(19) Евразийское патентное ведомство

(11) 040545 (13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2022.06.21

(21) Номер заявки
201600190

(22) Дата подачи заявки
2014.08.20

(51) Int. Cl. ***C07K 16/28*** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИ-PRLR АНТИТЕЛА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) **61/868,185; 62/012,440; 62/026,088**
(32) **2013.08.21; 2014.06.16; 2014.07.18**
(33) **US**
(43) **2016.08.31**
(86) **PCT/US2014/051831**
(87) **WO 2015/026907 2015.02.26**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ, ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Пападопоулос Николас, Тхурстон Гэвин, Кирсхнер Джессика, Келли Маркус, Ниттоли Томас, Делфино Франк (US)

(74) Представитель:
Безрукова О.М. (RU)

(56) US-A1-2007269438
SISSOM J.F. ET AL.: "ANTI-GROWTH ACTION ON MOUSE MAMMARY AND PROSTATE GLANDS OF A MONOCLONAL ANTIBODY TO PROLACTIN RECEPTOR", AMERICAN JOURNAL OF PATHOLOGY [10640], ELSEVIER INC, US, vol. 133, № 3, 1 December 1988 (1988-12-01), p. 589-595, XP008068076, ISSN: 0002-9440, paragraph [results] - paragraph [discussion]; fig. 2
OKAMURA H. ET AL.: "CHARACTERIZATION AND APPLICATIONS OF MONOCLONAL ANTIBODIES TO THE PROLACTIN RECEPTOR", ENDOCRINOLOGY, THE ENDOCRINE SOCIETY, US, vol. 124, № 4, 1 January 1989 (1989-01-01), p. 2499-2508, XP009099845, ISSN: 0013-7227, p. 2501, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1; tabl. 1, p. 2501, right-hand column, paragraph 1
DAMIANO J.S. ET AL.: "Neutralization of Prolactin Receptor Function by Monoclonal Antibody LFA102, a Novel Potential Therapeutic for the Treatment of Breast Cancer", MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS, vol. 12, № 3, 27 December 2012 (2012-12-27), p. 295-305, XP055153202, ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0886, p. 299, left-hand column, paragraph 4 - right-hand column; fig. 2, p. 297, right-hand column, paragraph 2, p. 298, right-hand column, paragraph 2, p. 303, right-hand column, last paragraph
WO-A2-2008022295
WO-A1-2014105810
WO-A1-2012163932

(57) В настоящем изобретении описаны антитела, связывающиеся с рецептором пролактина (PRLR), и способы их применения. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения антитела по настоящему изобретению с высокой степенью аффинности связывают человеческий рецептор пролактина. В определенных вариантах осуществления изобретение включает антитела, связывающие рецептор пролактина и блокирующие в клетке сигнальный путь с участием пролактина. В других вариантах изобретение включает антитела, которые связывают пролактин, но не блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетке. Антитела согласно изобретению могут быть полностью человеческими антителами. Изобретение включает антитела к PRLR, конъюгированные с цитотоксическим агентом, радионуклидом или другим соединением, нарушающим рост или пролиферацию клеток. Антитела согласно изобретению используются для лечения различных онкологических заболеваний и также других нарушений, связанных с PRLR. Настоящее изобретение включает также конъюгаты антитела с лекарственным средством, содержащие антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфично связываются с цитокиновым рецептором класса I, при этом антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела конъюгированы с цитотоксическим агентом.

040545 B1

040545 B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к антителам и антигенсвязывающим фрагментам антител, которые специфично связываются с рецептором пролактина (PRLR), а также к конъюгатам антитела с лекарственным средством, содержащим такие антитела, и способам их применения.

Предпосылки создания изобретения

Пролактин является гормоном роста, имеющим полипептидную природу, который проявляет свою активность путем взаимодействия с рецептором пролактина (PRLR). Рецептор пролактина является единственным трансмембранным рецептором, принадлежащим к надсемейству рецепторов к цитокинам I класса. Связывание пролактина с PRLR приводит к димеризации рецептора и передаче сигнала внутрь клетки. Передача сигнала с участием PRLR ассоциирована с различными процессами, такими как развитие молочной железы, лактация, репродукция и иммуномодуляция. Кроме того, высокие уровни экспрессии PRLR обнаружены в опухолях молочной железы, предстательной железы и в других типах опухолей.

