина в антителе с тиол-содержащим фрагментом лекарственного вещества, линкером или интермедиатом линкера-лекарственного вещества. Другие функциональные группы, которые являются реакционноспособными с тиольными группами, включают, но не ограничиваются ими, йодацетамид, бромацетамид, винилпиридин, дисульфид, пиридилдисульфид, изоцианат и изотиоцианат

BM(ПЭГ)<sub>2</sub>BM(ПЭГ)<sub>3</sub>

Некоторые полезные линкерные реактивы могут получать из различных коммерческих источников, таких как Pierce Biotechnology, Inc. (г. Рокфорд, штат Иллинойс), Molecular Biosciences Inc. (г. Боулдер, штат Колорадо), или синтезировать в соответствии с процедурами, описанными в данной области техники; например, в Toki et al. (2002) *J. Org. Chem.* 67:1866-1872; Dubowchik et al. (1997) *Tetrahedron Letters*, 38:5257-60; Walker M.A. (1995) *J. Org. Chem.* 60:5352-5355; Frisch et al. (1996) *Bioconjugate Chem.* 7:180-186; пат. США № 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583 и WO 04/032828.

Меченая углеродом-14 1-изотиоцианатбензил-3-метилдиэтилен триаминпентауксусная кислота (MX-DTPA) является типовым хелатирующим агентом для конъюгации радионуклеотида с антителом. См., например, WO 94/11026.

Способы создания конъюгатов антител против HER2.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты получают в несколько стадий. Эти стадии включают: (1) модификацию полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая реагирует с функциональной группой лекарственного вещества или его производным; (2) проведение реакции модифицированного полимера с лекарственным веществом или его производным так, чтобы лекарственное вещество связывалось с полимером; (3) модификацию конъюгата полимер-лекарственное вещество так, чтобы полимер содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, или его производного, и (4) проведение реакции модифицированного конъюгата полимер-лекарственное вещество с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с образованием конъюгата, описанного в данном документе. Стадия (3) может быть пропущена, если модифицированный полимер, получаемый на стадии (1), содержит функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В другом варианте реализации изобретения конъюгаты получают в несколько стадий: (1) модификации полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая реагирует с функциональной группой лекарственного вещества или его производным; (2) проведения реакции модифицированного полимера с первым лекарственным веществом или его производным так, чтобы лекарственное вещество

связывалось с полимером; (3) модификации конъюгата полимер-лекарственное вещество так, чтобы он содержал отличающуюся функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой второго лекарственного вещества или его производного; (4) проведения реакции модифицированного конъюгата полимер-лекарственное вещество со вторым лекарственным веществом или его производным так, чтобы второе лекарственное вещество связывалось с конъюгатом полимер-лекарственное вещество; (5) модификации конъюгата полимер-лекарственное вещество, содержащего 2 различных лекарственных веществ так, чтобы полимер содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и (6) проведения реакции модифицированного конъюгата полимер-лекарственное вещество из стадии (5) с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом или его производным с образованием конъюгата, описанного в данном документе. Стадии (5) и (6) могут повторяться, если 2 различных выделенных антитела или их антигенсвязывающих фрагментов или их производных необходимо конъюгировать с образованием конъюгата полимер-лекарственное вещество, содержащего два различных лекарственных вещества и два различных антитела или их антигенсвязывающих фрагмента.

В еще одном варианте реализации изобретения конъюгаты получают в несколько стадий. Эти стадии включают: (1) модификацию полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая реагирует с функциональной группой лекарственного вещества или его производным; (2) дополнительную модификацию полимера так, чтобы он также содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (3) проведение реакции модифицированного полимера с лекарственным веществом или его производным так, чтобы лекарственное вещество связывалось с полимером, и (4) проведение реакции модифицированного конъюгата полимер-лекарственное вещество с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с образованием конъюгата, описанного в данном документе. Последовательность из стадий (1) и (2) или последовательность из стадий (3) и (4) может быть обращенной. Дополнительно любая стадия (1) или (2) может быть пропущена, если модифицированный полимер содержит функциональную группу, которая может реагировать как с функциональной группой лекарственного вещества или его производными, так и функциональной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

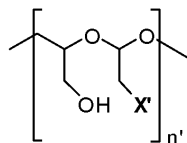
В другом варианте реализации изобретения конъюгаты получают в несколько стадий: (1) модификации полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая реагирует с функциональной группой лекарственного вещества или его производным; (2) дополнительной модификации полимера так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; (3) проведения реакции модифицированного полимера с первым лекарственным веществом или его производным так, чтобы лекарственное вещество связывалось с полимером; (4) модификации конъюгата полимер-лекарственное вещество так, чтобы он содержал отличающуюся функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой второго лекарственного вещества или его производного; (5) проведения реакции модифицированного конъюгата полимер-лекарственное вещество со вторым лекарственным веществом или его производным так, чтобы второе лекарственное вещество связывалось с конъюгатом полимер-лекарственное вещество; (6) проведения реакции модифицированного конъюгата полимер-лекарственное вещество, содержащего 2 различных лекарственных вещества так, чтобы полимер с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, или его производным, образовывал конъюгат, описанный в данном документе. Стадия (6) может повторяться, если 2 различных выделенных антитела или их антигенсвязывающих фрагментов, или их производных, необходимо конъюгировать с образованием конъюгата полимер-лекарственное вещество, содержащего два различных лекарственных вещества и два различных антитела или их антигенсвязывающих фрагмента. Стадия (4) может выполняться после стадии (1) так, чтобы модифицированный полимер содержал две различные функциональные группы, которые могут реагировать с двумя различными лекарственными веществами или их производными. В данном варианте реализации изобретения модифицированный полимер, содержащий две различные функциональные группы, которые могут реагировать с двумя различными лекарственными веществами или их производными, могут дополнительно модифицировать так, чтобы он содержал функциональную группу, которая может реагировать с функциональной группой антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; перед проведением реакции модифицированного полимера с любым из двух лекарственных веществ (стадия (3) и стадия (5) или антителом или его антигенсвязывающим фрагментом (стадия (6)).

В некоторых типовых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в данном документе, находят применение в биомедицинских применениях, таких как доставка лекарственных веществ и тканевая инженерия, а полимерный носитель является биосовместимым и биоразлагаемым. В некоторых вариантах реализации изобретения носитель является растворимым полимером, наночастицей, гелем, липосомой, мицеллой, нитью, имплантом и т.д. В некоторых вариантах реализации изобретения термин "растворимый полимер" охватывает биоразлагаемый биосовместимый полимер, такой как полиаль (например, гидрофильный полиацеталь или поликеталь). В некоторых других вариантах реализации изобретения носитель представляет собой полностью синтетический, полусинтетический или встречающийся в природе полимер. В некоторых других вариантах реализации изобретения носитель является



гидрофильным. Примеры подходящего полимерного носителя для получения конъюгатов, описанных в данном документе, описаны в патенте США № 8815226, содержание которого тем самым включено в полном объеме путем ссылки.

В одном варианте реализации изобретения полимерный носитель содержит единицы формулы (IV)



(IV),

где X' указывает заместитель для гидроксильной группы полимерного скелета. Как показано в формуле (IV) и других формулах, описанных в данном документе, каждая полиацетальная единица имеет единственную гидроксильную группу, присоединенную к глицериновому фрагменту единицы, а группа X', присоединена к гликоальдегидному фрагменту единицы. Данное действие выполняется исключительно для удобства и его следует истолковывать так, что полимер, имеющий формулу (IV) и другие формулы, описанные в данном документе, может содержать случайное распределение единиц, имеющих группу X' (или другой заместитель, такой как линкер, содержащий малеимидный конец), присоединенную к гликоальдегидному фрагменту единиц, и единиц, имеющих единственную группу X' (или другой заместитель, такой как линкер, содержащий малеимидный конец), присоединенную к глицериновому фрагменту единиц, а также единиц, имеющих две группы X' (или других заместителей, таких как линкер, содержащий малеимидный конец), с одним присоединенным гликоальдегидным фрагментом и другим присоединенным глицериновым фрагментом единиц.

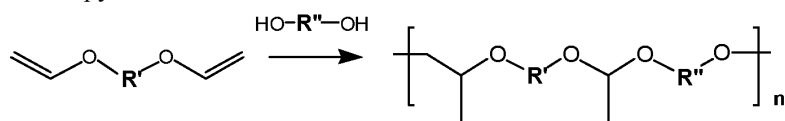
В одном варианте реализации изобретения биоразлагаемые биосовместимые полиали, подходящие для практической реализации настоящего изобретения, имеют молекулярную массу между около 0,5 и около 300 кДа. Например, биоразлагаемые биосовместимые полиали имеют молекулярную массу между около 1 и около 300 кДа (например, между около 1 и около 200 кДа, между около 2 и около 300 кДа, между около 2 и около 200 кДа, между около 5 и около 100 кДа, между около 10 и около 70 кДа, между около 20 и около 50 кДа, между около 20 и около 300 кДа, между около 40 и около 150 кДа, между около 50 и около 100 кДа, между около 2 и около 40 кДа, между около 6 и около 20 кДа, или между около 8 и около 15 кДа). Например, биоразлагаемый биосовместимый полиаль, применяемый для полимерного каркаса или конъюгата, описанного в данном документе, представляет собой РНФ, имеющий молекулярную массу между около 2 и около 40 кДа (например, около 2-20 кДа, 3-15 кДа или 5-10 кДа.)

Способы получения полимерных носителей (например, биосовместимых биоразлагаемых полимерных носителей), подходящих для конъюгации с модификаторами, известны в данной области техники. Например, руководство по синтезу можно найти в патентах США № 5811510; 5863990; 5958398; 7838619; 7790150 и 8685383. Квалифицированный практик должен знать, как адаптировать эти методы для получения полимерных носителей для применения в практической реализации по данному изобретению.

В одном варианте реализации изобретения способ создания биоразлагаемого биосовместимого полиального конъюгата по данному изобретению содержит процесс, с помощью которого подходящий полисахарид объединяют с эффективным количеством гликоль-специфического окисляющего агента с образованием альдегидного интермедиата. Альдегидный интермедиат, который сам по себе является полиалем, затем может восстанавливаться до соответствующего полиола, сукцинилированного и связанного с одним или более подходящими модификаторами с образованием биоразлагаемого биосовместимого полиального конъюгата, содержащего сукцинамид-содержащие связи.

В другом предпочтительном варианте реализации изобретения полностью синтетические биоразлагаемые биосовместимые полиали для применения в настоящем изобретении могут получать путем проведения реакции подходящего инициатора с подходящим соединением-предшественником.

Например, полностью синтетические полиали могут получать путем конденсации сложных эфиров винила с защищенными замещенными диолами. Могут использоваться другие методы, такие как полимеризация с раскрытием цикла, в которых эффективность метода может зависеть от степени замещения и объемности защитных групп



Среднему специалисту в данной области техники будет ясно, что системы растворителей, катализаторы и другие факторы можно оптимизировать для получения продуктов с высокой молекулярной массой.

В некоторых вариантах реализации изобретения носитель представляет собой РНФ.

В вариантах реализации изобретения полимерный носитель представляет собой РНФ, имеющий ин-

декс полидисперсности (PDI)  $\leq 1,5$ ; например,  $<1,4$ ;  $<1,3$ ;  $<1,2$  или  $<1,1$ .

Например, для конъюгирования выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 40 до 200 кДа, полимерный носитель каркаса представляет собой полиацеталь, например, РНФ, имеющий молекулярную массу (например, ММ немодифицированного РНФ) в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа).

Например, для конъюгирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 40 до 80 кДа, полимерный носитель каркаса, описанный в данном документе, представляет собой полиацеталь, например, РНФ, имеющий молекулярную массу (например, ММ немодифицированного РНФ) в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа). Например, РНФ имеет молекулярную массу около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 кДа.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в этом диапазоне молекулярных масс, включает, но не ограничивается ими, например, фрагменты антител, такие как, например, Fab.

Например, для конъюгирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 60 до 120 кДа, полимерный носитель каркаса, описанный в данном документе, представляет собой полиацеталь, например, РНФ, имеющий молекулярную массу (например, ММ немодифицированного РНФ) в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа). Например, РНФ имеет молекулярную массу около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 кДа.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в этом диапазоне молекулярных масс включает, но не ограничивается ими, например, фрагменты антител, такие как, например, фрагменты антител верблюдовых, Fab2, scFvFc и тому подобные.

Например, для конъюгирования антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, имеющего молекулярную массу от 140 до 180 кДа или от 140 до 150 кДа, полимерный носитель каркаса, описанный в данном документе, представляет собой полиацеталь, например, РНФ, имеющий молекулярную массу (например, ММ немодифицированного РНФ) в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа (например, около 2-20 кДа или около 3-15 кДа, или около 5-10 кДа). Например, РНФ имеет молекулярную массу около 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 или 15 кДа.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент в этом диапазоне молекулярных масс, включает, но не ограничивается ими, например, полноразмерные антитела, такие как, IgG, IgM.

Биоразлагаемые биосовместимые конъюгаты, описанные в данном документе, могут получать с соблюдением требуемых требований к биоразлагаемости и гидрофильности. Например, при физиологических условиях может достигаться баланс между биоразлагаемостью и стабильностью. Например, известно, что молекулы с молекулярными массами более определенного порогового значения (обычно, больше 40-100 кДа, в зависимости от физической формы молекулы) не экскретируются через почки как малые молекулы и могут выводиться из организма только через поглощение клетками и разрушение во внутриклеточных компартментах, в первую очередь лизосомами. Данное наблюдение дает пример как функционально устойчивые все еще биоразлагаемые материалы могут конструироваться путем модуляции их стабильности при общих физиологических условиях (рН  $7,5 \pm 0,5$ ) и лизосомальном рН (рН около 5). Например, известно, что гидролиз ацетальных и кетальных групп катализируется кислотами, поэтому полиали будут, в общем, менее стабильны в кислотном лизосомальном окружении, чем, например, в плазме крови. Каждый может разработать испытание для сравнения профиля деградации полимера, например, при рН 5 и рН 7,5 при 37°C в водной среде и таким образом для определения ожидаемого баланса стабильности полимера в нормальном физиологическом окружении и в "расщепляющем" лизосомальном компартменте после поглощения клетками. Целостность полимера может измеряться в таких испытаниях, как, например, эксклюзионная ВЭЖХ. Специалист в данной области техники может выбрать другой подходящий способ для изучения различных фрагментов разрушенных конъюгатов, описанных в данном документе.

Во многих случаях будет предпочтительным, чтобы при рН~7,5 эффективный размер полимера не изменялся на выявляемом уровне в течение от 1 до 7 суток и сохранялся в пределах 50% оригинального размера полимера в течение по меньшей мере нескольких недель. С другой стороны, при рН 5 полимер предпочтительно должен выявляемо разрушаться в течение от 1 до 5 суток и полностью превращаться в фрагменты с низкой молекулярной массой в пределах временных рамок от двух недель до нескольких месяцев. Хотя, в некоторых случаях может быть предпочтительным более быстрое разрушение, в общем, может быть более желательным, чтобы полимер разрушался в клетках со скоростью, которая не превышает скорость метаболического превращения или экскреции фрагментов полимера клетками. Соответственно, в некоторых вариантах реализации изобретения ожидается, что конъюгат по данному изобретению является биоразлагаемым, в частности, при поглощении клетками, и относительно "инертным" по отношению к биологическим системам. Продукты деградации носителя предпочтительно являются незагрязненными и значительно не сдвигают рН окружения. Предполагается, что насыщенность спиртовыми

группами может обеспечить низкую скорость распознавания полимера рецепторами клеток, в частности фагоцитами. Полимерные скелеты по данному изобретению, в целом, почти не содержат антигенных детерминант (характерных, например, для некоторых полисахаридов и полипептидов) и, в целом, не включают жесткие структуры, способные к захватыванию во взаимодействиях типа "ключ-замок" *in vivo*, хотя последние являются желательными. Таким образом, растворимые перекрестно сшитые твердые конъюгаты, описанные в данном документе, прогнозируемо имеют низкую токсичность и биоадгезивность, что делает их подходящими для ряда биомедицинских применений.

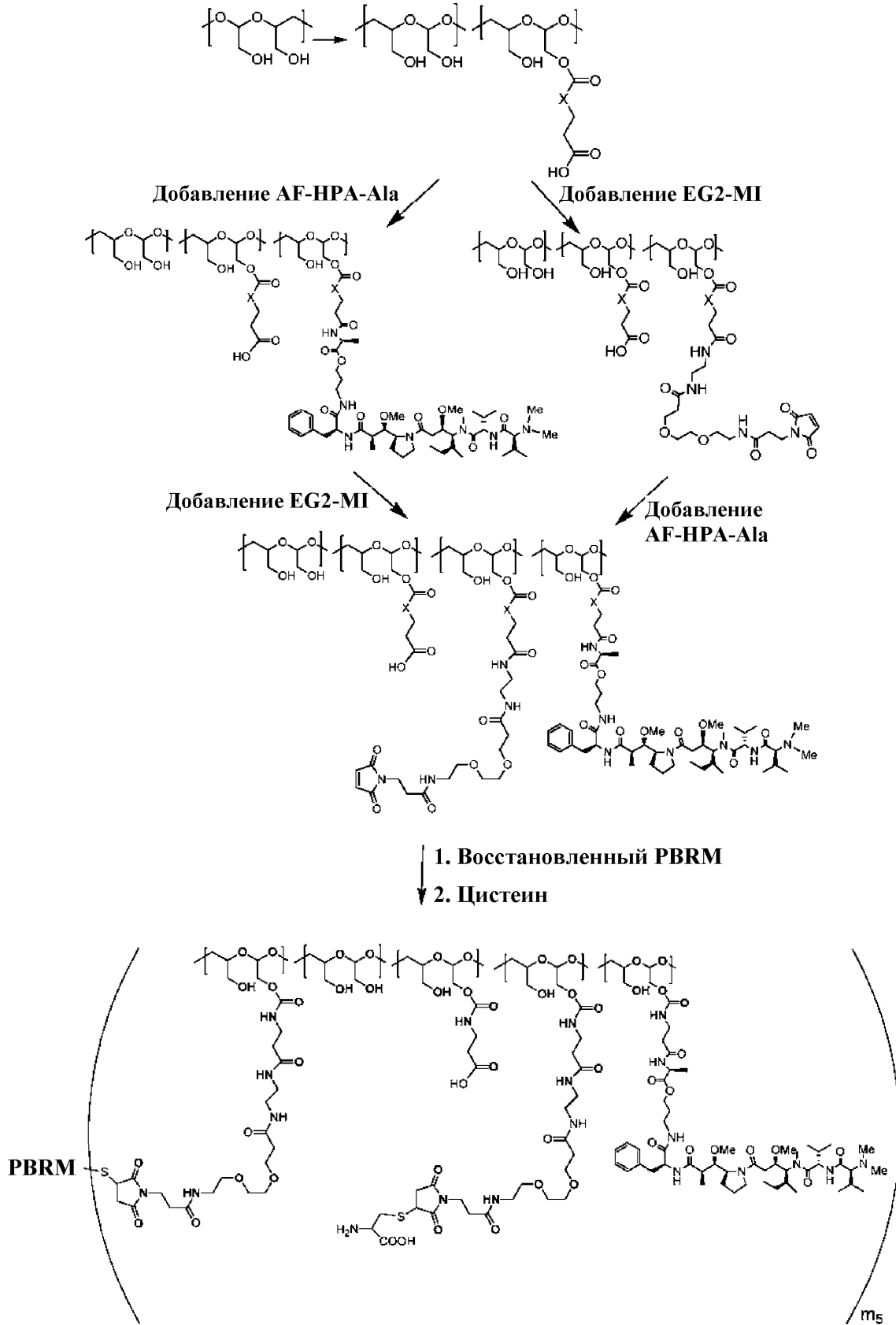
В некоторых вариантах реализации изобретения по данному изобретению биоразлагаемые биосовместимые конъюгаты могут образовывать линейную или разветвленную структуру. Например, биоразлагаемые биосовместимые полиалльные конъюгаты по данному изобретению могут быть хиральными (оптически активными). Необязательно биоразлагаемые биосовместимые полиалльные конъюгаты по данному изобретению могут быть скалемическими.

В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в данном документе, являются водорастворимыми. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в данном документе, являются нерастворимыми в воде. В некоторых вариантах реализации новаторский конъюгат находится в твердой форме. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в данном документе, являются коллоидами. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в данном документе, находятся в форме частиц. В некоторых вариантах реализации изобретения конъюгаты, описанные в данном документе, находятся в форме геля.

На схеме 1 ниже показана схема синтеза для получения полимерного каркаса лекарственного вещества, описанного в данном документе. В одном варианте реализации изобретения конъюгаты получают в несколько стадий: (1) полимер, PNF модифицируют для обеспечения содержания фрагмента COOH (например,  $-C(O)-X-(CH_2)_2-COOH$ ); (2) затем полимер дополнительно модифицируют так, чтобы он содержал малеимидный фрагмент (например, EG2-MI), который может реагировать с функциональной группой PBRM; (3) модифицированный полимер, содержащий две различные функциональные группы, приводят в реакцию с функциональной группой лекарственного вещества или его производного (например, AF-NPA-Ala) с образованием конъюгата полимер-лекарственное вещество; (4) дисульфидные связи PBRM восстанавливают; (5) затем восстановленный PBRM реагирует с конъюгатом полимер-лекарственное вещество с образованием конъюгата белок-полимер-лекарственное вещество и (6) оставшийся малеимидный фрагмент необязательно приводят в реакцию с малеимидоблокирующим соединением (например, цистеином).