Блокада передачи сигнала с участием PRLR была предложена в качестве средства для лечения рака молочной железы и рака предстательной железы (см., например, Damiano and Wasserman, апрель 2013 г., Clin. Cancer Res., 19(7):1644-1650). Антитела к PRLR упоминаются, например, в Патентах США № 7867493 и 7422899. Тем не менее в данной области техники существует потребность в инновационных антагонистах PRLR, таких как антитела к PRLR, для лечения рака и других нарушений, ассоциированных с экспрессией PRLR и/или сигнальными путями с участием PRLR.

Краткое изложение сущности изобретения

В настоящем изобретении предложены антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, связывающие человеческий рецептор пролактина (PRLR). Антитела по настоящему изобретению применяются, в частности, для направленного воздействия на опухолевые клетки, экспрессирующие PRLR. Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению и их антигенсвязывающие фрагменты могут использоваться отдельно в немодифицированной форме или могут быть являться частью конъюгата антитела с лекарственным средством или биспецифичного антитела.

Антитела по настоящему изобретению могут быть полноразмерными (например, антитело IgG1 или IgG4) или могут включать только антигенсвязывающую часть антитела (например, фрагмент Fab, $F(ab')_2$ или scFv), а также могут быть модифицированы, чтобы влиять на функциональность, например устранять остаточные эффекторные функции (Reddy et al., 2000, J. Immunol., 19(164):1925-1933).

Примеры антител к PRLR по настоящему изобретению перечислены в табл. 1 и 2 настоящего документа. В табл. 1 содержатся идентификаторы аминокислотных последовательностей вариабельных областей тяжелой цепи (HCVR), вариабельных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность участков тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3) и определяющих комплементарность участков легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3) в типичных антителах к PRLR. В табл. 2 показаны идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2 HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в типичных антителах к PRLR.

В настоящем изобретении предложены антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат, HCVR, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат LCVR, содержащую любую аминокислотную последовательность, выбранную аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащих любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены также антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к PRLR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбирают из группы, состоящей из 18/26, 66/74, 274/282, 290/298 и 370/378.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат в тяжелой цепи участок CDR1 (HCDR1), содержащий любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат в тяжелой цепи участок CDR2 (HCDR2), содержащий любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат в тяжелой цепи CDR3 (HCDR3), содержащий любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат в легкой цепи участок CDR1 (LCDR1), содержащий любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат в легкой цепи участок CDR2 (LCDR2), содержащий любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат в легкой цепи участок CDR3 (LCDR3), содержащий любую аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащих любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в табл. 1, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые содержат пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к PRLR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбирают из группы, состоящей из 24/32, 72/80, 280/288, 296/304 и 376/384.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат набор из шести CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любом из иллюстративных антител к PRLR, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбирают из группы, состоящей из 20-22-24-28-30-32, 68-70-72-76-78-80, 276-278-280-284-286-288, 292-294-296-300-302-304 и 372-374-376-380-382-384.

В настоящем изобретении предложены также антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат набор из шести CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR в любом из иллюстративных антител к PRLR, перечисленных в табл. 1. Например, настоящее изобретение включает антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, специфично связывающиеся с рецептором пролактина, которые содержат набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащийся в паре последовательности аминокислот HCVR/LCVR, которую выбирают из группы, состоящей из 18/26, 66/74, 274/282, 290/298 и 370/378. Способы и приемы идентификации CDR в аминокислотных последовательностях HCVR и LCVR хорошо известны специалистам и могут применяться для идентификации CDR в определенных последовательностях аминокислот HCVR и/или LCVR, раскрытых в настоящем документе. Типичные правила, которые могут быть использованы для идентификации границ CDR, включают, например, определение Кэбата, определение Чотиа и определение AbM. В общем виде определение Кэбата основывается на вариабельности последовательности, определение Чотиа основывается на расположении структурных петлевых участков и определение AbM представляет собой компромиссное решение между подходами Кэбата и Чотиа. См., например, "Последовательность белков, представляющих имму-