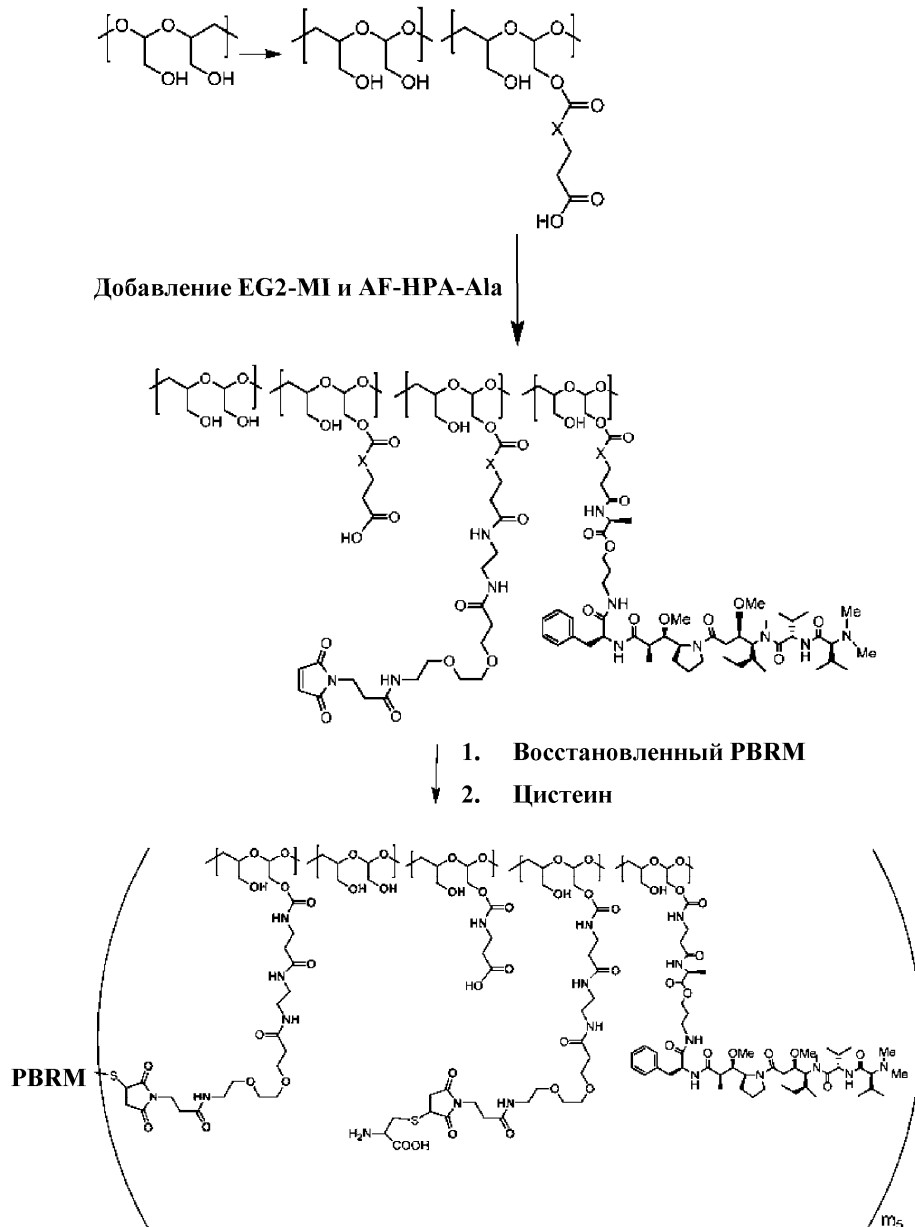
В другом варианте реализации изобретения порядок стадий (2) и (3) может быть обращен, как изображено на правой стороне пути синтеза на схеме 1 ниже.

Схема 1



В еще одном варианте реализации изобретения стадии (2) и (3) выше выполняются одновременно, как изображено ниже на схеме 2.

Схема 2



### Применение антител против HER2

Следует учитывать, что введение терапевтических средств в соответствии с изобретением будет выполняться с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими веществами, которые включены в лекарственные формы для обеспечения переноса, доставки, переносимости и тому подобного. Множество соответствующих лекарственных форм может быть найдено в формуляре, известном для всех фармацевтических химиков: Remington's Pharmaceutical Sciences (15th ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), в частности, глава 87 написанная Blaug, Seymour, в данном документе. Эти лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, гели, воски, масла, липиды, содержащие липидные (катионные или анионные) везикулы (такие как Lipofectin™), ДНК-конъюгаты, безводные абсорбирующие пасты, эмульсии масло-в-воде и вода-в-масле, карбовакс-эмульсии (полиэтиленгликоли различных молекулярных масс), мягкие гели и мягкие смеси, содержащие карбовакс. Любые предшествующие смеси могут подходить для способов лечения и терапии в соответствии с настоящим изобретением, при условии, что активный ингредиент в лекарственной форме не инактивируется лекарственной формой, а лекарственная форма физиологически совместима и переносима при данном пути введения. См. также Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." Regul. Toxicol Pharmacol. 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." Int. J. Pharm. 203(1-2): 1-60 (2000), Charman W.N. "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts" J. Pharm. Sci. 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients

for parenteral formulations" PDA J. Pharm. Sci. Technol. 52:238-311 (1998) и ссылки в этих документах для дополнительной информации, относящейся к лекарственным формам, вспомогательным веществам и носителям, хорошо известным фармацевтическим химикам.

В одном варианте реализации изобретения в качестве терапевтических средств могут применяться антитела, их фрагменты и/или их конъюгаты, описанные в данном документе. Такие средства, в целом, будут использоваться для диагностики, прогнозирования, контроля, лечения, облегчения, предотвращения и/или замедления прогрессирования заболевания или патологии, связанной, например, с аномальной активностью и/или экспрессией HER2 в организме субъекта. Лечебный режим выполняется путем идентификации субъекта, например пациента-человека, страдающего от (или имеющего риск развития) заболевания или нарушения, связанного с аномальной активностью и/или экспрессией HER2, например ракового заболевания, с использованием стандартных способов. Препарат антитела, предпочтительно антитела, имеющего высокую специфичность и высокую аффинность к своему антигену-мишени, вводят субъекту, и он благодаря своему связыванию с мишенью, в целом, будет проявлять воздействие. Введение антитела может прекращать или ингибировать, или нарушать функцию передачи сигнала мишени. Введение антитела может прекращать или ингибировать, или нарушать связывание мишени с эндогенным лигандом, с которым оно связывается естественным образом. Например, антитело связывается с мишенью и модулирует, блокирует, ингибирует, снижает, обеспечивает антагонизм, нейтрализует или иным образом нарушает активность или экспрессию HER2.

Заболевания или нарушения, связанные с аномальной активностью и/или экспрессией HER2, включают, но не ограничиваются раковым заболеванием. Целевое раковое заболевание может быть раком анального канала, астроцитомой, лимфомой, раком головы и шеи, печени, яичек, шейки матки, саркомой, гемангиомой, раком пищевода, глаза, гортани, рта, мезотелиомой, раком кожи, миеломой, раком ротовой полости, горла, мочевого пузыря, молочной железы, матки, яичников, простаты, легких, кишечника, поджелудочной железы, почек или раком желудочно-кишечного тракта.

В другом аспекте изобретения заболевания или нарушения представляют собой раковое заболевание, выбранное из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) и рака яичника.

В целом, облегчение или лечение заболевания или нарушения вовлекает облегчение одного или более симптомов, или медицинских проблем с заболеванием или нарушением. Например, в случае рака, терапевтически эффективным количеством лекарственного вещества может достигаться одно или комбинация из следующего: снижение количества раковых клеток; снижение размера опухоли; ингибирование (т.е. снижение до некоторой степени и/или остановка) инфильтрации раковых клеток в периферические органы; ингибирование метастазов опухоли; до некоторой степени ингибирование роста опухоли и/или до некоторой степени облегчение одного или более симптомов, связанных с раковым заболеванием. В некоторых вариантах реализации изобретения композиция, описанная в данном документе, может применяться для предотвращения появления или повторения у субъекта заболевания или нарушения.

Терапевтически эффективное количество антитела, его фрагмента и/или его конъюгата, описанных в данном документе, в целом относится к количеству, необходимому для достижения цели лечения. Как отмечено выше, это может быть взаимодействие связывания между антителом и его антигеном-мишенью, что в некоторых случаях, нарушает функционирование мишени. Количество, которое требуется вводить, будет к тому же зависеть от аффинности связывания антитела со своим специфическим антигеном и также будет зависеть от скорости, с которой введенное антитело истощается в свободном объеме другого субъекта, которому оно вводится. Обычные диапазоны терапевтически эффективного дозирования антитела или фрагмента антитела, и/или его конъюгата, описанных в данном документе, могут составлять, путем неограничивающего примера, от около 0,1 мг/кг массы тела до около 50 мг/кг массы тела, от около 0,1 мг/кг массы тела до около 100 мг/кг массы тела или от около 0,1 мг/кг массы тела до около 150 мг/кг массы тела. Обычные значения частоты дозирования могут находиться в диапазоне, например, от двух раз в сутки до одного раза в месяц (например, раз в сутки, раз в неделю; один раз каждую вторую неделю; один раз каждые 3 недели или раз в месяц). Например, конъюгаты ХМТ 1519, описанные в данном документе, такие как конъюгат ХМТ 1519-(EG2-MI-(PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) или конъюгат ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) могут вводиться (например, как однократная доза еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или ежемесячно) в дозе от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг (например, 0,2, 0,5, 0,67, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг). Например, конъюгаты ХМТ 1519, описанные в данном документе, такие как конъюгат ХМТ 1519-(EG2-MI-(PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) или конъюгат ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) могут вводиться (например, как однократная доза еженедельно, каждые 2 недели, каждые 3 недели или ежемесячно) в дозе от около 0,1 мг/кг до около 20 мг/кг (например, 0,2, 0,5, 0,67, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг) для лечения рака молочной железы с низкой экспрессией HER2 или рака желудочно-кишечного тракта с низкой экспрессией HER2.

Эффективность лечения определяется в сочетании с любым известным способом диагностики или лечения конкретного связанного с HER2 нарушения. Облегчение одного или более симптомов связанного с HER2 нарушения указывает на то, что антитело обладает клинической пользой.

Способы скрининга антител, которые обладают требуемой специфичностью, включают, но не ограничиваются ими, твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА) и другие иммунологически опосредованные методики, известные в данной области техники.

В другом варианте реализации изобретения антитело, направленное против HER2, может применяться в способах, известных в данной области техники, относящихся к локализации и/или количественному определению HER2 (например, для применения при измерении уровней HER2 в соответствующих физиологических образцах, для применения в диагностических способах, для применения при визуализации белка и тому подобных). В данном варианте реализации изобретения антитело, специфическое к HER2 или его производному, фрагменту, аналогу или гомологу, которое содержит полученный из антитела антигенсвязывающий домен, применяют как фармакологически активные соединения (называемые в данном документе как "терапевтические средства").

В другом варианте реализации изобретения антитело, специфическое для HER2, используют для выделения полипептида HER2, стандартными методиками, такими как использующие иммуноаффинность, хроматографию или иммунопреципитацию. Антитела, направленные против белка HER2 (или его фрагмента) могут использоваться в диагностических целях для контроля уровней белка в ткани в виде части клинической процедуры исследований, например для определения эффективности данного лечебного режима. Выявление может быть облегчено путем связывания (т.е. физического связывания) антитела с выявляемым веществом. Примеры выявляемых веществ включают различные ферменты, простетические группы, флуоресцентные вещества, люминесцентные вещества, биолюминесцентные вещества и радиоактивные вещества. Примеры подходящих ферментов включают пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу,  $\beta$ -галактозидазу или ацетилхолинэстеразу; примеры подходящих комплексов простетических групп включают стрептавидин/биотин и авидин/биотин; примеры подходящих флуоресцентных веществ включают умбеллиферон, флуоресцеин, дансилхлорид или фикоэритрин; пример люминесцентного вещества включает люминол; примеры биолюминесцентных веществ включают люциферазу, люциферин и аэкваин, а примеры подходящих радиоактивных веществ включают  $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ,  $^{35}\text{S}$  или  $^3\text{H}$ .

В еще одном варианте реализации изобретения антитело в соответствии с данным изобретением может применяться как средство для выявления в образце присутствия белка HER2 (или его фрагмента). В некоторых вариантах реализации изобретения антитело содержит выявляемую метку. Антитела являются поликлональными или, предпочтительнее, моноклональными. Применяют интактное антитело или его фрагмент (например,  $F_{ab}$ , scFv или  $F_{(ab)2}$ ). Термин "меченый", в отношении зонда или антитела предназначен для охватывания непосредственного введения метки в зонд или антитело путем связывания (т.е. физического связывания) выявляемого вещества с зондом или антителом, а также опосредованного введения в зонд или антитело путем проведения реакции с другим реактивом, который мечен непосредственно. Примеры опосредованного введения метки включают выявление первичного антитела с использованием флуоресцентно меченого вторичного антитела и меченого на конце ДНК-зонда с биотином так, чтобы он мог выявляться флуоресцентно меченым стрептавидином. Термин "биологический образец" предназначен для включения тканей, клеток и биологических жидкостей, выделенных у субъекта, а также тканей, клеток и жидкостей, присутствующих в организме субъекта. Поэтому в пределы использования термина "биологический образец" включена кровь и фракция или компонент крови, включая сыворотку крови, плазму крови или лимфу. Другими словами, метод выявления, описанный в данном документе, может применяться для выявления анализируемой мРНК, белка или геномной ДНК в биологическом образце *in vitro*, а также *in vivo*. Например, методики *in vitro* для выявления анализируемой мРНК включают нозерн гибридизации и гибридизации *in situ*. Методики *in vitro* для выявления анализируемого белка включают твердофазные иммуноферментные анализы (ИФА), вестерн блоты, иммунопреципитации и иммунофлуоресценцию. Методики *in vitro* для выявления анализируемой геномной ДНК включают Саузерн гибридизации. Процедуры для проведения иммуноанализов описаны, например, в "ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology", Vol. 42, J.R. Crowther (Ed.) Human Press, Totowa, NJ, 1995; "Immunoassay", E. Diamandis and T. Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, CA, 1996 и "Practice and Theory of Enzyme Immunoassays", P. Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985. Вместе с тем методики *in vivo* для выявления анализируемого белка включают внедрение в организм субъекта меченого антитела против анализируемого белка. Например, антитело может быть меченым радиоактивным маркером, присутствие и локализация которого в организме субъекта может быть выявлена стандартными методиками визуализации.

Терапевтическое введение и лекарственные формы антител против HER2.

В фармацевтические композиции, пригодные для введения, могут быть включены антитела, их производные, фрагменты, аналоги и гомологи и/или их конъюгаты, описанные в данном документе (также называемые в данном документе как "активные соединения"). Принципы и соображения, задействованные при получении таких композиции, а также руководство по выбору компонентов предложены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 19th ed. (Alfonso R. Gennaro et al., editors) Mack Pub. Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994 и Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, Vol. 4), 1991, M. Dekker, New York.

Такие композиции, как правило, содержат антитело, его фрагменты и/или его конъюгаты и фармацевтически приемлемый носитель. Когда используются фрагменты антител, то предпочтительным является наименьший ингибирующий фрагмент, который специфически связывается с доменом связывания белка-мишени. Например, на основе последовательностей переменных участков антитела, могут быть разработаны пептидные молекулы, которые сохраняют способность к связыванию последовательности белка-мишени. Такие пептиды могут быть синтезированы химически и/или получены технологией рекомбинантных ДНК. (См., например, Marasco et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993)).

Как используется в данном документе, термин "фармацевтически приемлемый носитель" предназначен для включения любого и всех растворителей, дисперсионных сред, покрытий, антибактериальных и противогрибковых средств, изотонических агентов и замедляющих абсорбцию агентов и тому подобного, совместимого с фармацевтическим введением.

Подходящие носители описаны в самом последнем издании Remington's Pharmaceutical Sciences, стандартном исходном тексте в данной области, который включен в данный документ путем ссылки. Предпочтительные примеры таких носителей или растворителей включают, но не ограничиваются ими, воду, солевой раствор, раствор Рингера, раствор декстрозы и 5% раствор сывороточного альбумина человека. Могут также применяться липосомы и неводные носители, такие как нелетучие масла. Применение таких сред и средств для фармацевтически активных субстанций хорошо известно в данной области техники. За исключением того случая, когда любая традиционная среда или средства, применение которых предполагается для данных композициях, являются несовместимыми с активным соединением.

Лекарственные формы, предназначенные для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Данное условие легко достижимо проведением фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

Фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, готовят в виде лекарственной формы, которая должна быть совместимой с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают парентеральное, например внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляция), трансдермальное (например, местное), трансмукозальное и ректальное введение. Растворы или суспензии, применяемые для парентерального, внутрикожного или подкожного применения, могут включать следующие компоненты: стерильный растворитель, такой как вода для инъекций, солевой раствор, нелетучие масла, полиэтиленгликоли, глицерин, полиэтиленгликоль и другие синтетические растворители, антибактериальные агенты, такие как бензиновый спирт или метилпарабены; антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота или бисульфит натрия; хелатирующие агенты, такие как этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК); буферные вещества, такие как ацетаты, цитраты или фосфаты, и агенты для корректирования тоничности, такие как хлорид натрия или декстроза. Значение pH может корректироваться кислотами или основаниями, такими как хлористоводородная кислота или гидроксид натрия. Парентеральный препарат может быть помещен в ампулы, одноразовые шприцы или многодозовые флаконы, сделанные из стекла или пластмассы.

Фармацевтические композиции, подходящие для инъекционного применения, включают стерильные водные растворы (если они водорастворимые) или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального приготовления стерильных инъекционных растворов, или дисперсии. Для внутривенного введения подходящие носители включают физиологический солевой раствор, бактериостатическую воду, Stremophor EL™ (BASF, г. Парсиппини, штат Нью-Джерси) или фосфатно-солевой буферный раствор (ФСБ). Во всех случаях композиция должна быть стерильной и должна быть жидкой до той степени, которая допускает легкое введение шприцем. Она должна быть стабильной в условиях производства и хранения и должна быть защищена от контаминирующего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может быть растворителем или дисперсионной средой, содержащей, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и тому подобные) и их подходящие смеси. Надлежащая текучесть может поддерживаться, например, путем использования покрытия, такого как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсии и путем использования сурфактантов. Предотвращение действия микроорганизмов может достигаться различными антибактериальными и противогрибковыми агентами, например парабенами, хлорбутанолом, фенолом, аскорбиновой кислотой, тимеросалом и тому подобными. Во многих случаях будет предпочтительным включать в композицию изотонические агенты, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, хлорид натрия. Пролонгированная абсорбция инъекционных композиций может быть обусловлена включением в композицию агента, который замедляет абсорбцию, например, моностеарата алюминия или желатина.

Стерильные инъекционные растворы могут готовить введением активного соединения в требуемом количестве в соответствующий растворитель, по необходимости, с одним или комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, с последующей стерилизацией фильтрованием. В целом, дисперсии готовят введением активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсионную среду и необходимые другие ингредиенты из перечисленных выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, способы приготовления включают сушку под вакуумом и лиофильную сушку, которые дают порошок активного ингредиента плюс любой требуемый ингредиент из его предварительно простерилизованного фильтрованием раствора.



Пероральные композиции обычно включают инертный растворитель или съедобный носитель. Они могут быть помещены в желатиновые капсулы или спрессованы в таблетки. С целью перорального терапевтического введения активное соединение может быть введено в состав со вспомогательными веществами и применяться в виде таблеток, пастилок или капсул. Пероральные композиции также могут готовиться с использованием жидкого носителя для применения в виде жидкости для полоскания рта, в которой соединение в жидком носителе применяют перорально, полощут рот и сплевывают или проглатывают. Как часть композиции могут включать фармацевтически совместимые связывающие агенты и/или адьювантные вещества. Таблетки, пилюли, капсулы, пастилки и тому подобные могут содержать любой из следующих ингредиентов или соединений сходной природы: связующее вещество, такое как микрокристаллическая целлюлоза, трагакантовая камедь; вспомогательное вещество, такое как крахмал или лактоза, разрыхлитель, такой как альгиновая кислота, Primogel или кукурузный крахмал; смазывающее вещество, такое как стеарат магния или Sterotes; способствующее скольжению вещество, такое как коллоидный диоксид кремния; подсластитель, такой как сахароза или сахарин или вкусо-ароматическое вещество, такое как мятный ароматизатор, метилсалицилат или апельсиновый ароматизатор.

Для введения путем ингаляции соединения доставляют в форме аэрозольного спрея из контейнера под давлением или из распылителя, который содержит подходящий пропеллент, например, газ, такой как диоксид углерода, или из небулайзера.

Системное введение также может проводиться трансмукозальными или трансдермальными способами. Для трансмукозального или трансдермального введения в лекарственной форме для проникновения через барьер используют соответствующие пенетранты. Такие пенетранты обычно являются известными в данной области техники и включают, например, для трансмукозального введения, детергенты, соли желчных кислот и производные фузидовой кислоты. Трансмуккозальное введение может выполняться посредством применения назальных спреев или суппозиторий. Для трансдермального введения активные соединения готовят в виде мазей, бальзамов, гелей или кремов, как обычно известно в данной области техники.

Соединения также могут готовить в форме суппозиторий (например, с традиционной суппозиторной основой, такой как масло какао или другие глицериды) или удерживающих клизм для ректальной доставки.

В одном варианте реализации изобретения активные соединения готовят с носителем, который будет защищать данное соединение от быстрого выведения из организма, с получением таких лекарственных форм как формы с замедленным/контролируемым высвобождением, включая импланты и микроинкапсулированные системы доставки. Могут использоваться биоразлагаемые биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, полиортоэфир и полимолочная кислота. Способы получения таких лекарственных форм будут очевидны специалистам в данной области техники.

Например, активные ингредиенты могут быть захвачены в микрокапсулы, приготовленные, например, путем методик коацервации или путем полимеризации на границе раздела фаз, например, соответственно, в микрокапсулы из гидроксиметилцеллюлозы или желатиновые капсулы и поли(метилметакрилатные) микрокапсулы, в коллоидальные системы доставки (например, липосомы, микросферы, микроэмульсии, наночастицы и микрокапсулы) или в макроэмульсии.