нологический интерес", Национальный институт здоровья, Бетесда, Мэриленд. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol., 273:927-948 (1997); и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 86:9268-9272 (1989). Также доступны открытые базы данных для идентификации последовательностей CDR в антителе.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к PRLR или их части. Например, в настоящем изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности HCVR, перечисленные в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из каких-либо последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих HCVR и перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности LCVR, перечисленные в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из каких-либо последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих LCVR и перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности HCDR1, перечисленные в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из каких-либо последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих HCDR1 и перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности HCDR2, перечисленные в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из каких-либо последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих HCDR2 и перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности HCDR3, перечисленные в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из каких-либо последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих HCDR3 и перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любые аминокислотные последовательности LDR1, перечисленные в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидных последовательностей LCDR1, перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LDR2, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидных последовательностей LCDR2, перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LDR3, перечисленных в табл. 1. В определенных вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидных последовательностей LCDR3, перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, отличающиеся тем, что HCVR содержит набор из трех CDR (например, HCDR1-HCDR2-HCDR3), причем набор последовательностей аминокислот HCDR1-HCDR2-HCDR3 определяется любым из иллюстративных антител к PRLR, перечисленных в табл. 1.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, отличающиеся тем, что LCVR содержит набор из трех CDR (например, LCDR1-LCDR2-LCDR3), причем набор последовательностей аминокислот LCDR1-LCDR2-LCDR3 определяется любым из иллюстративных антител к PRLR, перечисленных в табл. 1.

В настоящем изобретении предложены также молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR и LCVR, отличающиеся тем, что HCVR содержит любую из аминокислотных последовательностей

HCVR, перечисленных в табл. 1, и тем, что LCVR содержит любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения молекула нуклеиновой кислоты содержит любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидных последовательностей HCVR, перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%, и любую полинуклеотидную последовательность, выбранную из полинуклеотидных последовательностей LCVR, перечисленных в табл. 2, или существенно сходную последовательность с уровнем идентичности, составляющим не менее 90%, не менее 95%, не менее 98% или не менее 99%. В некоторых вариантах осуществления изобретения согласно данному аспекту изобретения молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, причем HCVR и LCVR получены из одного из антител к PRLR, перечисленных в табл. 1.

В настоящем изобретении предложены также рекомбинантные векторы экспрессии, способные экспрессировать полипептид, содержащий вариабельную область тяжелой или легкой цепи антитела к PRLR. Например, настоящее изобретение включает рекомбинантные векторы экспрессии, содержащие любую из вышеупомянутых молекул нуклеиновых кислот, т.е. молекул нуклеиновых кислот, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR, и/или CDR, показанных в табл. 1. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или частей этих антител путем культивирования клеток-хозяев в условиях, позволяющих получать антитела или части антител, и выделение полученных с помощью этих способов антител и частей антител.

Настоящее изобретение включает антитела к PRLR с модифицированным профилем гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления изобретения может быть использована модификация, направленная на удаление нежелательных участков, или антитела без фукозной группы на олигосахаридной цепи для усиления функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shiedel et al. (2002), JBC, 277:26733). В других вариантах может применяться модификация, представляющая собой галактозилирование, для модификации комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

В другом аспекте настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая рекомбинантное человеческое антитело человека или его фрагмент, специфично связывающий рецептор пролактина, и фармацевтически приемлемый носитель. В близком аспекте изобретения предложена композиция, представляющая собой комбинацию антитела к PRLR и второго терапевтического агента. В одном варианте осуществления изобретения второй терапевтический агент является любым агентом, обеспечивающим преимущество в комбинации с антителом к PRLR. В настоящем изобретении предложены также конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC), содержащие антитело к PRLR, конъюгированное с цитотоксическим агентом. Примеры комбинированной терапии, комбинированных лекарственных форм и ADC, содержащих антитела к PRLR по настоящему изобретению, описаны в других документах.

В другом аспекте настоящего изобретения предложены способы лечения, направленные на уничтожение опухолевых клеток или на уменьшение роста опухолевых клеток с помощью использования антитела к PRLR или антигенсвязывающей части антитела согласно настоящему изобретению. Терапевтические способы согласно настоящему аспекту изобретения включают введение терапевтически эффективного количества лекарственного препарата, содержащего антитело или антигенсвязывающую часть антитела согласно изобретению, нуждающемуся в таком лечении пациенту. Нарушением, по поводу которого проводится лечение, является любое заболевание или состояние, течение которого улучшается, облегчается, подавляется или предотвращается в результате направленного воздействия на PRLR и/или подавления опосредованного пролактином сигнального пути с участием PRLR.

Другие варианты осуществления изобретения становятся очевидными при рассмотрении подробного описания изобретения.

Подробное описание

Перед тем как перейти к описанию настоящего изобретения, важное понимать, что настоящее изобретение не ограничивается описанными частными способами и экспериментальными условиями, поскольку такие способы и условия могут варьировать. Также следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена лишь описания частных вариантов осуществления изобретения, и не является ограничивающей, поскольку объем настоящего изобретения ограничивается только прилагаемой формулой изобретения.

Все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют значение, обыкновенно принятое специалистами в области, к которой относится настоящее изобретение, если не определено иным образом. В настоящем документе термин "приблизительно" используется в отношении определенного указанного численного значения и означает, что значение может отличаться от указанного количества не более чем на 1%. Например, в настоящем документе "приблизительно 100" включает и 99, и 101, и все промежуточные значения (например, 99.1, 99.2, 99.3, 99.4 и т.д.).

Хотя при практическом использовании или при испытаниях настоящего изобретения могут использоваться любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в настоящем доку-

менте, далее описаны предпочтительные способы и материалы.

Определения.

Выражение "рецептор пролактина", "PRLR" и аналогичные термины, используемые в настоящем документе, относятся к человеческому рецептору пролактина, содержащему аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 404. Выражение "PRLR" включает мономерные и мультимерные молекулы рецептора пролактина. В настоящем документе выражение "мономерный человеческий рецептор пролактина" означает белок PRLR или его часть, который не содержит и не обладает мультимеризующими и существует в нормальных условиях как отдельная молекула PRLR без прямого физического соединения с другой молекулой PRLR. Примером мономерной молекулы рецептора пролактина является молекула, упоминаемая в настоящем документе как "hPRLR.mmh", содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 401 (см., например, пример 3). В настоящем документе, выражение "димерный человеческий PRLR" означает конструкцию, содержащую две молекулы PRLR, соединенные линкером, ковалентной связью, нековалентной связью или через мультимеризующий домен, например домен антитела Fc. Примером димерной молекулы PRLR является молекула, упоминаемая в настоящем документе как "hPRLR.mFc", содержащая аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 402 (например, пример 3).

Все упоминания белков, полипептидов и фрагментов белков относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или части белка, кроме случаев, когда в явной форме указано их нечеловеческое происхождение. Таким образом, выражение "PRLR" означает человеческий PRLR, если не указано, что этот рецептор имеет нечеловеческое происхождение, например "мышиный PRLR", "обезьяний PRLR" и т.д.

В настоящем документе, выражение "экспрессируемый на клеточной поверхности PRLR" означает один или несколько белков рецептора пролактина или его внеклеточный домен, экспрессируемый на поверхности клетки in vitro или in vivo, так что, по крайней мере, часть белка PRLR находится на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для антигенсвязывающей части антитела. "Экспрессируемый на клеточной поверхности PRLR" может включать или состоять из белка рецептора пролактина, экспрессируемого на поверхности клетки, которая в норме экспрессирует белок PRLR. Альтернативно "экспрессируемый на клеточной поверхности PRLR" может содержать или состоять из белка PRLR, экспрессируемого на поверхности клетки, которая в норме не экспрессирует человеческий PRLR на своей поверхности, но экспрессирует его в результате искусственного применения методов инженерии.