Могут быть приготовлены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие препараты с замедленным высвобождением включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем матрицы находятся в форме профилированных изделий, например пленок или микрокапсул. Примеры матриц для замедленного высвобождения включают полиэфир, гидрогели (например, поли(2-гидроксиэтилметакрилат) или поли(виниловый спирт), полилактиды (пат. США № 3773919), сополимеры L-глутаминовой кислоты и  $\gamma$ -этил-L-глутамата, неразлагаемый этиленвинилацетат, разлагаемые сополимеры молочной кислоты-гликолиевой кислоты, такие как LUPRON DEPOT™ (инъекционные микросферы, состоящие из сополимера молочной кислоты-гликолиевой кислоты и лейпролида ацетата), и поли-D-(-)-3-гидроксимасляной кислоты. В то время как такие полимеры, как этиленвинилацетат и сополимер молочной кислоты-гликолиевой кислоты, способны высвобождать молекулы в течение более 100 суток, некоторые гидрогели высвобождают белки за более короткие промежутки времени.

Данные материалы также могут быть коммерчески получены в Alza Corporation и Nova Pharmaceuticals, Inc. Липосомные суспензии (включая липосомы, таргетирующие инфицированные клетки с моноклональными антителами к вирусным антигенам) также могут применяться как фармацевтически приемлемые носители. Они могут быть получены в соответствии со способами, известными специалистам в данной области техники, например, как описано в патенте США № 4522811.

Существенным преимуществом при приготовлении пероральных или парентеральных композиций в стандартной лекарственной форме является облегчение введения и однородность дозирования. Стандартная лекарственная форма, как используется в данном документе, относится к физически разделенным единицам, приспособленным для единичных дозировок субъекту, подлежащему лечению; каждая

единица содержит предварительно определенное количество активного соединения, рассчитанное на получение требуемого терапевтического эффекта, в сочетании с требуемым носителем. Описание стандартных лекарственных форм, описанных в данном документе, предопределяется и непосредственно зависит от индивидуальных свойств активного соединения и достигаемого конкретного терапевтического эффекта, и ограничений, присущих данной области техники по рецептурному приготовлению такого активного соединения для лечения индивидов.

Фармацевтические композиции могут заключать в контейнер, упаковку или распылитель вместе с инструкциями по введению.

Лекарственная форма также может содержать больше одного активного соединения, при необходимости для конкретного показания, подлежащего лечению, предпочтительно соединения с комплементарными видами активности, которые не оказывают неблагоприятного влияния друг на друга. В альтернативном варианте или в дополнение к этому, композиция может содержать средство, которое усиливает ее функционирование, такое как, например, цитотоксическое средство, цитокин, химиотерапевтическое средство или ингибирующее рост средство. Такие молекулы соответствующим образом присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предполагаемых целей.

В одном варианте реализации изобретения активные соединения вводят в комбинированной терапии, т.е. в сочетании с другими средствами, например, терапевтическими средствами, которые пригодны для лечения патологических состояний или нарушений, такие как различные формы рака, аутоиммунных нарушений и воспалительных заболеваний. Термин "в комбинации" в данном контексте означает, что средства даются практически в одно время либо одновременно, либо последовательно. Если даются последовательно, то при проявлении результата введения второго соединения, первое из двух соединений предпочтительно все еще выявляется в эффективной концентрации в месте лечения.

Например, комбинированная терапия может включать одно или более антител, их фрагментов и/или их конъюгатов, описанных в данном документе, совместно приготовленных в лекарственной форме и/или совместно вводимых с одним или более дополнительными антителами, например антителом против HER2, антителом-ингибитором димеризации HER2 или комбинацией антитела против HER2 и антитела-ингибитора димеризации HER2, такого как, например, трастузумаб, пертузумаб или комбинации трастузумаба и пертузумаба, или биосимиляра трастузумаба и/или пертузумаба, или комбинации биосимиляров.

Например, комбинированная терапия может включать одно или более антител, их фрагментов и/или их конъюгатов, описанных в данном документе, совместно приготовленных в лекарственной форме и/или совместно вводимых с одним или более дополнительными антителами, например таксаном (паклитаксел или доцетаксел), антрациклином (доксорубин или эпирубин), циклофосфамидом, капецитабином, тамоксифеном, летрозолом, карбоплатином, гемцитабином, цисплатином, эрлотинибом, иринотеканом, фторурацилом или оксалиплатином. Такие комбинированные виды терапии могут преимущественно использовать более низкие дозировки вводимых терапевтических средств, таким образом избегая возможные токсические эффекты или осложнения, связанные с различными монотерапиями.

В некоторых вариантах реализации изобретения дополнительное(ые) терапевтическое(ие) средство(а), применяемые в комбинации с антителом, его фрагментом и/или его конъюгатом, описанными в данном документе, представляют собой средства, которые нарушают различные этапы при иммунной и/или воспалительной реакции. В одном варианте реализации изобретения одно или более антител, описанных в данном документе, могут совместно готовить в лекарственной форме и/или совместно вводить с одним или более дополнительными средствами.

Диагностические и профилактические составы.

Антитело против HER2, его антигенсвязывающий фрагмент и/или его конъюгат, описанные в данном документе, применяются в диагностических и профилактических составах. В одном варианте реализации изобретения антитело против HER2, его антигенсвязывающий фрагмент и/или его конъюгат, описанные в данном документе вводят пациентам, у которых существует риск развития одного или более из вышеупомянутых заболеваний, таких как, например, без ограничения, рак. Предрасположенность органов пациента к одному или более из вышеупомянутых показаний может определяться с использованием генотипических, серологических или биохимических маркеров.

В другом варианте реализации изобретения антитело против HER2, его антигенсвязывающий фрагмент и/или его конъюгат, описанные в данном документе вводят индивидам, у которых диагностировали клиническое показание, связанное с одним или более из вышеупомянутых заболеваний, таких как, например, без ограничения, рак. При диагностике антитело против HER2, его антигенсвязывающий фрагмент и/или его конъюгат, описанные в данном документе, вводят для облегчения или реверсирования влияний клинического показания, связанного с одним или более из вышеупомянутых заболеваний.

В другом варианте реализации изобретения способ идентификации пациента с раком молочной железы, поддающимся лечению описанными в данном документе конъюгатами, включает измерение статуса определенных характеристик образца опухоли, полученного из организма пациента, и идентификация пациента, как подходящего для лечения, на основании статуса определенных характеристик образца опухоли.

Антитела, описанные в данном документе, также пригодны для выявления HER2 в образцах, взятых у пациента и, соответственно, пригодны как диагностические средства. Например, антитела против HER2, описанные в данном документе, применяют в анализах *in vitro*, например, ИФА, для выявления уровней HER2 в образцах, взятых у пациента.

В одном варианте реализации изобретения антитело против HER2, описанное в данном документе, иммобилизируют на твердой подложке (например, лунке(ах) планшета для микротитрования). Иммобилизованное антитело служит в качестве захватывающего антитела для любого HER2, который может присутствовать в исследуемом образце. Перед приведением в контакт иммобилизованного антитела с образцом, взятым у пациента, твердую подложку промывают и обрабатывают блокирующим агентом, таким как белок молока или альбумин, для предотвращения неспецифической адсорбции анализируемого вещества.

Далее лунки обрабатывают исследуемым образцом, который ожидаемо содержит антиген, или раствором, содержащим стандартное количество антигена. Такой образец является, например, образцом сыворотки, взятой у субъекта, который ожидаемо несет уровни циркулирующего антигена, считающиеся диагностическими для наличия патологии. После смыывания исследуемого образца или стандарта твердую подложку обрабатывают вторым антителом, которое является меченым с возможностью выявления. Меченое второе антитело служит в качестве выявляемого антитела. Измеряют уровень выявляемой метки и определяют концентрацию антигена HER2 в исследуемом образце путем сравнения с калибровочной кривой, полученной при использовании стандартных образцов.

Следует учитывать, что на основании результатов, полученных с использованием антител против HER2, описанных в данном документе, в диагностическом анализе *in vitro*, предоставляется возможность определять у субъекта стадию заболевания на основании уровней экспрессии антигена HER2. Для данного заболевания образцы крови, взятые у субъектов, диагностируют как находящиеся на различных стадиях прогрессировать заболевания, и/или на различных этапах терапевтического лечения заболевания. С использованием популяции образцов, которая обеспечивает статистически значимые результаты для каждой стадии прогрессировать или терапии, может быть присвоен диапазон концентраций антигена, который может считаться характеристикой каждой обозначенной стадии.

Все публикации и патентные документы, цитируемые в данном документе, включены в данный документ путем ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ был конкретно и самостоятельно указан, как включенный в данный документ путем ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предполагает признание того, что любое утверждение, относящееся к предшествующему уровню техники, является составной частью любого признания, касательно его содержания или даты. Данное изобретение, до настоящего момента описанное путем описания в письменной форме, специалистами в данной области техники будет распознано, как изобретение, которое может практически осуществляться множеством вариантов реализации изобретения, и что предшествующее описание и примеры ниже приводятся в иллюстрирующих целях и не ограничивают последующую формулу изобретения.

### Примеры

Следующие рабочие примеры являются иллюстративными для линкеров, молекул лекарственных веществ и PBRM, и способов их получения. Они не предназначены для ограничения и специалисту в данной области техники будет понятно, что могут использоваться другие реактивы и методы.

#### Аббревиатуры.

На последующих схемах проведения реакций и в примерах синтеза используют следующие аббревиатуры. Этот перечень означает не соответствие всеохватывающему перечню аббревиатур, используемых в данной заявке, а представлен как дополнительные стандартные аббревиатуры, которые легко понятны специалистам в данной области органического синтеза, которые также могут использоваться на схемах синтеза и в примерах

AF-NPA	Ауристатин F-гидроксипропиламид
BSA	Бычий сывороточный альбумин
DMEM	Среда Игла в модификации Дульбекко
ФБС	Фетальная бычья сыворотка
HRP	Пероксидаза хрена
ФСБ	Фосфатно-солевой буферный раствор, 0,9% NaCl
ТМБ	3,3',5,5'-тетраметилбензидин

#### Общая информация.

Приобретали препарат Kadcyла® (адо-трастузумаб эмтанзин) для инъекций производства Genentech.

CDR идентифицировали по схеме нумерации Кабата.

Ингибирование роста опухоли (%TGI) определяли как процентную разницу медианных объемов опухолей (MTV) между получавшими лечение и контрольными группами.

Эффективность лечения определяли по частоте возникновения и величине регрессивных ответов по размеру опухоли, наблюдаемому во время лечения. Лечение может вызывать частичную регрессию (PR) или полную регрессию (CR) опухоли в организме животного. При ответе PR объем опухоли составлял 50% или меньше соответствующего объема на сутки 1 для трех последовательных измерений в течение хода исследования и был равен или превышал 13,5 мм для одного или более из этих трех измерений. При ответе CR объем опухоли составлял меньше чем 13,5 мм<sup>3</sup> для трех последовательных измерений в течение хода исследования. Животное с ответом CR при завершении исследования дополнительно классифицировали как выжившее без признаков наличия опухоли (TFS). Животных контролировали на наличие регрессивных ответов.

Очистку с использованием ВЭЖХ выполняли на колонке для полупрепаративного синтеза Phenomenex Gemini 5 мкм 110 Å, 250 × 10 мм, 5 мкм.

Эксклюзионную хроматографию (ЭХ) выполняли на колонке Tosoh Biosciences TSK gel G5000 (7,8 мм × 30 см, 10 мкм) или колонке Superose 12 (GE Healthcare).

Хроматографию со слабым катионным обменом (WCX) выполняли на колонке ProPac WCX-10 (94 мм × 250 мм) (ThermoFisher).

Во всех возможных случаях содержание лекарственного вещества определяли спектрофотометрически, в противном случае для количественного определения содержания лекарственного вещества выполняли ЖХ/МС или <sup>1</sup>H-ЯМР.

Содержание белка конъюгатов белок-полимер-лекарственное вещество определяли спектрофотометрически при 280 нм или методом ИФА.

Молекулярные массы полимерных конъюгатов (получали в виде кажущейся массы средних молекулярных масс или пиковых молекулярных масс) определяли ЭХ с либо полисахаридными, либо белковыми стандартами молекулярных масс. Конкретнее, для полимера или конъюгатов полимер-лекарственное вещество, использовали полисахаридный стандарт молекулярных масс, а для конъюгатов белок-лекарственное вещество-полимер использовали белковые стандарты. Если только не указано иное определяемая молекулярная масса полимерного носителя представляет собой массу средней молекулярной массы РНГ; а молекулярная масса конъюгата полимер-лекарственное вещество и конъюгатов белок-полимер-лекарственное вещество представляет собой пиковую молекулярную массу. Конъюгаты HER2-полимер-лекарственное вещество имеют пиковую молекулярную массу от около 170 кДа до около 230 кДа. Синтезированный/измеряемый полимер и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность ≤1,5.

Конъюгаты Her2-полимер-лекарственное вещество отделяли от остаточных непрореагировавших конъюгатов лекарственное вещество-полимер методом широкоохватной диафильтрации. При необходимости проводили дополнительную очистку методом эксклюзионной хроматографии и хроматографии WCX для удаления любых агрегированных конъюгатов Her2-полимер-лекарственное вещество. В целом, конъюгаты Her2-полимер-лекарственное вещество, как правило, содержали < 5% (мас./мас., например <2% мас./мас.) агрегированной фракции, определенной ЭХ; <0,5% (мас./мас., например, <0,1% мас./мас.) свободного (неконъюгированного) лекарственного вещества, определенного ОФ ВЭЖХ, или ЖХ-МС/МС; <1% (мас./мас.) свободного конъюгата полимер-лекарственное вещество, определенного ЭХ и/или ОФ ВЭЖХ, и <2% (мас./мас., например, <1% мас./мас.) неконъюгированного Her2, определенного ВЭЖХ-ХГВ (хроматография гидрофобных взаимодействий) и/или ВЭЖХ WCX. Восстановленные или частично восстановленные антитела получали с использованием методик, описанных в литературе, см., например, Francisco et al., Blood 102 (4): 1458-1465 (2003). Общую концентрацию лекарственного вещества (конъюгированного и неконъюгированного) определяли методом ЖХ-МС/МС.

Общие методики.

Общая методика А. Конъюгация полимера с линкером или лекарственным веществом.

В целом, конъюгацию полимера (РНФ-ВА или РНФ-ГА) с аминоксодержащим линкером, таким как, например, EG2-малеимид, или аминоксодержащим линкером-лекарственным веществом, таким как, например, AF-NPA-Ala, NPA-Ala, проводили в водном растворителе или смеси 10-90% органического/водного растворителей в присутствии активирующего агента, такого как, например, ED-CHCl. Типовые органические растворители, включают, но не ограничиваются ими, смешивающиеся с водой растворители, такие как, например, ДМСО, ДМФ, ДМА, NMP и ACN. Для ускорения связывания добавляют активатор, такой как, например, NHS. Сначала полимер смешивают с аминоксодержащим соединением с последующим добавлением коактиватора (NHS), а затем добавлением активатора (EDC-HCl). Реакцию проводят при 0-10°C, pH от 4,5 до 7,5 в течение от 1 до 24 ч при температуре окружающей среды. Получаемый конъюгированный продукт полимера очищают диафильтрацией или ЭХ. Продукт концентрируют до 2-50 мг/мл, pH корректируют от 4,5 до 6,5, для обеспечения стабильности лекарственное вещество-полимерный линкер и конъюгат до дальнейшего использования хранят замороженным при от -20 до

-80°C.

Конъюгацию полимера с аминоксодержащим линкером или лекарственным веществом могут проводить последовательно, в любом порядке или одновременно.

Общая методика В. Частичное избирательное восстановление белка (антитела против HER2).

Частичное избирательное восстановление дисульфидных групп между цепями или неспаренного дисульфида в соответствующем антителе против HER2 перед конъюгацией с конъюгатом полимер-лекарственное вещество достигают с использованием восстанавливающего агента, такого как, например, TCEP, DTT или β-меркаптоэтанола. Если восстановление выполняют с избытком восстанавливающего агента, то восстанавливающий агент перед конъюгацией удаляют методом ЭХ. Степень превращения дисульфидных групп HER2 в реакционноспособные сульфгидрильные группы зависит от стехиометрии HER2, восстанавливающего агента, pH, температуры и/или длительности реакции. Когда в PBRM восстанавливают некоторые, а не все дисульфидные группы, то восстановленный PBRM является частично восстановленным HER2.

Общая методика С. Конъюгация частично восстановленного HER2 с конъюгатом полимера и лекарственного вещества.

Конъюгацию частично восстановленного PBRM с конъюгатом полимер-лекарственное вещество проводят в нейтральных или слегка щелочных условиях (pH 6,5-8,5) при концентрации PBRM 1-10 мг/мл и концентрации конъюгата полимер-лекарственное вещество 0,5-10 мг/мл. Конъюгат полимер-лекарственное вещество, как правило, используется в 1-5,0-кратном избытке относительно требуемой стехиометрии конъюгата белок-полимер-лекарственное вещество. Когда PBRM конъюгируют с малеимидной группой конъюгата полимер-лекарственное вещество, то конъюгацию необязательно останавливают добавлением водорастворимого малеимидоблокирующего соединения, такого как, например, N-ацетилцистеин, метиловый эфир цистеина, N-метилцистеин, 2-меркаптоэтанола, 3-меркаптопропионовая кислота, 2-меркаптоуксусная кислота, меркаптометанол (т.е. HOCH<sub>2</sub>SH), бензилтиол и тому подобными.

Получаемый конъюгат HER2-полимер-лекарственное вещество, как правило, очищают диафильтрацией для удаления любого неконъюгированного конъюгата полимер-лекарственное вещество, неконъюгированного лекарственного вещества и низкомолекулярных примесей. В альтернативном варианте или дополнительно, для очистки конъюгата HER2-полимер-лекарственное вещество могут применять соответствующие хроматографические методики разделения, такие как, например, эксклюзионная хроматография, хроматография гидрофобных взаимодействий, ионообменная хроматография, такая как, например, хроматография WCX; обращенно-фазная хроматография, хроматография на гидроксипаппите, аффинная хроматография или их комбинация. Получаемый очищенный конъюгат HER2-полимер-лекарственное вещество, как правило, готовят как лекарственную форму в буферном растворе при pH 5,0-6,5.

Пример 1. FACS-отбор антител против HER2.

С использованием методик, описанных ниже, отбирали два антитела против HER2, описанные в данном документе, ХМТ 1517 и ХМТ 1519. Размножали восемь синтетических дрожжевых библиотек наивных последовательностей человека, каждая с разнообразием ~10<sup>9</sup>, как описано ранее (см., например, WO 2009036379; WO 2010105256; WO 2012/009568 и Xu et al., Protein Eng. Des. Sel. 2013 Oct; 26(10):663-70). Для первых двух циклов отбора выполняли методику сортировки с магнитными гранулами с использованием системы Miltenyi MAC, как описано (Siegel et al., J. Immunol. Methods. 2004 Mar; 286(1-2): 141-53). Вкратце, дрожжевые клетки (~10<sup>10</sup> клеток/библиотеку) инкубировали с 3 мл 200 нМ биотинилированного мономера антигена HER2 или 10 нМ биотинилированного антигена слияния HER2-Fc в течение 15 мин при комнатной температуре в промывочном буферном растворе ФСБ для FACS с 0,1% БСА (биотинилирования проводили с использованием набора для сульфо-NHS-биотинилирования EZ-Link, Thermo Scientific, кат. № 21425). После однократной промывки 50 мл ледяного промывочного буферного раствора осадок клеток ресуспендировали в 40 мл промывочного буферного раствора и к дрожжам добавляли 500 мкл микрогранул со стрептавидином (Miltenyi Biotec, г. Бергиш-Гладбах, Германия, кат. № 130-048-101) и инкубировали в течение 15 мин при 4°C. Далее дрожжи осаждали, ресуспендировали в 5 мл промывочного буферного раствора и наносили на колонку MACS LS (Miltenyi Biotec, г. Бергиш-Гладбах, Германия, кат. № 130-042-401). После нанесения 5 мл колонку промывали 3 раза 3 мл промывочного буферного раствора для FACS. Затем колонку выводили из магнитного поля и дрожжи элюировали 5 мл среды для роста и выращивали в течение ночи. Следующие три цикла сортировки выполняли с использованием проточной цитометрии. Осаждали приблизительно 1×10<sup>8</sup> дрожжей, промывали три раза промывочным буферным раствором и инкубировали, соответственно, с 200, 100 или 10 нМ биотинилированного HER2 в течение 10 мин при комнатной температуре. Затем дрожжи дважды промывали и окрашивали античеловеческими F(ab')<sub>2</sub> κ козла-FITC, разбавленными 1:100 (Southern Biotech, г. Бирмингем, штат Алабама, кат. № 2062-02), и либо стрептавидином-Alexa Fluor 633 (Life Technologies, г. Гранд Айленд, кат. № S21375), разбавленным 1:500, или экстравидином-фикоэритрином (Sigma-Aldrich, г. Сент-Луис, кат. № E4011), разбавленным 1:50, вторичными реактивами в течение 15 мин при 4°C. После двукратной промывки ледяным промывочным буферным раствором осадки клеток ресуспендировали

в 0,4 мл промывочного буферного раствора и переносили в пробирки для сортировки окрашенных эпитомированных продуктов. Сортировку выполняли с использованием сортера FACS ARIA (BD Biosciences), а сорт-гейты настраивали для отбора только связывающих HER2 клонов за два цикла, а третий цикл заключался в отрицательной сортировке для уменьшения содержания связывающих реактивов. После последнего цикла сортировки дрожжи высаживали на планшеты и собирали отдельные колонии для определения характеристик.

Пример 2. Созревание аффинности антител против HER2.

С использованием методик, описанных ниже, получали антитела против HER2 с созревшей аффинностью, описанные в данном документе, ХМТ 1518 и ХМТ 1520. Для диверсификации серий легких цепей (LCBD) применяли цикл 5 связывания популяции. Выделяли плазмиды с тяжелыми цепями и трансформировали их в библиотеке легких цепей с разнообразием  $1 \times 10^6$ . Отборы выполняли, как описано выше, с одним циклом сортировки MACS и двумя циклами сортировки FACS с использованием 10 нМ или 1 нМ биотинилированного антигена для соответствующих циклов.

Дополнительно после LCBD на лучших клонах выполняли созревание аффинности. Каждый из CDRH3 тяжелых цепей из этих клонов отдельно рекомбинировали в предварительно созданной библиотеке с вариантами с разнообразием  $1 \times 10^8$  и выполняли отборы, как описано выше. Давление на аффинность оказывали путем инкубации дрожжевого комплекса антитело-антиген с исходным Fab разные промежутки времени для отбора антител с наибольшей аффинностью.

Третий цикл созревания аффинности включал допускающую ошибки ПЦР тяжелой цепи и легкой цепи. Отборы выполняли сходным образом с предыдущими циклами с использованием сортировки FACS для всех трех циклов и с увеличенными периодами времени для давления на Fab.

Пример 3. Получение и очистка антител.

Дрожжевые клоны выращивали до насыщения, а затем проводили индукцию в течение 48 ч при 30°C со встряхиванием. После индукции дрожжевые клетки осаждали и собирали супернатанты для очистки. IgG очищали с использованием колонки с белком А и элюировали уксусной кислотой, pH 2,0. Фрагменты Fab получали путем расщепления папаином и очищали на KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences, кат. № 17-5458-01).

Экспрессию IgG млекопитающих выполняли субклонированием антител в новом экспрессионном векторе с последующей транзientной трансфекцией и экспрессией в НЕК. Вкратце, экспрессионные векторы, содержащие интересующие антитела трансфецировали комплексобразованием с реагентом для трансфекции с последующим воздействием на клетки НЕК в течение одного часа с последующим разведением культуральной среды до конечной плотности 4 миллиона клеток в мл. Затем клетки культивировали в течение 7 суток с подпиткой свежей средой каждые 48 ч. Через 7 суток собирали супернатант, выполняли последующее центрифугирование и очистку с использованием белка А и, при необходимости, добавляли очистку на колонке СНТ для достижения содержания > 95% мономера.

Пример 4. Измерения аффинности антител против HER2.

Определяли аффинность антител HER2 путем измерения их  $K_D$  методом ForteBio или MSD-SET. Измерения аффинности методом ForteBio, в целом, выполняли как описано ранее (Estep et al., MAbs. 2013 Mar-Apr; 5(2):270-8). Вкратце, измерения аффинности методом ForteBio выполняли путем нанесения IgG на сенсоры ANQ в режиме онлайн. Сенсоры уравнивали в аналитическом буферном растворе в режиме офлайн в течение 30 мин, а затем контролировали в режиме онлайн в течение 60 с для установления базовой линии. Сенсоры с нанесенными IgG подвергали воздействию 100 нМ антигена в течение 5 минут, после чего их переносили в аналитический буферный раствор на 5 мин для измерения скорости диссоциации. Кинетику анализировали с использованием модели связывания 1:1.

Измерения равновесной аффинности выполняли, как описано ранее (Estep et al., 2013). Равновесные титрования растворов (SET) выполняли в ФСБ + 0,1% БСА без IgG (PBSF) с поддерживаемым постоянным содержанием антигена при 50 пМ и инкубированием с от 3- до 5-кратными серийными разведениями антитела, начиная с 10 нМ. Антителами (20 нМ в ФСБ) покрывали стандартные планшеты для связывания MSD-ECL в течение ночи при 4°C или при комнатной температуре в течение 30 мин. Затем планшеты блокировали в течение 30 мин со встряхиванием при 700 об/мин с последующими тремя промывками промывочным буферным раствором (PBSF+ 0,05% Твин 20). Наносили образцы SET и инкубировали на планшетах в течение 150 с со встряхиванием при 700 об/мин с последующей однократной промывкой. Антиген, захваченный на планшете, выявляли 250 нг/мл меченого сульфаметкой стрептавидина в PBSF инкубацией на планшете в течение 3 мин. Планшеты промывали три раза промывочным буферным раствором, а затем считывали на приборе MSD Sector Imager 2400 с использованием  $1 \times$  буферного раствора для считывания Т с сурфактантом. Процентное содержание свободного антигена отображали на графике, как функцию титрованного антитела в программе Prism, и подбирали квадратное уравнение для нахождения  $K_D$ . Для улучшения производительности во всех экспериментах MSD-SET применялись роботы для манипуляции жидкостями, включая приготовление образцов для SET. В табл. I даны результаты измерений аффинности методами ForteBio и MSD-SET.

Таблица I

Исследуемое антитело	$K_D$ (M) (ForteBio) <sup>1</sup>	$k_{on}$ (1/M/c) (ForteBio) <sup>1</sup>	$k_{off}$ (1/c) (ForteBio) <sup>1</sup>	$K_D$ (M) (MSD) <sup>2</sup>
ХМТ 1517	$8,7 \times 10^{-8}$	$2,3 \times 10^5$	$2,0 \times 10^{-2}$	$2,4 \times 10^{-8}$
ХМТ 1518	$3,3 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^5$	$7,9 \times 10^{-4}$	$8,5 \times 10^{-10}$
ХМТ 1519	$3,5 \times 10^{-8}$	$2,7 \times 10^5$	$9,5 \times 10^{-3}$	$1,4 \times 10^{-8}$
ХМТ 1520	$2,1 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^5$	$3,1 \times 10^{-4}$	$6,1 \times 10^{-10}$

<sup>1</sup> Измерено на приборе ForteBio. IgG на острие, а мономер HER2 человека в растворе.

<sup>2</sup> Измерено на приборе Meso Scale Discovery. IgG по сравнению с биотинилированным мономером HER2 человека.

Пример 5. Эпитоп-специфическая сортировка Octet Red384.

Эпитоп-специфическую сортировку антител выполняли на системе Forte Bio Octet Red384 (Pall Forte Bio Corporation, г. Менло-Парк, штат Калифорния) с использованием стандартного анализа сортировки в сэндвич-формате. Контрольный IgG против мишени наносили на сенсоры ANQ и незанятые сайты Fc-связывания на сенсоре блокировали нерелевантным антителом IgG1 человека. Затем сенсоры подвергали воздействию 100 нМ целевого антигена с последующим воздействием второго антитела против мишени. Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения для анализа данных ForteBio версии 7.0. Дополнительное связывание вторым антителом после ассоциации антигена указывает на наличие незанятого эпитопа (не конкурент), тогда как отсутствие связывания указывает на блокирование эпитопа (конкурент). Этот процесс повторяли для 4 контрольных антител: (i) трастузумаб, который связывается с доменом IV HER2 (Cho et al., Nature. 2003 Feb 13;421(6924):756-60); (ii) пертузумаб, который связывается с доменом II HER2 (Franklin et al., Cancer Cell. 2004 Apr; 5(4):317-28); (iii) Fab37, который связывается с доменом III HER2 (Fisher et al., J. Mol. Biol. 2010 Sep 10; 402(1):217-29), и (iv) chA21, который связывается с доменом I HER2 (Zhou et al., J. Biol. Chem. 2011 Sep 9; 286(36):31676-83; Cheng et al., Cell Res. 2003 Feb;13(1):35-48). Последовательности контрольных антител показаны ниже.

>Трастузумаб, аминокислотная последовательность варибельного участка тяжелой цепи

```

1           15           30           45
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q D V N T A V A W Y Q Q K P G K A P K

46           60           75           90
L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q

91           105          120          135
H Y T T P R T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L

136          150          165          180
L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L S S T L T

181          195          210          214
L S K A D Y E K N K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S F N R G E C

```

(SEQ ID NO: 40).

>Трастузумаб, аминокислотная последовательность варибельного участка легкой цепи

```

1           15           30           45
EVQLVESGGGLVQPFGGSLRRLSCAASGFNIRKDTYIHWVRQAPGKGL

46          60          75          90
EWVARIYPTNGYTRYAOSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED

91          105         120         135
TAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGTLLVTVSSASTKGPSVFFLAPSS

136         150         165         180
KSTSGGTAALGCLVKDYFPPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS

181         195         210         225
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDK

226         240         255         270
THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH

271         285         300         315
HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD

316         330         345         360
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREE

361         375         390         405
MTKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG

406         420         435         449
SFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO:41).

&gt;Пертузумаб, аминокислотная последовательность переменного участка тяжелой цепи

```

1           10           20           30           40           50           60
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSIGVAWYQQKPKAPKLLIYSASVRYTGVPS

70          80          90          100         110         120
RFGSGSGSTDFLTITSSSLQPEDFATYYCQQYYIYPTTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP

130         140         150         160         170         180
SDEQLKSGTASVVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLT

190         200         210
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

```

(SEQ ID NO: 42).

&gt;Пертузумаб, аминокислотная последовательность переменного участка легкой цепи

```

1           10           20           30           40           50           60
EVQLVESGGGLVQPFGGSLRRLSCAASGFTFTDYTEMDWVVKQAPGKGLVWVADVFNPSGGSIY

70          80          90          100         110         120
NQRPFKGRFTLSVDRSKNTLQLQMNSLRAEDTAVYYCARNLGPSTFPTDYGQGTLLVTVSSA

130         140         150         160         170         180
STKGPSVFFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG

190         200         210         220         230         240
LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP

250         260         270         280         290         300
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST

310         320         330         340         350         360
TYRVVSVLTVLHQDWLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEM

370         380         390         400         410         420
TKNQVSLTCLVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQ

430         440         448
QGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

```

(SEQ ID NO: 43).



- >Fab37, аминокислотная последовательность переменного участка тяжелой цепи  
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSIWWSWIHWVRQAPGKGLEWVASI  
PSSGWTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARWWSSA  
MDYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 44)
- >Fab37, аминокислотная последовательность переменного участка легкой цепи  
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVSSAVAWYQKPKGKAPKLLIYSASSL  
YSGVPSRFSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQWWWWPSTFGQGTKVEIK  
 (SEQ ID NO: 45)
- >chA21, аминокислотная последовательность переменного участка тяжелой цепи  
EVQLQQSGPEVVKTGASVKISCKASGYSTGYFINWVKKNSGKSP EWIGHISS  
YATSTYNQKFKNKAAFTVDTSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYYCVRSGNYEEYA  
MDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 46)
- >chA21, аминокислотная последовательность переменного участка легкой цепи  
DIVLTQTPSSLPVSVGEKVTMTCKSSQTLTLYSNQKNYLAWYQKPGQSPK  
LISWAFTRKSGVPDRFTGSGSGTDFTLTIGSVKAEDLAVYYCQQYSNYPWTFG  
GGTRLEIK (SEQ ID NO: 47)

Были отобраны антитела XMT 1519, XMT 1520, XMT 1517, XMT 1518 с наибольшей аффинностью, которые не конкурировали с четырьмя контрольными антителами.

Как показано на фиг. 1А, антитела XMT 1517 и XMT 1518, и на фиг. 1В, антитела XMT 1519 и XMT 1520, не конкурировали с 4 контрольными антителами.

Пример 6. Измерения констант связывания антител с клетками JIMT-1.

Связывание антител против HER2 с клеточной поверхностью клеток JIMT-1 оценивали с использованием проточного питометра Macsquant (Miltenyi Biotec, г. Бергиш-Гладбах, Германия). Клетки JIMT-1, выращенные в течение ночи до культур с приблизительно 90% заполнением в среде DMEM (ATCC, г. Манассас, штат Вирджиния) с 10% ФБС (Gibco®, Life Technologies, г. Гранд Айленд, штат Нью-Йорк), снимали с поверхности планшета раствором для отделения клеток Accutase (Innovative Cell Technologies, г. Сан-Диего, штат Калифорния). Отделенные клетки однократно промывали ледяной средой, содержащей 6% сыворотки козла и ресуспендировали в той же среде. Переносили аликвоты по 100000 клеток на лунку с V-образным дном в 96-луночный планшет и инкубировали в диапазоне концентраций антитела против HER2 (0,05-100 нМ) в 150 мкл DMEM с 6% сыворотки козла на льду в течение 3 ч. Затем клетки однократно промывали ледяным ФБС и ресуспендировали в 100 мкл DMEM с 2% сыворотки козла и 6 мкг/мл вторичного флуоресцентно-меченого антитела, Alexa Fluor® 647-меченого античеловеческого IgG козла (Life Technologies кат. № A-21445) в течение 1 ч на льду. Клетки однократно промывали ледяным ФБС (Gibco®, Life Technologies, кат. № 10010049) и суспендировали в 200 мкл ледяного ФБС с 1% параформальдегида. Величину связанной флуоресценции на клетку определяли для каждой обработки анализом 5000 клеток на проточном питометре. Значение медианной флуоресценции для каждой обработки откладывали на графике и рассчитывали константу диссоциации,  $K_d$ , для каждого антитела с помощью программного обеспечения Graphpad Prism путем нелинейной регрессии с использованием модели специфического связывания с одним сайтом. На фиг. 2 показано связывание антител против HER2 с клетками JIMT-1. Рассчитанные значения  $K_d$  составили 3,4 нМ для XMT 1517, 0,4 нМ для XMT 1518, 1,2 нМ для XMT 1519 и 1,1 нМ для XMT 1520.

Пример 7. Измерение аффинности антител методом ИФА.

Аффинность антител к рекомбинантным HER2 человека и яванского макака определяли анализом ИФА. Очищенный рекомбинантный внеклеточный домен HER2, либо происходящий из организма человека (аминокислоты 23-652, Aero Biosystems кат. № HE2-H5225) либо происходящий из организма яванского макака (аминокислоты 1-652, Sino Biological, кат. № 90295-C08H) наносили на поверхность 96-луночных планшетов инкубацией каждой лунки с 50 мкл раствора 1 мкг/мл в 50 мМ бикарбонатного буферного раствора, pH 9,0, в течение 2 ч при комнатной температуре. Лунки промывали 4 раза раствором TTBS (50 мМ Трис-HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl и 0,05% Твин 20). Лунки блокировали инкубацией в течение 1 ч с 50 мкл TTBS, содержащим 5% бычьего сывороточного альбумина. Затем для выдержки в течение 2 ч при комнатной температуре добавляли диапазон разведений (от 0,005 до 10 нМ, 3-кратные серийные разведения) каждого исследуемого антитела или примера 16H в 50 мкл TTBS с 3% БСА. Несвязавшиеся исследуемые антитела удаляли промывками TTBS (4×). Вторичные античеловеческие IgG, конъюгированные с HRP (Bethyl Laboratories, № A80-115P), в концентрации 0,2 мкг/мл в TTBS с 3% БСА, инкубировали в каждой лунке в течение 1 ч. Несвязавшееся вторичное антитело удаляли 4 промывками TTBS. К каждой лунке добавляли субстрат HRP (ТМБ, Bethyl Laboratories № E102) и инкубировали до видимого проявления желтого цвета. Реакцию останавливали добавлением 50 мкл 0,2N серной кисло-

ты. В устройстве для считывания планшетов измеряли поглощение при 450 нм (Molecular Devices, Spectramax M5). Значения отмечали на графике с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Определяли  $K_d$  нелинейной регрессией с использованием модели специфического связывания с одним сайтом.

На фиг. 3а даны результаты связывания анти-HER2 антител XMT 1517, XMT 1518 с HER2 человека и HER2 яванского макака. На фиг. 3б даны результаты связывания анти-HER2 антител XMT 1519, XMT 1520 с HER2 человека и HER2 яванского макака. Рассчитанные значения  $K_d$  даны в табл. II.

Таблица II

<b>Исследуемое антитело</b>	<b>HER2 человека <math>K_d</math> (нМ)</b>	<b>HER2 яванского макака <math>K_d</math> (нМ)</b>
XMT 1517	1,2	0,6
XMT 1518	0,3	0,3
XMT 1519	0,1	0,1
XMT 1520	0,1	0,1

Аффинности связывания 4 исследуемых антител с HER2 человека и HER2 яванского макака были сходными.

На фиг. 3с и 3д показаны результаты связывания анти-HER2 антител XMT 1519 и примера 16Н, соответственно, с HER2 человека и HER2 яванского макака. Рассчитанные значения  $K_d$  даны ниже в табл. IIА.

Таблица IIА

<b>Исследуемый объект</b>	<b>HER2 человека <math>K_d</math> (нМ)</b>	<b>HER2 яванского макака <math>K_d</math> (нМ)</b>
XMT 1519	0,03	0,03
Пример 16Н	0,05	0,05

Аффинности связывания XMT 1519 и примера 16Н с HER2 человека и HER2 яванского макака были сходными.

Пример 8. Конкурентный анализ связывания антител с клетками JMT-1.

Для подтверждения того, что антитела XMT 1518 и XMT 1519 связываются с перекрывающимися эпитопами, антитела анализировали в анализе конкурентного связывания на клетках JMT-1. Клетки JMT-1 выращивали как описано в примере 6. Аликвоты с 50000 клеток в 50 мкл на лунку переносили в 96-луночный планшет с V-образным дном. Затем 30 нМ антитело XMT 1519, конъюгированное с Alexa Fluor® 647 в 25 мкл среды, добавляли самостоятельно или смешивали со вторым немеченным антителом (XMT 1518, XMT 1519 или трастузумаб), разбавленным до диапазона концентраций (0,05-100 нМ), и инкубировали на льду в течение 3 ч. Затем клетки однократно промывали ледяным ФСБ и ресуспендировали в 100 мкл DMEM с 2% сыворотки козла и 6 мкг/мл Alexa Fluor® 647-меченого античеловеческого IgG козла (Life Technologies кат. № A-21445) в течение 1 ч на льду. Клетки однократно промывали ледяным ФСБ и суспендировали в 200 мкл ледяного ФСБ с 1% параформальдегида. Величину связанной флуоресценции на клетку определяли для каждой обработки анализом 5000 клеток на проточном питомере MacsQuant (Miltenyi Biotec, г. Бергиш-Гладбах, Германия). Значение медианной флуоресценции для каждой обработки откладывали на графике и рассчитывали константу диссоциации,  $K_D$ , для каждого антитела с помощью Graphpad Prism путем нелинейной регрессии с использованием модели специфического связывания с одним сайтом. Как показано на фиг. 4, антитело XMT 1518 конкурировало за связывание Alexa Fluor® 647-меченого XMT 1519 в сходной степени с немеченым XMT 1519, указывая на то, что оба антитела распознают перекрывающиеся эпитопы на HER2, тогда как трастузумаб не конкурировал за связывание Alexa Fluor® 647-меченого XMT 1519.

Пример 9. Анализ антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности.

Антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксическую (АЗКЦ) активность анти-HER2 антител количественно определяли на клетках BT474. На лунку 96-луночного планшета помещали 5000 клеток в среде DMEM, содержащей 10% ФБС, и выращивали в течение ночи при 37° в 5% CO<sub>2</sub>. К клеткам добавляли концентрации антител XMT 1518, XMT 1519, XMT 1520 или трастузумаба в диапазоне от 0,001 до 100 нМ (8 серийных 5-кратных разведений) и измеряли активность АЗКЦ набором для биологического анализа от Promega (кат. № G7018), в котором используются эффекторные клетки, сконструированные для продуцирования фермента люциферазы как репортера АЗКЦ активности. Активность люциферазы измеряли на спектрофотометре (Molecular Devices, Spectramax M5). Значения (выраженные в виде соотношения активности люциферазы для каждого образца обработанных антителом клеток к активности образца клеток, которых не обрабатывали антителом) отмечали построением нелинейной регрессии с использованием log-значений агониста по сравнению с ответом, переменным коэффициентом на-

клона в четырехпараметрической модели с использованием программного обеспечения GraphPad Prism.

На фиг. 5 представлен график, показывающий значения АЗКЦ. ХМТ 1519 и ХМТ 1520 показывают максимальную активность, сходную с активностью трастузумаба: соотношение сигнала, полученного с антителом, к сигналу, полученному без антитела, составляет 30,1 для ХМТ 1519 и 29,7 для ХМТ 1520, тогда как соотношение для трастузумаба составляет 34,6. ХМТ 1518 имеет максимальную активность равную 11,0. Значения  $EC_{50}$  (полу максимальная концентрация связывания) составляют для активации АЗКЦ, соответственно, 0,16 нМ для ХМТ 1518, 0,18 нМ для ХМТ 1519, 0,54 нМ для ХМТ 1520 и 0,07 нМ для трастузумаба.

Пример 10. Лиганд-зависимая передача сигнала HER2 в клетках MCF7.

Влияние анти-HER2 антител на лиганд-зависимую передачу сигнала HER2 в клетках MCF7 (ATCC, HTB-22) оценивали путем измерения количества фосфорилированной АКТ после обработки клеток лигандом HER3, нейрегулином- $\beta$ 1. В каждую лунку 6-луночных чашек для культивирования помещали 300000 клеток MCF7 в среде MEM с 0,01 мг/мл бычьего инсулина и 10% ФБС и выращивали в течение ночи при 37° в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли и замещали свежей средой, содержащей 10 мкг/мл исследуемого антитела и инкубировали в течение 1 ч, с последующей 15-минутной обработкой 40 пМ нейрегулина- $\beta$ 1 (R&D Systems, г. Миннеаполис, штат Миннесота, кат. № 377-НВ-050). Клетки однократно промывали ледяным ФБС и лизировали добавлением 200 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ трис HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, таблетки набора ингибиторов протеаз cOmplete (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана) и таблетки набора ингибиторов фосфатаз PhosSTOP (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана). Лизаты центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин при 4° для удаления нерастворимого дебриса. Уровни фосфорилированной АКТ определяли с использованием набора сэндвич-ИФА технологии определения сигналинга в клетках PathScan® Phospho-Akt1 (Ser473), следуя инструкциям производителя.

В табл. III показано увеличение фосфорилирования АКТ, индуцированного обработкой нейрегулином клеток MCF7, выраженное как процентное количество от измеренного показателя у нестимулированных клеток.

Таблица III

	Отсутствие	Трастузумаб	Пертузумаб	ХМТ 1517	ХМТ 1518	ХМТ 1519	ХМТ 1520
АКТ	522 ± 86	369 ± 9	127 ± 22	564 ± 55	441 ± 23	381 ± 21	439 ± 49

Обработка нейрегулином пятикратно увеличила уровни фосфорилированной АКТ (522% по сравнению с нестимулированными клетками). ХМТ 1517, ХМТ 1518, ХМТ 1519 и ХМТ 1520 вызвали очень слабое или не вызвали снижения при индуцированном нейрегулином увеличении фосфорилирования АКТ до, соответственно, 564, 441, 381 и 439%, что сходно увеличению, вызванному трастузумабом (369%). Пертузумаб, который, как показано, ингибирует лиганд-зависимую передачу сигнала (Franklin et al., Cancer Cell. 2004 April 19; 5:317-28), снижал стимулирование нейрегулином к близкому значению, полученному для нестимулированных клеток (127%). Данные результаты дают основание предполагать, что исследуемые антитела не действуют путем ингибирования гетеродимеризации HER2 и HER3, которая стимулируется нейрегулином и ингибируется пертузумабом.

Пример 11. Лиганд-зависимая передача сигнала HER2 в клетках MCF7, SKBR3 и JIMT-1.

Влияние анти-HER2 антител на передачу сигнала HER2 в клетках MCF7 (ATCC, HTB-22), SKBR3 (ATCC, HTB-30), JIMT-1 (ATCC, HTB-30) оценивали путем измерения изменений количества фосфорилированной АКТ после 4-часовой обработки антителом. В каждую лунку 6-луночных чашек для культивирования помещали клетки в специальной среде с 10% ФБС и выращивали в течение ночи при 37° в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли и замещали свежей средой, содержащей 10 мкг/мл исследуемого антитела, и культивировали в течение 4 ч. Клетки однократно промывали ледяным ФБС и лизировали добавлением 200 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ трис HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, таблетки набора ингибиторов протеаз cOmplete (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана) и таблетки набора ингибиторов фосфатаз PhosSTOP (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана). Лизаты центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин при 4° для удаления нерастворимого дебриса. Уровни фосфорилированной АКТ определяли с использованием набора сэндвич-ИФА технологии определения сигналинга в клетках PathScan® Phospho-Akt1 (Ser473), следуя инструкциям производителя.

В табл. IV показано ингибирование лиганд-независимой передачи сигнала HER2 в клетках MCF7, SKBR3 и JIMT-1, как указано величиной фосфорилирования АКТ. Результаты представлены относительно процентного количества необработанных клеток.

Таблица IV

Линия клеток	Трастузумаб	ХМТ 1517	ХМТ 1518	ХМТ 1519	ХМТ 1520
SKBR3	64 ± 1	43 ± 5	59 ± 2	34 ± 2	29 ± 5

JMT-1	56 ± 4	66 ± 4	62 ± 1	84 ± 2	69 ± 4
MCF7	98 ± 4	79 ± 5	103 ± 17	76 ± 3	66 ± 3

Исследуемые анти-HER2 антитела вызывали сильное ингибирование передачи сигнала HER2 в клетках SKBR3, в которых ХМТ 1517, ХМТ 1518, ХМТ 1519 и ХМТ 1520 снижали уровни фосфорилированной АКТ до 43, 59, 34 и 29% от уровней, возникающих в необработанных клетках, по сравнению со снижением до 64%, вызванным трастузумабом.

Анти-HER2 антитела ингибировали передачу сигнала HER2 в клетках JMT-1, как показано снижением фосфорилированной АКТ до 66, 62, 84 и 69% от уровней, возникающих в необработанных клетках, соответственно, для ХМТ 1517, ХМТ 1518, ХМТ 1519 и ХМТ 1520, что сходно со снижением до 56%, вызванным трастузумабом.

В клетках MCF7 ХМТ 1518, как и трастузумаб, не ингибировало передачу сигнала HER2, однако ХМТ 1517, ХМТ 1519 и ХМТ 1520, вызывали умеренные снижения передачи сигнала, снижая фосфорилирование АКТ до 79, 76 и 66% от уровней, возникающих в необработанных клетках.

Пример 12. Лиганд-независимая передача сигнала HER2 в клетках BT474.

Влияние анти-HER2 антител на передачу сигнала HER2 в клетках BT474 (ATCC, НТВ-20) оценивали путем измерения изменений количества фосфорилированной АКТ после 4-часовой обработки антителом. В каждую лунку 6-луночных чашек для культивирования помещали клетки BT474 (300000 клеток) в среде DMEM с 10% ФБС и выращивали в течение ночи при 37° в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли и замещали свежей средой, содержащей 10 мкг/мл исследуемого антитела, и культивировали в течение 4 ч. Клетки однократно промывали ледяным ФБС и лизировали добавлением 200 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ трис HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, таблетки набора ингибиторов протеаз cOmplete (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана) и таблетки набора ингибиторов фосфатаз PhosSTOP (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана). Лизаты центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин при 4° для удаления нерастворимого дебриса. Уровни фосфорилированной АКТ определяли вестерн анализом. Смешивали 20 мкл каждого экстракта с 7 мкл нагрузочного красителя NUPAGE (Life Technologies, кат. № NP0007) и 2 мкл 10× восстанавливающего агента (Life Technologies кат. № NP0004) и наносили на полиакриламидный гель с 4-12% бис-трис (Life Technologies, кат. № NP0341), который анализировали в подвижном буфере MOPS (Life Technologies кат. № NP000102) в течение 90 мин при 120 В. Отдельные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану на полусухой системе для электрофоретического переноса (Bio-Rad, Transblot system) в течение 30 мин при 10 В в буфере для переноса (Life Technologies, кат. № NP0006), содержащий 10% метанола. Мембрану инкубировали в течение 1 ч в блокирующем буфере (Li-cog, кат. № 927-40000), а затем с антителом мыши, которое распознает белок АКТ (Cell Signaling Technology, № 2920), разбавленным 1:1000, антителом кролика, которое распознает фосфорилированную АКТ на серине 473 (Cell Signaling Technology, № 4060), и антителом кролика, которое распознает актин (LiCor, кат. № 926-42210), разбавленным 1:5000, в том же блокирующем буфере в течение 1 ч. После инкубации мембрану промывали 3 раза 10 мл TTBS и затем инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами: IgG козла против антитела кролика, конъюгированным с IRdye® 800CW (Li-Cor, кат. № 926-32211) и IgG козла против антитела мыши, конъюгированным с IRdye® 680RD (Li-Cor, кат. № 926-68070), оба разбавлены 1:10000 в блокирующем буфере. Мембрану снова 3 раза промывали 10 мл TTBS и сканировали на сканере Li-Cor Odyssey. Интенсивность полос, соответствующих АКТ, фосфо-АКТ и актину, определяли количественно с использованием программного обеспечения сканера. Каждую полосу фосфо-АКТ нормализовали к общей полосе АКТ и выражали в виде процентного отношения к белку фосфо-АКТ, полученному из клеток, которых не обрабатывали какими-либо анти-HER2 антителами.

В этом же эксперименте также исследовали влияние анти-HER2 антител на фосфорилирование HER3. Описанные выше блоты на нитроцеллюлозе также исследовали в течение 1 ч зондами с помощью антитела кролика, которое распознает фосфорилированный по 1289 тирозину HER3 (Cell Signaling Technology, № 4791), разбавленного 1:1000 в блокирующем буфере. После инкубации мембрану промывали 3 раза 10 мл TTBS и затем инкубировали в течение 1 ч с IgG козла против антитела кролика, конъюгированным с IRdye® 800CW (Li-Cor, кат. № 926-32211), разбавленным 1:10000 в блокирующем буфере. Мембрану снова 3 раза промывали 10 мл TTBS и сканировали на сканере Li-Cor Odyssey. Интенсивность полос, соответствующих фосфо-HER3 и актину, определяли количественно с использованием программного обеспечения сканера. Каждую полосу фосфо-HER3 нормализовали к полосе общей АКТ и выражали в виде процентного отношения к белку фосфо-HER3, полученному из клеток, которых не обрабатывали какими-либо анти-HER2 антителами.

В табл. V дано ингибирование лиганд-независимой передачи сигнала HER2 в клетках BT474, как определено величиной фосфорилирования АКТ или фосфорилирования Her3. Результаты представлены относительно процентного количества нестимулированных клеток.

Таблица V

	Трастузумаб	Пертузумаб	XMT 1519	XMT 1520
АКТ	31 ± 2	44 ± 3	21 ± 8	30 ± 5
HER3	80	85	71	76

Анти-HER2 антитела XMT 1519 снижали фосфорилирование АКТ до около 21%, а HT19B - до около 30%, как показано на необработанных клетках BT474, по сравнению с трастузумабом, который вызывал снижение до около 31%, и пертузумабом, который вызывал снижение до около 44%, по отношению к необработанным клеткам. На фосфорилирование HER3 умеренно воздействовали все антитела: 71, 76, 80 и 85% от наблюдаемого для необработанных клеток под действием, соответственно, XMT 1519, XMT 1520, трастузумаба и пертузумаба.

Пример 13. Измерения скоростей интернализации.

Скорость, с которой каждое антитело XMT 1518, XMT 1519, XMT 1520 и трастузумаб интернализируется с клеточной поверхности клеток SKBR3, определяли по флуоресценции в анализе на основе использования 96-луночного планшета. Клетки SKBR3 высевали на 96-луночные планшеты и давали возможность прикрепиться выращиванием в течение ночи в среде DMEM (ATCC, г. Манассас, штат Вирджиния, кат. № 30-2002) с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco®, Life Technologies, г. Гранд Айленд, штат Нью-Йорк, кат. № 16140-071) при 37° в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки инкубировали в среде, содержащей 10 мкг/мл антитела, на льду в течение 1 ч, затем промывали ледяной средой и инкубировали на льду с 75 мкл среды, содержащей 1 мкг/мл фрагмента Fab античеловеческого IgG козла (Rockland Immunochemicals, г. Гилбертсвилл, штат Пенсильвания, кат. 809-1102), конъюгированного с Alexa Fluor® 647 в течение одного часа. После промывки клетки переносили в инкубатор на 37° для обеспечения интернализации в течение различных промежутков времени. Планшеты сканировали на сканере Odyssey (Li-Cor Biosciences, г. Линкольн, штат Небраска) с использованием полосы 700 нм. Затем проводили кислотную промывку планшетов путем инкубации с раствором 100 мМ глицина, 20 мМ MgSO<sub>4</sub>, 50 мМ KCl, pH 2,2, на льду для удаления антител, связанных с поверхностью клеток, промывали ледяным ФБС и снова сканировали для определения количества флуоресценции, интернализированной клетками. На фиг. 6 показана скорость интернализации антител в течение 4 ч. Скорость интернализации всех антител является практически идентичной скорости для трастузумаба, все имеют около 50% общего связывания с поверхностью в момент времени 0, интернализируясь за 4 ч (фиг. 6).

Пример 13А. Интернализация HER2 в клетки SKBR3.

Влияние комбинации анти-HER2 антител на интернализацию HER2 в клетки SKBR3 исследовали методом флуоресцентной микроскопии. Трастузумаб конъюгировали с Alexa Fluor-647 и применяли для визуализации расположения трастузумаба и предпочтительно HER2 внутри клеток. Клетки SKBR3 высевали на 4-камерные предметные стекла для микроскопа и давали возможность прикрепиться выращиванием в течение ночи в среде DMEM (ATCC, г. Манассас, штат Вирджиния, кат. № 30-2002) с 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco®, Life Technologies, г. Гранд Айленд, штат Нью-Йорк, кат. № 16140-071) при 37° в 5% CO<sub>2</sub>. Клетки SKBR3 инкубировали в течение 90 мин в среде, содержащей либо (i) комбинацию трастузумаба-Alexa-647 и пертузумаба, либо (ii) комбинацию трастузумаба-Alexa-647, пертузумаба и антитела против HER2 XMT 1519. Локализацию трастузумаба визуализировали с использованием флуоресцентного микроскопа. Как показано на фиг. 7, поскольку большинство из трастузумаба-Alexa Fluor-647, в комбинации с одним пертузумабом совместно локализовалось с красителем cell mask orange, то это предполагает локализацию в цитоплазматической мембране, а большинство из трастузумаба-Alexa Fluor-647 вместе с пертузумабом и XMT 1519 локализовалось с красителем Lyso-tracker, что предполагает локализацию в лизосомах. Данный результат дает основание предположить, что присутствие XMT 1519 в комбинации с трастузумабом и пертузумабом способствует интернализации и миграции HER2 в лизосомы.

Пример 13В. Измерения скорости интернализации с комбинацией анти-HER2 антител.

Влияние комбинирования множества анти-HER2 антител, которые распознают различные эпитопы на скорость интернализации HER2 определяли на основании проведения анализа на 96-луночном планшете, сходном с анализом, описанным в примере 13. В этом эксперименте клетки обрабатывали одним исследуемым антителом против HER2, в комбинации с трастузумабом или с трастузумабом и пертузумабом, и измеряли количество анти-HER2 антитела, интернализованного в различные моменты времени.

Для проведения анализа в каждую лунку трех 96-луночных планшетов (окрашенные в черный планшеты с прозрачным углубленным дном) помещали 40000 клеток SKBR3 в среде DMEM, содержащей 10% ФБС, и давали возможность прикрепиться в течение ночи при 37° в 5% CO<sub>2</sub>. На следующий день клетки обрабатывали антителами следующим образом. В каждой лунке среду заменяли свежей ледяной средой, содержащей 5 мкг/мл одного из исследуемых антител против HER2, или трастузумаба, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Несвязавшееся антитело удаляли промывкой клеток два раза ледяной средой. Для выявления к каждой лунке добавляли 5 мкг/мл меченого Alexa 647 фрагмента Fab античеловеческого IgG в ледяной среде и инкубировали на льду в течение 1 ч. Несвязавшееся антитело удаляли промывкой каждой лунки 2 раза ледяной средой. Далее к каждой лунке добавляли среду, содержа-

щую либо 5 мкг/мл трастузумаба, по 5 мкг/мл трастузумаба и пертузумаба, либо не содержащую дополнительных антител. Каждое добавление выполняли в трех повторностях. Один набор лунок обрабатывали одним меченым Alexa 647 моновалентным фрагментом Fab античеловеческого IgG, а измеренную в этих лунках флуоресценцию использовали для вычитания фоновой флуоресценции.

Один планшет оставляли на льду для определения значений в момент времени 0 для каждой обработки, а другие планшеты инкубировали при 37°C. Через 1,5 ч один планшет, выдерживаемый при 37°C, и планшет для момента времени 0 промывали 2 раза ледяным ФСБ и сканировали с использованием полосы 680 нм сканера Licor Odyssey. Флуоресценцию, измеренную в каждой лунке, использовали как общую флуоресценцию каждой обработки. Затем клетки подвергали кислотной промывке 2 раза раствором 100 мМ глицина, 50 мМ KCl и 20 мМ MgSO<sub>4</sub>, pH 2,2, затем два раза промывали ледяным ФСБ для удаления связанных с поверхностью антител. Планшеты снова сканировали для определения величины интернализированной флуоресценции в каждой лунке. На следующий день таким же образом анализировали планшеты, выдержанные 24 ч.

Интернализированное процентное количество каждого антитела против HER2 (или трастузумаба в контрольных лунках) рассчитывали вычитанием фонового значения, усредненного для каждого из 3 повторений, затем делением интернализированной флуоресценции на общую флуоресценцию для каждой обработки и умножением на 100.

Как показано в табл. VA, 80-90% XMT 1518, XMT 1519 и XMT 1520 интернализируется в пределах полутора часов при условии комбинирования с трастузумабом и пертузумабом. XMT 1517 показывает 60% интернализации, вероятно благодаря его очень высокой скорости диссоциации, которая вызывает его диффузию из клеток во время инкубации. В случае комбинирования с трастузумабом 20-40% каждого исследуемого антитела интернализуется в течение полутора часов и около 15% - интернализуется, когда каждое исследуемое антитело представлено самостоятельно. Трастузумаб самостоятельно показывает около 15% интернализации в течение полутора ч и около 30%, когда он комбинируется с пертузумабом.

Таким образом, комбинация трех антител против HER2, любого из исследуемых антител против HER2, трастузумаба и пертузумаба, увеличивает скорость интернализации антител вероятнее всего путем увеличения скорости эндоцитоза HER2.

Таблица VA

Процент интернализации										
	Только Траст.	Траст. + Перт.	Самостоятельно				С трастузумабом			
			XMT 1517	XMT 1518	XMT 1519	XMT 1520	XMT 1517	XMT 1518	XMT 1519	XMT 1520
0 ч	2	1	4	3	2	2	3	2	2	2
1,5 ч	13	28	11	16	14	14	17	41	35	23
24 ч	88	94	83	88	83	78	106	106	107	100

С трастузумабом и пертузумабом				
	XMT 1517	XMT 1518	XMT 1519	XMT 1520
0 ч	4	2	2	3
1,5 ч	63	90	83	89
24 ч	107	103	88	101

#### Пример 14. Разрушение HER2.

Влияние анти-HER2 антител на разрушение HER2 в клетках SKBR3 после обработки антителами определяли вестерн анализом. В каждую лунку 6-луночных чашек для культивирования помещали 300000 клеток SKBR3 в среде DMEM с 10% ФБС и выращивали в течение ночи при 37° в атмосфере 5% CO<sub>2</sub>. Среду удаляли и замещали свежей средой, содержащей 10 мкг/мл каждого антитела, и культивировали в течение 4 ч. Клетки однократно промывали ледяным ФСБ и лизировали добавлением 200 мкл буферного раствора, содержащего 50 мМ трис HCl, pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% тритон X-100, таблетки набора ингибиторов протеаз cOmplete (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана) и таблетки набора ингибиторов фосфатаз PhosSTOP (Roche, г. Индианаполис, штат Индиана). Лизаты центрифугировали при 15000 об/мин в течение 15 мин при 4° для удаления нерастворимого дебриса. Смешивали 20 мкл каждого экс-

тракта с 7 мкл нагрузочного красителя NUPAGE (Life Technologies, кат. № NP0007) и 2 мкл 10× восстанавливающего агента (Life Technologies кат. № NP0004) и наносили на полиакриламидный гель с 4-12% бис-трис (Life Technologies, кат. № NP0341), который анализировали в подвижном буфере MOPS (Life Technologies кат. № NP000102) в течение 90 мин при 120 В. Отдельные белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану на полусухой системе для электрофоретического переноса (Bio-Rad, Transblot system) в течение 30 мин при 10 В в буфере для переноса (Life Technologies, кат. № NP0006), содержащий 10% метанол. Мембрану инкубировали в течение 1 ч в блокирующем буфере (Li-cor, кат. № 927-40000), а затем с антителом кролика, которое распознает белок HER2 (Cell Signaling Technology, № 2165), разбавленным 1:1000, и антителом кролика, которое распознает актин (LiCor, кат. № 926-42210), разбавленным 1:5000, в том же блокирующем буфере в течение 1 ч. После инкубации мембрану промывали 3 раза 10 мл ТТБС и затем инкубировали в течение 1 ч со вторичными антителами: IgG козла против антитела кролика, конъюгированным с IRdye® 800CW (Li-Cor, кат. № 926-32211), и IgG козла против антитела мыши, конъюгированным с IRdye® 680RD (Li-Cor, кат. № 926-68070), оба разбавлены 1:10000 в блокирующем буфере. Мембрану снова 3 раза промывали 10 мл ТТБС и сканировали на сканере Li-Cor Odyssey. Интенсивность полос, соответствующих полноразмерному белку HER2, определяли количественно с использованием программного обеспечения сканера. Каждую полосу HER2 нормализовали по актину и выражали в виде процентного отношения к белку HER2, полученному из клеток, которых не обрабатывали какими-либо анти-HER2 антителами.

На фиг. 8 показано, что обработка клеток SKBR3 только исследуемыми антителами или в комбинации с трастузумабом оказывала незначительное или не оказывала влияния на уровни HER2, за исключением XMT 1518 и XMT 1520, которые вызывали снижения содержания полноразмерного HER2 до 78 и 68%, соответственно, и вызывала появление продуктов деградации с более низкими молекулярными массами. Однако тройная комбинация трастузумаба, пертузумаба и одного из исследуемых антител против HER2 вызывала интенсивное разрушение HER2, а также появление продуктов деградации HER2. Наибольшие снижения отмечены, когда XMT 1518 или XMT 1520 комбинируют с трастузумабом и пертузумабом, с величиной оставшегося HER2 20 или 31%. Когда антитело XMT 1517 или XMT 1519 комбинируют с трастузумабом и пертузумабом, то снижение составляет, соответственно, 40 или 42% оставшегося HER2 от нормального количества.

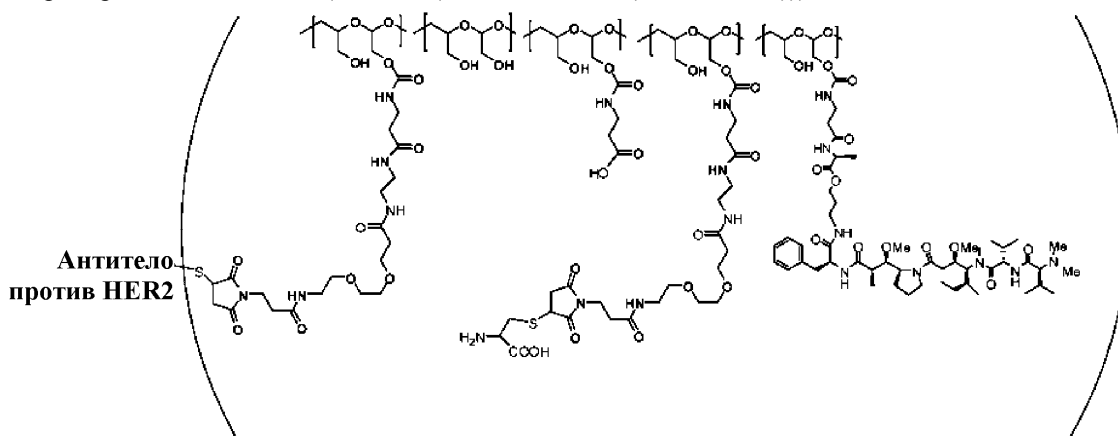
Пример 15. Картирование эпитопов.

Картирование эпитопов антител XMT 1517 и XMT 1519 выполнялось в компании Integral Molecular Inc., 3711 Market Street, Suite 900, г. Филадельфия, штат Пенсильвания, с использованием технологии мутагенеза методом дробовика. В мутагенезе методом дробовика применяется патентованная высокопроизводительная технология клеточной экспрессии, которая дает возможность для экспрессии и анализа больших библиотек мутировавших белков-мишеней внутри эукариотических клеток. Каждый остаток в белке подвергается отдельной мутации, обычно приводящей к получению множества других аминокислот для того, чтобы анализировать изменения в функционировании. Белки экспрессируются в стандартных линиях клеток млекопитающих, поэтому могут быть картированы даже сложные белки, которые требуют эукариотического трансляционного или посттрансляционного процессинга.

Картирование путем мутагенеза методом дробовика идентифицировало шесть критических аминокислот для связывания XMT 1517 (C453, H473, N476, R495, H497 и W499), указывая на то, что XMT 1517 связывается с участками на С-конце доменов III и N-конце домена IV HER2. Две вторичные критические мутации по H456 и G496 также могут быть вовлечены в связывание XMT 1517 с HER2.

Были идентифицированы три критические аминокислоты для связывания XMT 1519 (E521, L525 и R530), указывая на то, что XMT 1519 связывает N-конец домена IV Her2.

Пример 16. Синтез HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala)))



Конъюгаты HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) получали с использованием методики, описанной в заявке США, серийный № 14/512316, поданной 10 октября 2014 г. В табл. VI даны осо-

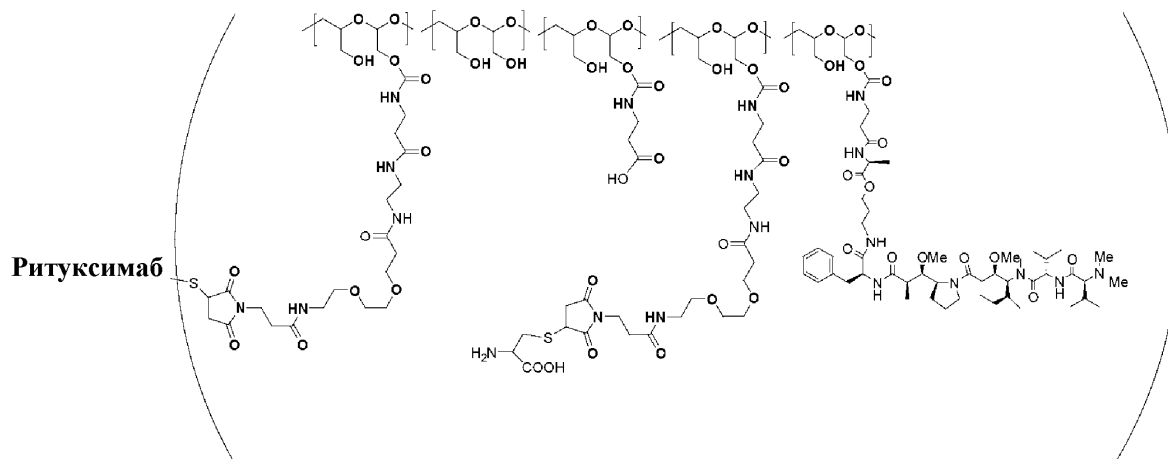
бенности конъюгатов антитело-полимер лекарственное вещество.

Таблица VI

Пример №	Антитело	DAR (Соотнош. лек. в-во:антитело)
16A	Трастузумаб	От около 10:1 до около 15:1
16B	Трастузумаб	От около 16:1 до около 21:1
16C	Трастузумаб	От около 5:1 до около 10:1
16D	ХМТ 1519	От около 11:1 до около 16,5:1
16E	ХМТ 1519	От около 13:1 до около 20:1
16F	ХМТ 1519	От около 12:1 до около 18:1
16G	ХМТ 1517	От около 7:1 до около 10,5:1
16H	ХМТ 1519	От около 11,8:1 до около 17,5:1
16J	ХМТ 1519	От около 8,9:1 до около 13,3:1

Конъюгаты HER2-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) имели пиковую молекулярную массу от около 170 кДа до около 230 кДа. Синтезированный/измеряемый полимер и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность <1,5. Конъюгаты полимер-лекарственное вещество (т.е. лекарственное вещество-несущая полимерная цепь, присоединенная к антителу) содержали от около 27 мол.% до около 33 мол.% β-аланина, от около 6,4 мол.% до около 9,6 мол.% AF-NPA-Ala и от около 1,5 мол.% до около 4 мол.% EG2-MI.

Пример 17. Синтез ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala)))



Конъюгаты ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) (несвязывающий контроль) получали с использованием методики, описанной в заявке США, серийный № 14/512316, поданной 10 октября 2014 г. В табл. VII даны особенности конъюгатов антитело-полимер лекарственное вещество.



Таблица VII

Пример №	Антитело	DAR
		(Соотнош. лек. в-во:антитело)
17A	Ритуксимаб	От около 10:1 до около 15:1
17B	Ритуксимаб	От около 16:1 до около 21:1
17C	Ритуксимаб	От около 10:1 до около 15:1

Конъюгаты HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) имели пиковую молекулярную массу от около 170 кДа до около 230 кДа. Синтезированный/измеряемый полимер и полимерные конъюгаты, как правило, имеют полидисперсность  $\leq 1,5$ . Конъюгаты полимер-лекарственное вещество (т.е. лекарственное вещество-несущая полимерная цепь, присоединенная к антителу) содержали от около 27 мол.% до около 33 мол.%  $\beta$ -аланина, от около 6,4 мол.% до около 9,6 мол.% AF-NPA-Ala и от около 1,5 мол.% до около 4 мол.% EG2-MI.

Пример 18. Анализы цитотоксичности конъюгатов HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))).

Оценивали антипролиферативные свойства конъюгатов HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) на линиях опухолевых клеток *in vitro* с использованием метода Cell Titer-Glo (Promega Corp). Клетки JIMT-1 (клетки со средней экспрессией HER2, DSMZ, г. Брауншвейг, Германия, кат. № ACC589), MDA-MB-361 (клетки рака молочной железы со средней экспрессией HER2, ATCC, кат. № НТВ-27), MDA-MB-453 (трижды негативная линия клеток рака молочной железы, ATCC, кат. № НТВ-131) культивировали в среде DMEM (ATCC, г. Манассас, штат Вирджиния, кат. № 30-2002) с 10% ФБС (Gibco®, Life Technologies, г. Гранд Айленд, штат Нью-Йорк, кат. № 16140-071). Клетки NCI-H522 (линия клеток немелкоклеточной карциномы легких, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-5810) и NCI-H2170 (линия клеток немелкоклеточной карциномы легких, ATCC, кат. № CRL-5928) культивировали в среде RPMI-1640 (ATCC, кат. № 30-2001). Клетки NCI-H1581 (линия клеток немелкоклеточной карциномы легких со средней экспрессией, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-5878) культивировали в среде DMEM:F12 (ATCC, кат. № 30-2006). SNU5 (линия клеток карциномы желудка, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-5973) культивировали в среде Дульбекко в модификации Искова (Invitrogen Life Technologies, кат. № 12440053) с 20% ФБС. OVCAR3 (линия клеток аденокарциномы яичников, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-161) культивировали в среде RPMI с 20% ФБС. MDA-MB-175-VII (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-25) культивировали в среде Лейбовица L-15 с 20% ФБС. САМА-1 (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-21) культивировали в 90% минимальной эссенциальной среде Игла, приготовленной ATCC. ZR75-1 (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-1500) культивировали в среде RPMI-1640. HCC1187 (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-2322) культивировали в среде RPMI-1640. HCC38 (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-2314) культивировали в среде RPMI-1640. T47D (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-133) культивировали в среде RPMI-1640. HCC70 (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-2315) культивировали в среде RPMI-1640. MDA-MB-231 (линия клеток рака молочной железы человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-26) культивировали в среде DMEM. CALU3 (линия клеток аденокарциномы легких человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-55) культивировали в приготовленной ATCC минимальной эссенциальной среде Игла. A549 (линия клеток карциномы легких человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CCL-185) культивировали в среде F12K. NCI-H2122 (линия клеток аденокарциномы легких человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-5985) культивировали в среде RPMI-1640, (ATCC, кат. № 30-2001). NCI-H460 (линия клеток карциномы легких человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-177) культивировали в среде RPMI-1640, (ATCC, кат. № 30-2001). SHP-77 (линия клеток мелкоклеточного рака легких человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-2195) культивировали в среде RPMI-1640, (ATCC, кат. № 30-2001). КАТО III (линия клеток карциномы желудка человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № НТВ-103) культивировали в среде Дульбекко в модификации Искова с 20% ФБС. MKN-45 III (линия клеток аденокарциномы желудка человека, не амплифицирующая, DSMZ, г. Брауншвейг, Германия, кат. № ACC409) культивировали в среде RPMI-1640, (ATCC, кат. № 30-2001). SKOV3 (линия клеток аденокарциномы яичников человека, ATCC, кат. № НТВ-77) культивировали в среде Мак-Коя 5a. TOV-21G (линия клеток аденокарциномы яичников человека, не амплифицирующая, ATCC, кат. № CRL-11730) культивировали в смеси 1:1 среды MCDB 105, содержащей конечную концентрацию 1,5 г/л бикарбоната натрия, и среды 199, содержащей конечную концен-

трацию 2,2 г/л бикарбоната натрия. BT474 (клетки рака молочной железы человека с высокой экспрессией HER2, ATCC, кат. № HTB-20) культивировали в среде DMEM с 10% ФБС. NCI-N87 (линия клеток рака желудка с высокой экспрессией HER2, ATCC, кат. № CRL-5822) выращивали в среде RPMI-1640 с 10% ФБС.

Для проведения анализа цитотоксичности клетки высевали при плотности 3000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты и давали возможность прикрепиться в течение ночи инкубацией при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Затем среду заменяли свежей средой, содержащей конъюгаты HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) в диапазоне концентраций (от 100 нМ до 0,1 пМ) или препарат Кадсила (Genentech), и клетки инкубировали в течении 72 ч или 6 суток при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Выживаемость клеток измеряли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток CellTiter-Glo® (Promega, г. Мадисон, Висконсин), как описано в инструкциях к набору. Жизнеспособность клеток нормализовали к необработанному контролю и выражали в виде процентного отношения. Значения отображали на графике и рассчитывали значения IC<sub>50</sub> с помощью программного обеспечения Graphpad Prism (г. Сан-Диего, штат Калифорния) с использованием 4-параметрического алгоритма подбора кривых доза-ответ с переменным наклоном. На табл. VIII даны наглядные результаты цитотоксичности конъюгатов HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) и Кадсилы.

Таблица VIII

Линия клеток	К-во молекул HER2 на клетку	Экспрессия Her2	IC <sub>50</sub> (нМ)				Кадсила
			Пример 16G	Пример 16D	Пример 16B	Пример 16E	
JMT-1	80000	2+	0,1	0,6	0,3 <sup>b</sup>	НО	17,5
MDA-MB-453	125000	2+	НО	0,04	0,04/0,0 8	0,04	~100
MDA-MB-361	135000	2+	НО	0,02	0,005/ 0,001	НО	0,27/0,3 3
MDA-MB-175VII	51000	1+	НО	НО	0,1	0,3	1,2
SAMA-1	50000	1+	НО	НО	0,02	0,1	7,8
ZR75-1	40000	1+	НО	НО	1,1	2,7	>100
HCC1187	38000	2+	НО	НО	0,8	1,7	30
HCC38	36000	2+	НО	НО	0,8	4	>100
T47D	20000	1+	НО	НО	4,3	1,2	82,3
HCC70	10000	1+	НО	НО	НО	4 <sup>c</sup>	83,4
MDA-MB-231	5400	1+	НО	НО	11	6,3 <sup>c</sup>	27
NCI-H522	25000	1+	НО	0,8	0,18	НО	~100
NCI-H1581	13000	1+	НО	5,6	2,3	НО	~100
NCI-H2170	660000	3+	НО	НО	0,07	0,08	0,4
CALU3	330000	3+	НО	НО	0,25	0,15	>100
NCI-H2122	12000	1+	НО	НО	0,5	2,5	19
A549	6000	1+	НО	НО	20	10,8 <sup>c</sup>	>100
NCI-H460	4000	1+	НО	НО	16	20 <sup>c</sup>	68

НО - не определялось;

b - в анализе использовали пример 16С вместо примера 16В;

c - активность, эквивалентная по релевантному контролю антителя.

Как показано в табл. VIII, все конъюгаты антители против HER2-полимер-лекарственное вещество являются более активными, чем Кадсила для всех исследованных линий клеток.

Пример 19. Анализ цитотоксичности конъюгатов HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) на линии клеток с мутантным HER2.

Оценивали антипролиферативные свойства конъюгатов HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-HPA-Ala))) на линиях опухолевых клеток *in vitro* с использованием метода Cell Titer-Glo (Promega Corp.). NCI-H1781 (клетки рака легких человека, экспрессирующие мутантный HER2, ATCC, кат. № CRL-5894) культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% ФБС.

Для проведения анализа цитотоксичности клетки высевали при плотности 3000 клеток на лунку в 96-луночные планшеты и давали возможность прикрепиться в течение ночи инкубацией при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Затем среду заменяли свежей средой, содержащей конъюгаты HER2-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) в диапазоне концентраций (от 100 нМ до 0,1 пМ), пример 17A (ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) или препарат Кадсила (Genentech), и клетки инкубировали в течение 72 ч при 37°C в присутствии 5% CO<sub>2</sub>. Выживаемость клеток измеряли с использованием люминесцентного анализа жизнеспособности клеток (Promega, г. Мадисон, Висконсин), как описано в инструкциях к набору. Жизнеспособность клеток нормализовали к необработанному контролю и выражали в виде процентного отношения. Значения отображали на графике и рассчитывали значения IC<sub>50</sub> с помощью программного обеспечения Graphpad Prism (г. Сан-Диего, штат Калифорния) с использованием 4-параметрического алгоритма подбора кривых доза-ответ с переменным наклоном. В табл. IX даны результаты этих анализов.

Таблица IX

Линия клеток	К-во молекул HER2 на клетку	IC <sub>50</sub> (нМ)			
		Пример 16E	Пример 16J	Пример 17A	Кадсила
NCI-H1781	8500	0,71	0,75	1,8	5,8

Как показано в табл. IX, все конъюгаты антитело против HER2-полимер-лекарственное вещество являются более активными, чем Кадсила для всех исследованных линий клеток.

Пример 20. Ответ в отношении роста опухоли на введение конъюгатов PBRM-полимер-лекарственное вещество.

Самкам мышей CB-17 SCID подкожно инокулировали клетки NCI-N87 (n=10 для каждой группы), клетки JIMT-1 (n=10 для каждой группы), клетки SNU-5 (n=10 для каждой группы), клетки H522 (n=10 для каждой группы), клетки SKOV3 (n=10 для каждой группы), клетки Calu-3 (n=10 для каждой группы), устойчивые к Кадсиле клетки NCI-N87 (n=10 для каждой группы), устойчивые к Кадсиле клетки NCI-N87-MSA (n=10 для каждой группы) или фрагменты опухолей BT474 (n=10 для каждой группы). Самкам NCr nu/nu подкожно инокулировали клетки TOV-21G (n=10 для каждой группы). Дозы исследуемых соединений или носителя вводили ВВ в виде однократной дозы на сутки 1 или как указано. Размер опухоли измеряли в моменты времени, указанные на фиг. 8-18 с использованием цифровых циркулей. Рассчитывали объем опухоли и использовали его для определения задержки роста опухоли. Мышей умерщвляли, когда опухоли достигали размера от 800 до 1500 мм<sup>3</sup>. Объемы опухолей для каждой группы приводятся как среднее значение ± SEM.

На фиг. 9 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки NCI-N87 (n=10 для каждой группы) после ВВ введения носителя; примера 16A, трастузумаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг, или примера 16D, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. Для носителя и трастузумаба-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показано увеличение объема опухолей. Для ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показано 60% частичных регрессий, и он привел к получению потенциальной терапевтической активности (TGI 88%) на основе анализа ингибирования роста опухолей на сутки 29.

На фиг. 10 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки JIMT-1 (n=10 для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 20 мг/кг; примера 16A, трастузумаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг, или примера 16D, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. Для носителя и Кадсилы показано увеличение объема опухолей. Для конъюгатов трастузумаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) и ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показан терапевтический потенциал, и они обеспечили, соответственно, 40 и 70% регрессий. ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) обеспечил 5 частичных регрессий и 2 полные регрессии, которые в конце исследования на сутки 69 оставили безопухолевых выживших.

На фиг. 11 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки JIMT-1 (n=10 для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы на сутки 1; комбинации Кадсилы, в дозе 10 мг/кг, и пертузумаба, в дозе 15 мг/кг, вводимых еженедельно в течение 3 недель, или примера 16D, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. Для всех носителя, Кадсилы и комбинации Кадсила и пертузумаба показано увеличение объема опухолей. Для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показано 60% частичных регрессий и он был наиболее эффективным.

На фиг. 12 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки NCI-N87 (n=10 для каждой группы) после ВВ введения носителя; примера 16F, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг в виде однократной дозы на сутки 1; комбинации

трастузумаба, в дозе 15 мг/кг, и пертузумаба, в дозе 15 мг/кг, вводимых еженедельно в течение 3 недель (т.е. на сутки 1, 8 и 15), или тройной комбинации трастузумаба, в дозе 15 мг/кг, и пертузумаба, в дозе 15 мг/кг, каждый вводили еженедельно в течение 3 недель (т.е. на сутки 1, 8 и 15) вместе с примером 16F, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 0,67 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. Для носителя показано увеличение объема опухолей. Все, самостоятельно ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) или комбинации, показали уменьшение опухоли, а тройная комбинация трастузумаба; пертузумаба и примера 16F являлась наиболее эффективной и приводила к 100% частичной регрессии, в то время как самостоятельно пример 16F или комбинация трастузумаба и пертузумаба, по отдельности приводили к одному частичному ответу из десяти. Данный триплет давал в численном значении большую частоту частичных ответов и приводил к значительно большему уменьшению объема опухолей ( $p < 0,05$ , критерий Манна-Уитни) по сравнению с либо примером 16F в виде монотерапии, либо дублетом трастузумаб + пертузумаб. Частичный ответ определяют как регрессию до менее чем 50% исходного объема опухоли, сохраняемую в течение по меньшей мере 3 последовательных измерений опухолей.

Полезность относительно общей выживаемости для ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) в комбинации с пертузумабом и трастузумабом значительно отличается по сравнению с введением одного ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) ( $P < 0,011$ , логранговый критерий) и превышала исходы, достигнутые для комбинации пертузумаба и трастузумаба ( $P < 0,273$ , логранговый критерий) или тройной комбинации антител ХМТ-1519, пертузумаба и трастузумаба ( $P < 0,05$ , логранговый критерий).

На фиг. 13 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки SNU-5 ( $n=10$  для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 5, 2 или 0,67 мг/кг в виде однократной дозы, или примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 5 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. На сутки 18 для носителя показано увеличение объема опухолей. Для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) показано уменьшение опухолей и он был эффективнее, чем Кадсила и ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), и привел к 100% безопухоловой выживаемости в дозах 5 и 2 мг/кг и 90% безопухоловой выживаемости в дозе 0,67 мг/кг.

На фиг. 14 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки TOV-21G ( $n=10$  для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 5 или 2 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. Для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) показана задержка развития опухоли и он был эффективнее, чем Кадсила, которая не достигла порогового значения терапевтической активности.

На фиг. 15 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки H522 ( $n=10$  для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 5 мг/кг в виде однократной дозы, или примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 5 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. Для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) показана задержка развития опухоли, и он был эффективнее, чем Кадсила и ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), которые не достигли порогового значения терапевтической активности.

На фиг. 16 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки SKOV3 ( $n=10$  для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Е, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 5 мг/кг в виде однократной дозы, или примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 5 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) привел к 100% регрессий, состоящих из 10 полных ответов, и он был эффективнее, чем Кадсила и ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), которые не достигли порогового значения терапевтической активности.

На фиг. 17 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали клетки Calu-3 ( $n=10$  для каждой группы) после ВВ введения носителя или примера 16F, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 5 мг/кг, в виде однократной дозы на сутки 1. ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) привел к 100% регрессий, состоящих из двух частичных ответов и восьми полных ответов, шесть из которых сохраняли статус безопухоловых на 60 сутки.

На фиг. 18 представлены результаты ( $n=8$  для каждой группы) ответа опухоли в модели BRE-0333 HER21+ ксенотрансплантата, полученного у пациента, после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Н, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 3 мг/кг в виде однократной дозы, или примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 3 мг/кг на сутки 1. Для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PNF-BA-(AF-NPA-Ala))) показана задержка развития опухоли, и он был эффективнее, чем Кадсила или ритуксимаб-(EG2-

MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))).

На фиг. 19 представлены результаты (n=10 для каждой группы) ответа опухоли в модели MAXF1162 HER23+ ксенотрансплантата, полученного у пациента, после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 10 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Н, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 1 или 3 мг/кг, или примера 17В, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 3 мг/кг в виде однократной дозы на сутки 1. ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) как в дозе 1, так и 3 мг/кг приводил к 100% регрессионным ответам и безопухоловой выживаемости, и он был эффективнее, чем Кадсила или ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) в дозе 3 мг/кг.

На фиг. 20 представлены результаты ответа опухоли у мышей, которым подкожно инокулировали фрагменты опухолей BT474 (n=10 для каждой группы) после ВВ введения носителя; Кадсилы, в дозе 5 мг/кг в виде однократной дозы; примера 16Н, ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 5 или 2 мг/кг в виде однократной дозы на сутки 1; примера 17С, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))), в дозе 5 мг/кг в виде однократной дозы на сутки 1, или ХМТ 1519, в дозе 5 мг/кг в виде однократной дозы. Для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показаны полные регрессии опухолей, и он был эффективнее, чем Кадсила, ритуксимаб-(EG2-MI-(10 кДа PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) или ХМТ-1519.

Однократные дозы 1 или 0,67 мг/кг конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показали полную регрессию в моделях рака молочной железы и желудка с низкой экспрессией HER2, в которых адо-трастузумаб эмтанзин (Кадсила) был неактивен в дозах 10 мг/кг и выше. В обусловленных HER2 моделях опухолей для конъюгата ХМТ 1519-(EG2-MI-(PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) показана синергичная эффективность в комбинации с широко применяемыми анти-HER2 лекарственными средствами трастузумабом и пертузумабом. Конъюгат ХМТ 1519-(EG2-MI-(PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) продемонстрировал превосходный фармакокинетический профиль и хорошо переносился животными приматами в терапевтических дозах.

Данные доклинических исследований дают основание предполагать, что конъюгат ХМТ 1519-(EG2-MI-(PHF-BA-(AF-NPA-Ala))) обладает потенциально большим охватом количества пациентов, которые могут получить пользу от HER2-таргетированных видов терапии. Данный конъюгат обеспечивает эффективную доставку в раковые очаги, в которых присутствует всего лишь 10000 рецепторов HER2, при которых другие виды терапий являются неактивными.

Другие варианты реализации изобретения.

Поскольку изобретение описано в сочетании с его подробным описанием, то последующее описание направлено на иллюстрирование и не ограничивает объем изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации изобретения находятся в пределах объема следующей формулы изобретения.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, причем выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит область, определяющую комплементарность (CDRH1), варибельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность FTFSSYSMN (SEQ ID NO: 25); область, определяющую комплементарность (CDRH2), варибельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность YISSSSTIYYADSVKG (SEQ ID NO: 26); область, определяющую комплементарность (CDRH3), варибельного домена тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GGHGYFDL (SEQ ID NO: 27); область, определяющую комплементарность (CDRL1), варибельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 28); область, определяющую комплементарность (CDRL2), варибельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность GASSRAT (SEQ ID NO: 21), и область, определяющую комплементарность (CDRL3), варибельного домена легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность QQYHNSPLT (SEQ ID NO: 29).

2. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит варибельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13, и варибельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14.

3. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

4. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело, доменное антитело, однопочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, од-

ноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv), фрагмент scFv-Fc, одноцепочечное антитело (scAb), доменное антитело (dAb), антитело с одним доменом тяжелой цепи или антитело с одним доменом легкой цепи.

5. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело кролика, мыши, химерное, гуманизированное или полностью человеческое моноклональное антитело.

6. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой изотип IgG.

7. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой изотип IgG1.

8. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из предыдущих пунктов.

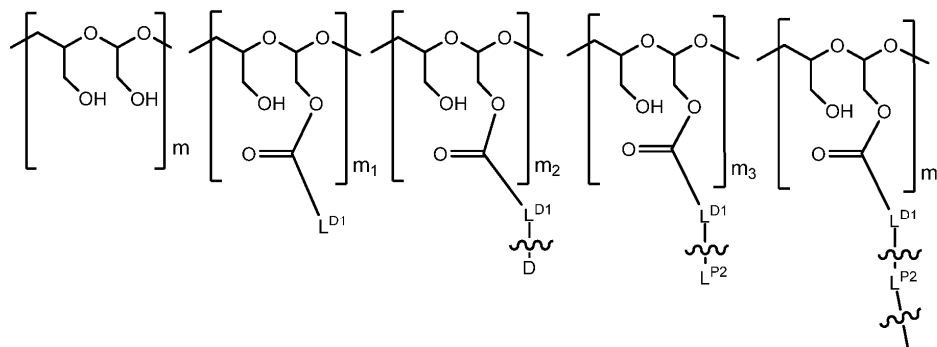
9. Вектор для экспрессии антитела по любому из пп.1-7, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п.8.

10. Способ получения выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-7 путем культивирования клетки в условиях, которые приводят к экспрессии указанного выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в котором клетка содержит вектор по п.9.

11. Конъюгат для лечения, предотвращения, замедления прогрессирования рака, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, рака пищевода, рака гортани, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, рака яичника, рака простаты, рака легких, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почек и рака желудочно-кишечного тракта, содержащий выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7 и одно или более терапевтических средств (D), причем конъюгат содержит один или более полимерных каркасов, соединенных с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, причём одно или более D независимо соединены с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством одного или более полимерных каркасов.

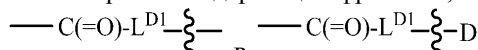
12. Конъюгат по п.11, отличающийся тем, что каждый из одного или более полимерных каркасов независимо содержит поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметилформаль) (PHF), имеющий молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 40 кДа.

13. Конъюгат по п.12, отличающийся тем, что каждый из одного или более полимерных каркасов независимо представлен формулой (Ic)

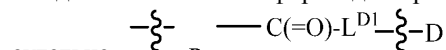


(Ic),

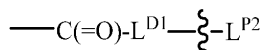
где  $L^{D1}$  представляет собой карбонилсодержащий фрагмент;



каждое присутствие независимо представляет собой первый линкер, который содержит биоразрушаемую связь, такую что, когда связь разрушается, то D высвобождается в активной форме для проявления своего предполагаемого терапевтического действия; а присутствие

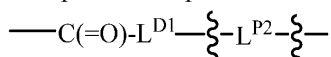


между  $L^{D1}$  и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к  $L^{D1}$ ;



каждое присутствие независимо представляет собой второй линкер, еще не соединенный с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в котором  $L^{P2}$  представляет собой фрагмент, содержащий функциональную группу, которая все же должна будет образовать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего

фрагмента, а  $\xi$  между  $L^{D1}$  и  $L^{P2}$  обозначает непосредственное или опосредованное присоединение  $L^{P2}$  к  $L^{D1}$ , и каждое присутствие второго линкера не совпадает с каждым присутствием первого линкера;



каждое присутствие независимо представляет собой третий линкер, который соединяет каждый D-несущий полимерный каркас с выделенным антителом или его антиген-

связывающим фрагментом, в котором концевой  $\xi$ , присоединенный к  $L^{P2}$ , обозначает непосредственное или опосредованное присоединение  $L^{P2}$  к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту при образовании ковалентной связи между функциональной группой  $L^{P2}$  и функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента; а каждое присутствие третьего линкера не совпадает с каждым присутствием первого линкера;

$m$  представляет собой целое число от 1 до около 300;

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140;

$m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40;

$m_3$  представляет собой целое число от 0 до около 18;

$m_4$  представляет собой целое число от 1 до около 10;

сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  находится в диапазоне от около 15 до около 300; а

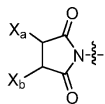
общее количество  $L^{P2}$ , соединенных с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, составляет 10 или меньше.

14. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  находится в диапазоне от 15 до 150,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до 70,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до 20,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до 10, а PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа.

15. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  находится в диапазоне от 20 до 110,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до 50,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до 15,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до 8; а PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа.

16. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$  и  $m_4$  находится в диапазоне от 40 до 75,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до 35,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до 10,  $m_3$  представляет собой целое число от 0 до 5; а PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа.

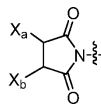
17. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что функциональную группу  $L^{P2}$  выбирают из  $\text{-SR}^P$ ,  $\text{-S-S-}$



LG, и галогена, в которой LG представляет собой замещаемую группу,  $R^P$  представляет собой H или защитную группу серы, один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидо-блокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$  вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную углерод-углеродную связь.

18. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что L содержит  $\text{-X-(CH}_2\text{)}_v\text{-C(=O)-}$  с X, непосредственно соединенным с карбонильной группой  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---}$ , в которой X представляет собой  $\text{CH}_2$ , O или NH, а v представляет собой целое число от 1 до 6.

19. Конъюгат по п.13, отличающийся тем, что каждое присутствие  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}$  независимо представляет собой  $\text{-C(=O)-X-(CH}_2\text{)}_v\text{-C(=O)-NH-(CH}_2\text{)}_u\text{-NHC(=O)-(CH}_2\text{)}_w\text{-(OCH}_2\text{CH}_2\text{)}_x\text{-NHC(=O)-(CH}_2\text{)}_y\text{-M}$ , в котором X представляет собой  $\text{CH}_2$ , O или NH, каждый из v, u, w, x и y независимо представ-

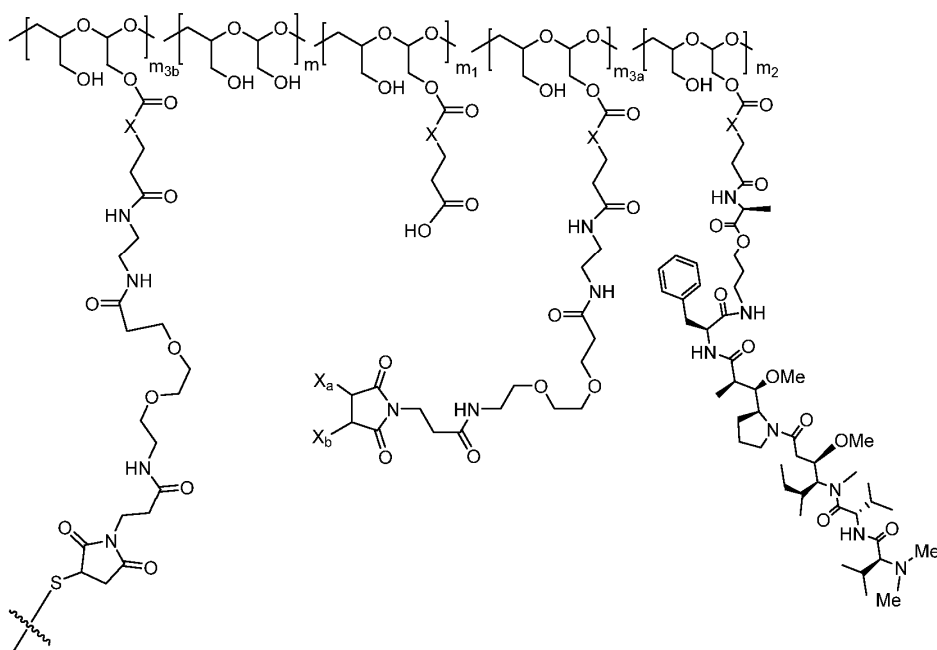


ляет собой целое число от 1 до 6, а M представляет собой  $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}$ , где один из  $X_a$  и  $X_b$  представляет собой H, а другой - водорастворимый малеимидо-блокирующий фрагмент, или  $X_a$  и  $X_b$  вместе с атомами углерода, к которым они присоединены, образуют двойную углерод-углеродную связь.

20. Конъюгат по п.19, отличающийся тем, что каждый из v, u, w, x и y равен 2.

21. Конъюгат по любому из пп.11-20, отличающийся тем, что каждый из одного или более D представляет собой терапевтическое средство, имеющее молекулярную массу  $\leq 5$  кДа.

22. Конъюгат по п.11, дополнительно содержащий один или более D-несущих полимерных каркасов, соединенных с выделенным антителом, причем каждый из одного или более полимерных каркасов независимо представлен формулой (Id)



(Id),

где  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17,

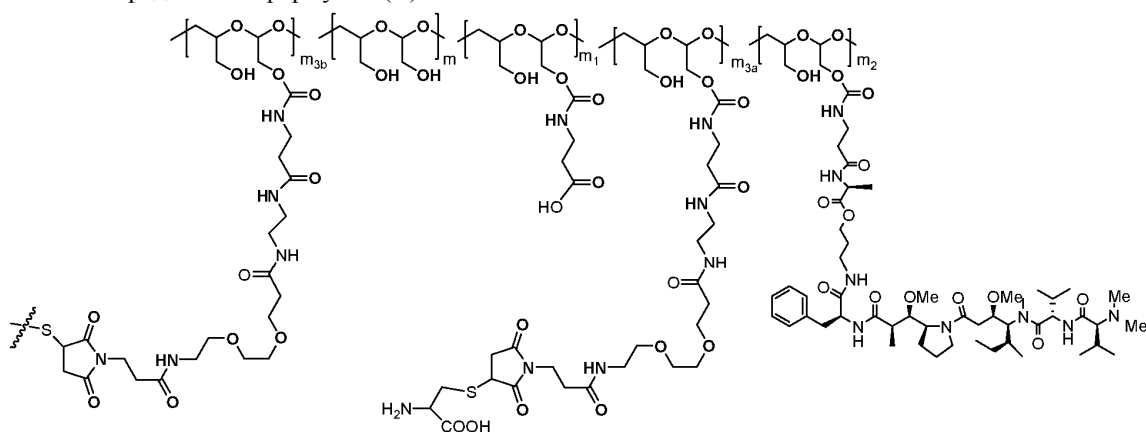
$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, а

концевой  $\text{---}\xi\text{---}$  обозначает прямое присоединение одного или более полимерных каркасов к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, и при этом соотношение между D-несущими полимерными каркасами и антителом составляет 10 или меньше.

23. Конъюгат по любому из пп.11-20, отличающийся тем, что выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент имеет молекулярную массу 40 кДа или больше.

24. Конъюгат по п.11 или 22, отличающийся тем, что каждый из одного или более D независимо соединен с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством одного или более неполимерных связывающих фрагментов.

25. Конъюгат по п.11, дополнительно содержащий один или более D-несущих полимерных каркасов, соединенных с выделенным антителом, причем каждый из одного или более полимерных каркасов независимо представлен формулой (If)



(If),

где  $m$  представляет собой целое число от 1 до около 300;

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140;

$m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40;

$m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 17;

$m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8;



сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 и до около 18; а  
сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 300;

концевой  $\xi$  обозначает присоединение одного или более полимерных каркасов к выделенному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, и

при этом соотношение между D-несущими полимерными каркасами и антителом составляет 10 или меньше.

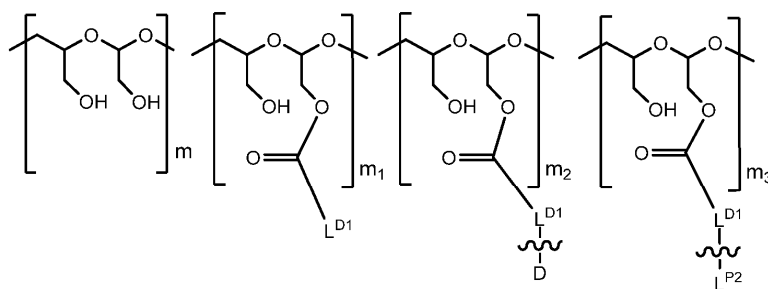
26. Конъюгат по п.25, отличающийся тем, что РНФ в формуле (If) имеет молекулярную массу в диапазоне от около 2 кДа до около 20 кДа, сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 15 до около 150,  $m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 70,  $m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 20,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 9,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 10, а соотношение между РНФ и выделенным анти-HER2 антителом представляет собой целое число от 2 до около 8.

27. Конъюгат по п.25, отличающийся тем, что РНФ в формуле (If) имеет молекулярную массу в диапазоне от около 3 кДа до около 15 кДа, сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 20 до около 110,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 50,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 15,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 7,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 8, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 8, а соотношение между РНФ и выделенным анти-HER2 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом представляет собой целое число от 2 до около 8.

28. Конъюгат по п.25, отличающийся тем, что РНФ в формуле (If) имеет молекулярную массу в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа, сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 40 до около 75,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 35,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 10,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 4,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 5, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 5, а соотношение между РНФ и выделенным анти-HER2 антителом представляет собой целое число от 2 до около 8.

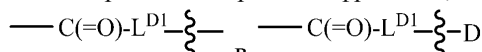
29. Конъюгат по п.25, отличающийся тем, что РНФ в формуле (If) имеет молекулярную массу в диапазоне от около 5 кДа до около 10 кДа, сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от около 40 до около 75,  $m_1$  представляет собой целое число от 2 до около 35,  $m_2$  представляет собой целое число от 2 до около 10,  $m_{3a}$  представляет собой целое число от 0 до около 4,  $m_{3b}$  представляет собой целое число от 1 до около 5, сумма  $m_{3a}$  и  $m_{3b}$  находится в диапазоне от 1 до около 5, а соотношение между РНФ и выделенным анти-HER2 антителом представляет собой целое число от 2 до около 6.

30. Способ получения конъюгата по любому из пп.11-29, включающий стадию, в которой приводят в реакцию выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом рецептора HER2 человека, с полимерным каркасом формулы (Ia) с образованием конъюгата



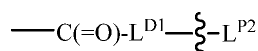
(Ia),

где  $L^{D1}$  представляет собой карбонилсодержащий фрагмент;



каждое присутствие  $\xi$  независимо представляет собой первый линкер, который содержит биоразрушаемую связь, такую что, когда связь разрушается, то D высвобождается в активной форме для проявления своего предполагаемого терапевтического действия; а присутствие  $\xi$  между  $L^{D1}$  и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к  $L^{D1}$ ;

каждое присутствие  $\xi$  между  $L^{D1}$  и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к  $L^{D1}$ ;



каждое присутствие  $\xi$  представляет собой независимо второй линкер, еще не соединенный с выделенным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, в котором  $L^{P2}$  представляет собой фрагмент, содержащий функциональную группу, которая все же должна будет образовать

ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, а  $\overset{-\xi}{-}$  между  $L^{D1}$  и  $L^{P2}$  обозначает непосредственное или опосредованное присоединение  $L^{P2}$  к  $L^{D1}$ , и каждое присутствие второго линкера не совпадает с каждым присутствием первого линкера;

$m$  представляет собой целое число от 1 до около 300;

$m_1$  представляет собой целое число от 1 до около 140;

$m_2$  представляет собой целое число от 1 до около 40;

$m_3$  представляет собой целое число от 1 до около 18; а

сумма  $m$ ,  $m_1$ ,  $m_2$  и  $m_3$  находится в диапазоне от около 15 до около 300.

31. Способ лечения ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, рака пищевода, рака гортани, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, яичника, рака простаты, рака легкого, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почки и рака желудочно-кишечного тракта, у нуждающегося субъекта, в котором субъекту вводят конъюгат по любому из пп.11-29 в терапевтически эффективном количестве.

32. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъект является человеком.

33. Способ по п.31, отличающийся тем, что раковое заболевание выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) и рака яичника.

34. Способ по п.31, дополнительно включающий стадию, в которой субъекту вводят второе средство, где второе средство представляет собой по меньшей мере второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает HER2, причем второе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антитело против HER2, антитело-ингибитор димеризации HER2 или комбинацию антитела против HER2 и антитела-ингибитора димеризации HER2.

35. Способ по п.34, отличающийся тем, что антитело против HER2, антитело-ингибитор димеризации HER2 или комбинация антитела против HER2 и антитела-ингибитора димеризации HER2 включает трастузумаб или пертузумаб или их комбинацию.

36. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъекта идентифицируют как имеющего низкую экспрессию HER2.

37. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъекта идентифицируют как имеющего показатель экспрессии HER2 1+ или 2+, как выявляется иммуногистохимическим (ИГХ) анализом, выполняемым на исследуемой популяции клеток, при этом в исследуемой популяции клеток ген HER2 не амплифицирован.

38. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъект является рефрактерным к химиотерапии.

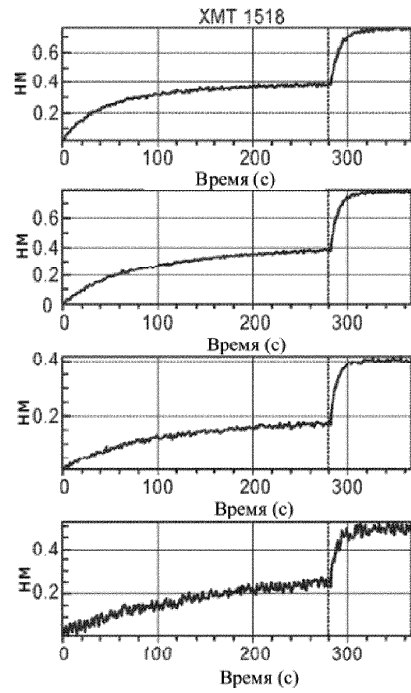
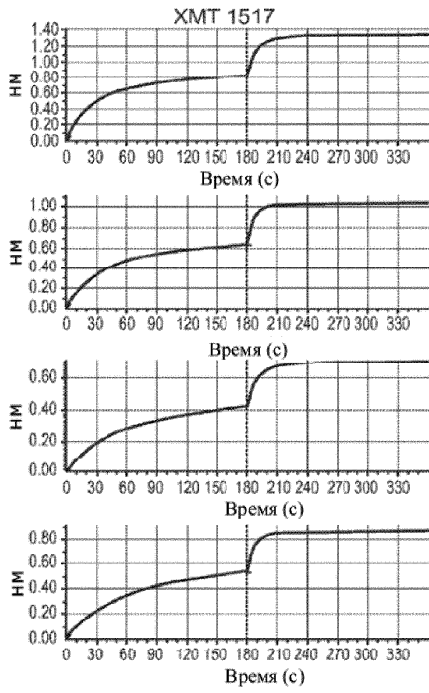
39. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъект не поддается лечению препаратом Кадсила.

40. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъект поддается лечению препаратом Кадсила.

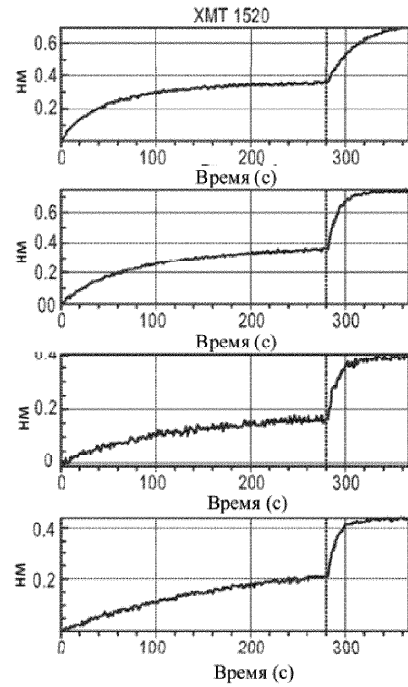
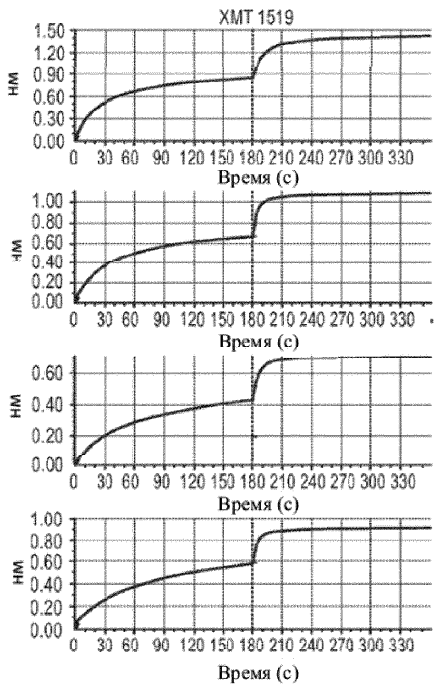
41. Способ по п.31, отличающийся тем, что субъекта идентифицируют как имеющего показатель экспрессии HER2 2+ или 3+, как выявляется иммуногистохимическим (ИГХ) анализом, выполняемым на исследуемой популяции клеток, при этом в исследуемой популяции клеток ген HER2 амплифицирован или является мутировавшим.

42. Применение конъюгата по любому из пп.11-29 для производства лекарственного средства для лечения у субъекта ракового заболевания, выбранного из группы, состоящей из рака анального канала, астроцитомы, лейкоза, лимфомы, рака головы и шеи, рака печени, рака яичек, рака шейки матки, саркомы, рака пищевода, рака гортани, мезотелиомы, рака кожи, миеломы, рака прямой кишки, рака горла, рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака матки, яичников, рака простаты, рака легких, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ), рака толстого кишечника, рака поджелудочной железы, рака почек и рака желудочно-кишечного тракта.

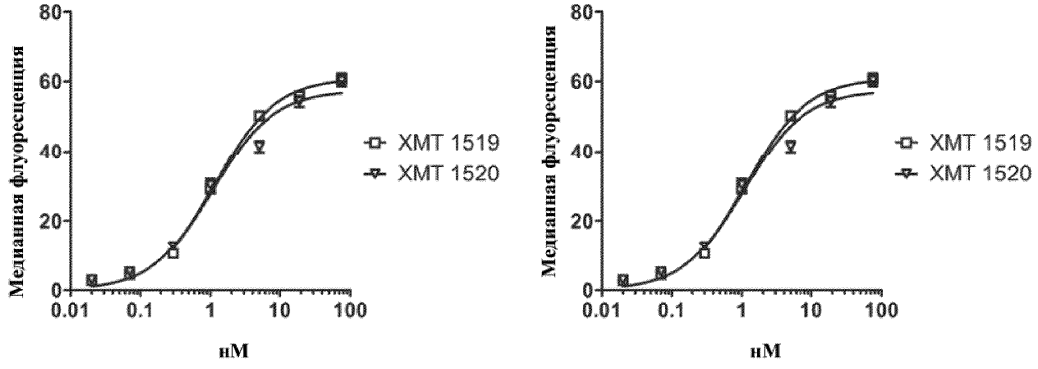
43. Применение по п.42, отличающееся тем, что раковое заболевание выбирают из группы, состоящей из рака молочной железы, рака желудочно-кишечного тракта, немелкоклеточного рака легких (НМРЛ) и рака яичника.



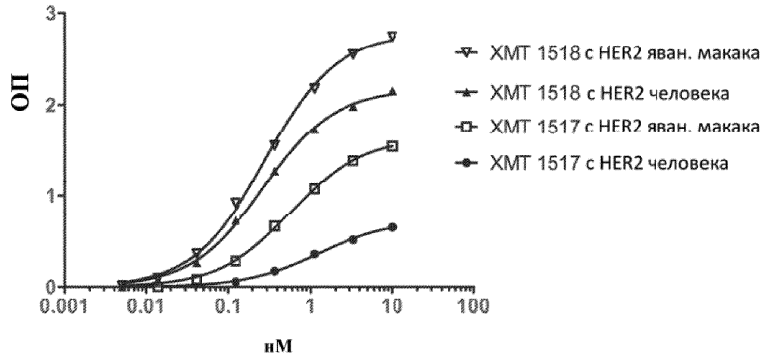
Фиг. 1a



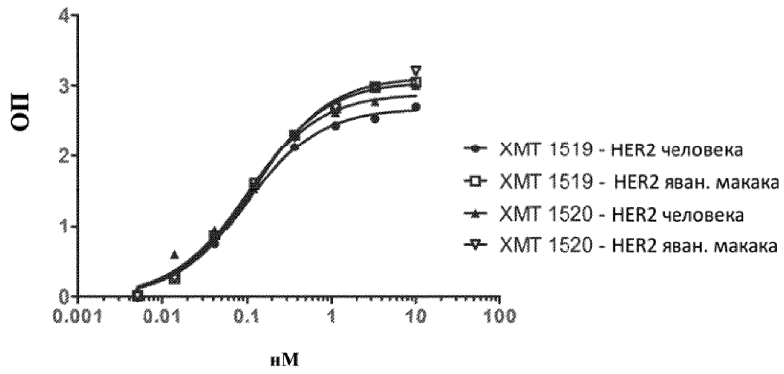
Фиг. 1b



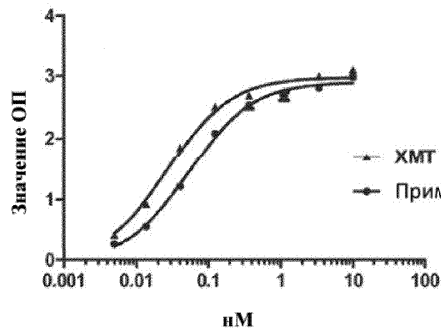
Фиг. 2



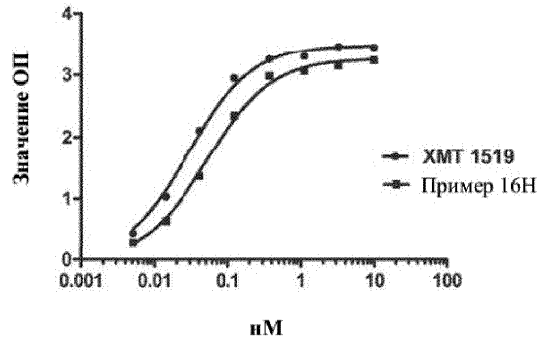
Фиг. 3а



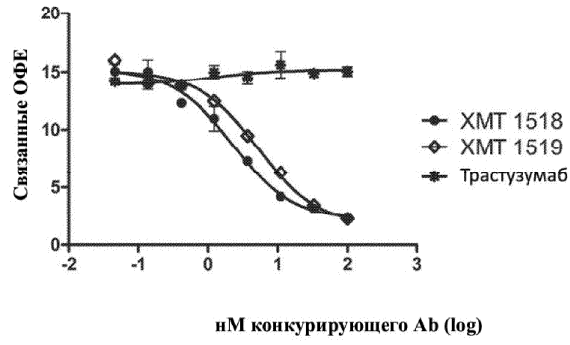
Фиг. 3б



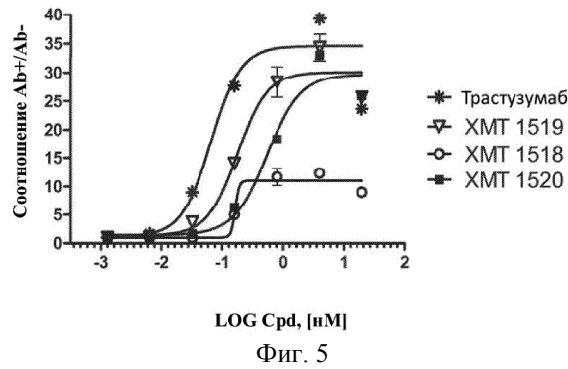
Фиг. 3с



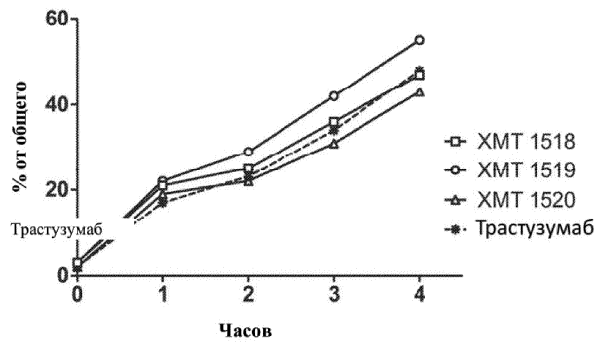
Фиг. 3d



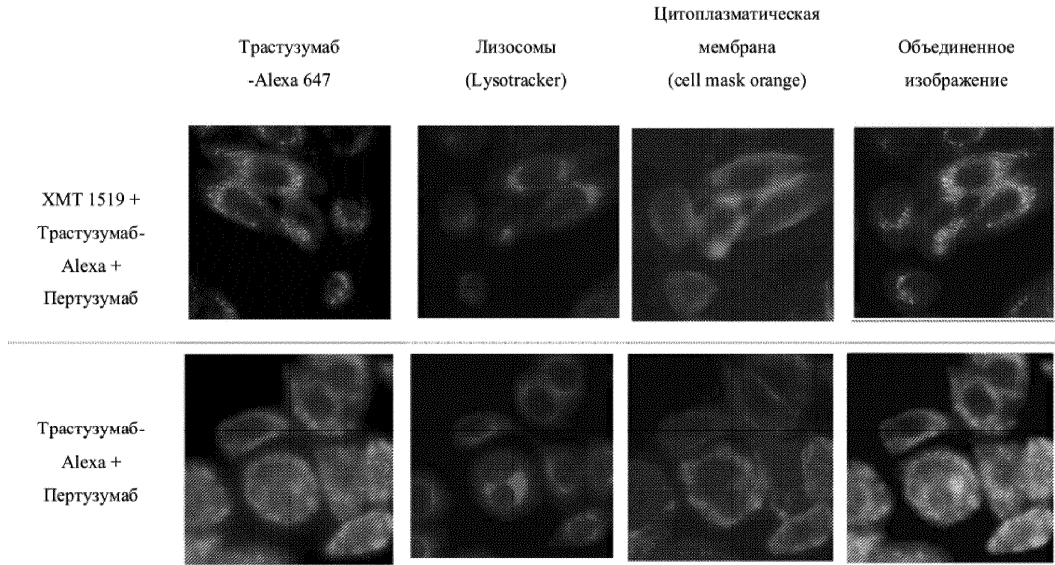
Фиг. 4



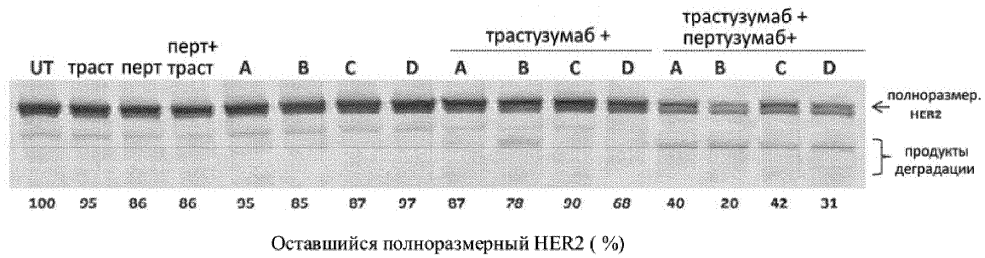
Фиг. 5



Фиг. 6

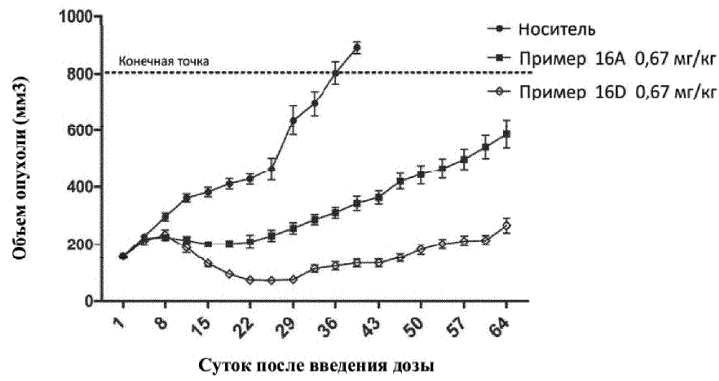


Фиг. 7

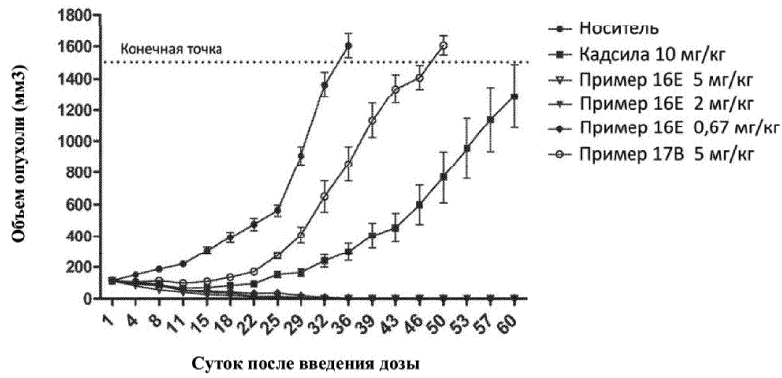
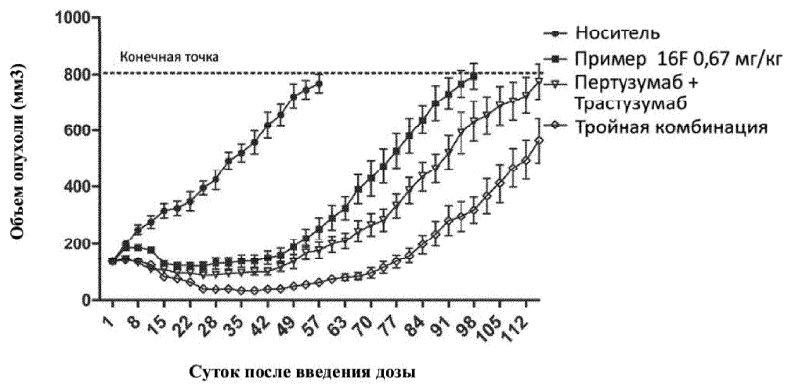
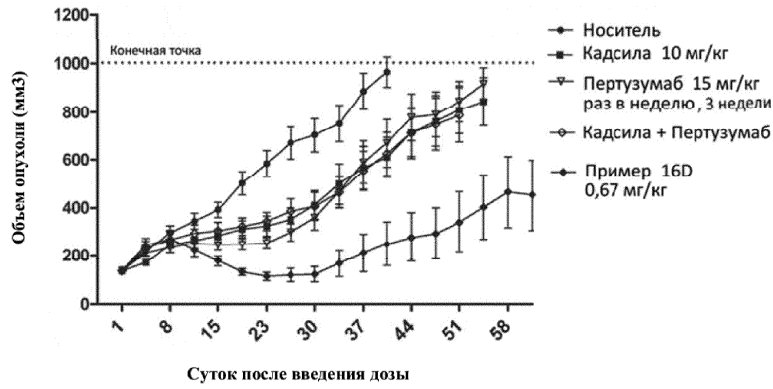
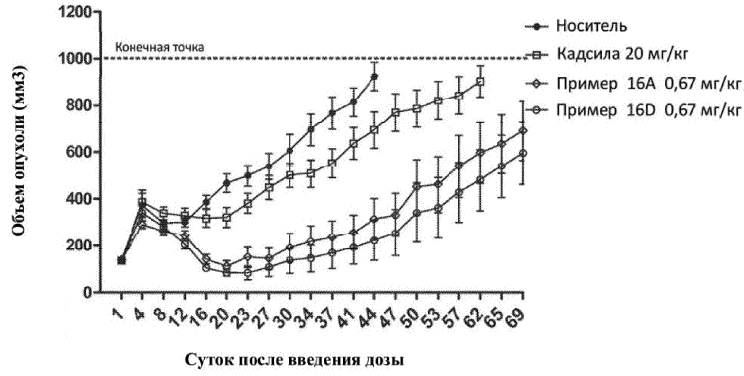


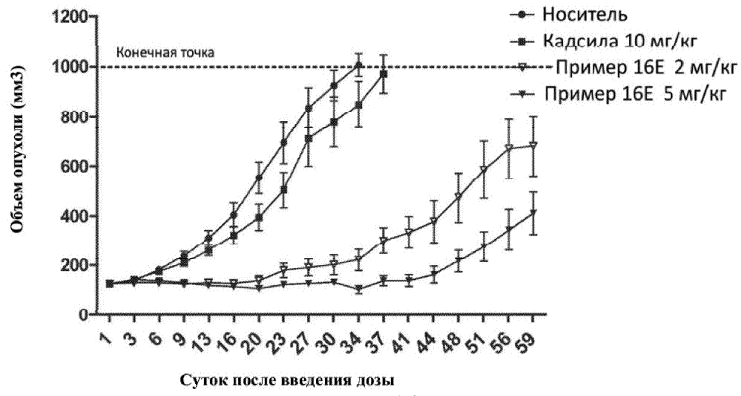
A = ХМТ 1517  
 B = ХМТ 1518      UT = Необработанный  
 C = ХМТ 1519      Траст = Трастузумаб  
 D = ХМТ 1520      Перт = Пертузумаб

Фиг. 8

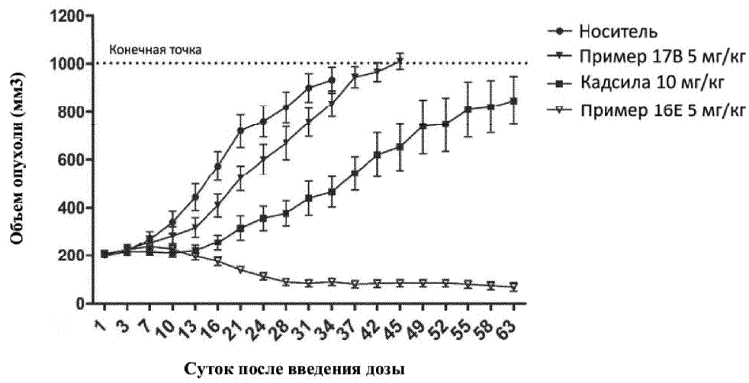


Фиг. 9

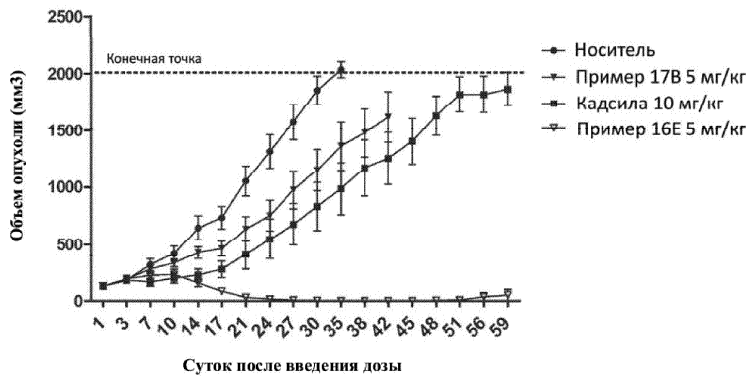




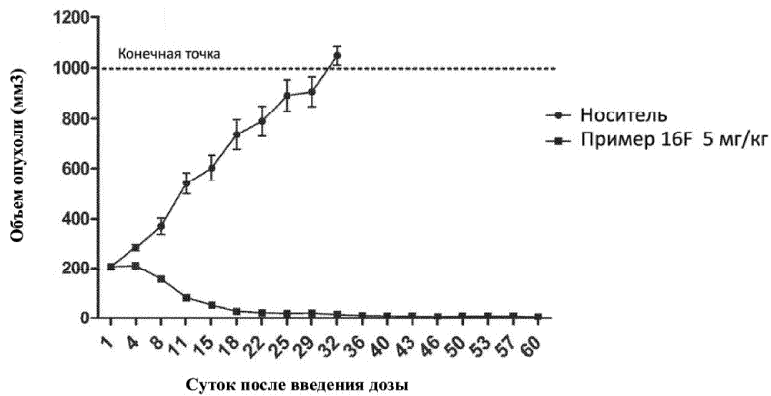
Фиг. 14



Фиг. 15

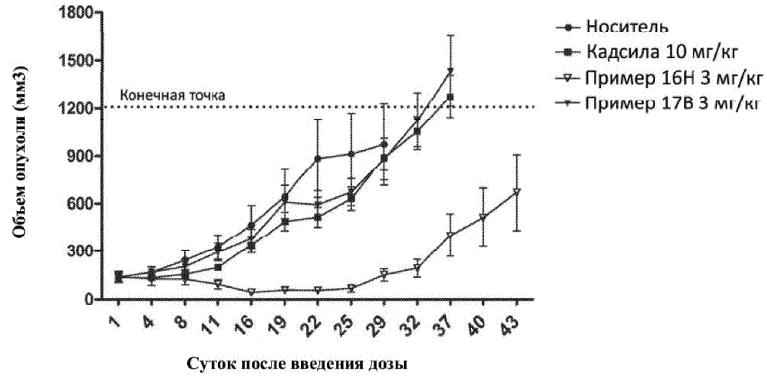


Фиг. 16

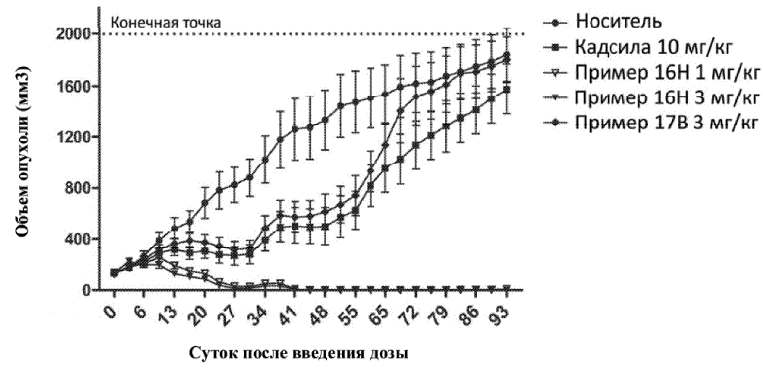


Фиг. 17

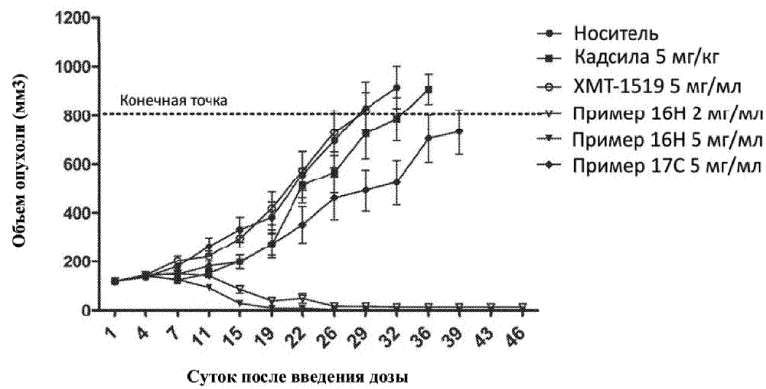




Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