В настоящем документе выражение "антитело к PRLR" включает моновалентные антитела, обладающие моноспецифичностью, а также биспецифичные антитела, содержащие первый домен, связывающий PRLR, и второй домен, связывающий второй (целевой) антиген, причем домен, связывающий PRLR, содержит любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, перечисленных в табл. 1 в настоящем документе. Выражение "антитело к PRLR" включает также конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC), содержащие антитело к PRLR или антигенсвязывающий фрагмент антитела, конъюгированного с лекарственным средством или токсином (т.е. цитотоксическим агентом). Выражение "антитело к PRLR" также включает конъюгаты антитела с радионуклидом (ARC), содержащие антитело к PRLR или антигенсвязывающий фрагмент такого антитела, конъюгированного с радионуклидом.

Термин "антитело" в настоящем документе означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, включающий по крайней мере один участок, определяющий комплементарность (CDR), в частности, связывающийся или взаимодействующий с определенным антигеном (например, PRLR). Термин "антитело" включает молекулы иммуноглобулина, включающие четыре полипептидные цепи, две тяжелых (H) цепи и две легких (L) цепи, соединенные дисульфидными связями, а также образованные ими мультимеры (например, IgM). Каждая тяжелая цепь включает вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена CH_1, CH_2 и CH_3. Каждая легкая цепь включает вариабельную область легкой цепи (сокращенно LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_L1). Области V_H и V_L могут быть далее подразделены на гипервариабельные участки, называемые участками, определяющими комплементарность (CDR), рассеянные между участками с более консервативными последовательностями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая область V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных в направлении с N-концевой области до C-концевой области в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления изобретения области FR антитела к PRLR (или антигенсвязывающего фрагмента антитела) идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могу быть модифицированными в естественных условиях или искусственно. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить посредством прямого сравнительного анализа двух или нескольких участков CDR.

В настоящем документе термин "антитело" включает также антигенсвязывающие фрагменты полных молекул антитела. Термины "антигенсвязывающая часть антитела", "антигенсвязывающий фрагмент антитела" и т.п. в настоящем документе включают любой природный, полученный в результате ферментативной реакции, синтетический или генно-инженерный полипептид или гликопротеид, который специфично связывается с антигеном с формированием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты анти-

тела могут быть получены, например, из полных молекул антитела с помощью любых подходящих стандартных способов, таких как протеолитическое расщепление, или генно-инженерных методов, включающих манипуляции и экспрессию ДНК вариабельных и в некоторых случаях константных областей антитела. Такая ДНК известна и/или может быть легко получена, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговую библиотеку антител) либо синтезирована. ДНК может быть секвенирована и подвергнута химическим манипуляциям либо манипуляциям с использованием молекулярно-биологических методов, например, для реаранжировки одного или нескольких вариабельных и/или константных доменов с формированием подходящей конфигурации, для введения кодонов, создания цистеиновых остатков, модификации, добавления или исключения аминокислот и т.д.

Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают

(i) фрагменты Fab;

(ii) фрагменты $F(ab')_2$;

(iii) фрагменты Fd;

(iv) фрагменты Fv;

(v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv);

(vi) фрагменты dAb; и

(vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, имитирующих гипервариабельную область антитела (например, выделенный участок, определяющий комплементарность (CDR), например пептид CDR3) или пептид с ограниченной конформационной свободой FR3-CDR3-FR4.

Другие молекулы, полученные методами молекулярной инженерии, такие как домен-специфичные антитела, однодоменные антитела, антитела, полученные в результате удаления домена, химерные антитела, антитела с привитым CDR, диатела, триатела, тетратела, минитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т.д.), иммунофармацевтические средства на основе модульного белка малого размера (SMIP) и вариабельные области IgNAR акулы также включены в выражение "антигенсвязывающий фрагмент антитела" в настоящем документе.

Антигенсвязывающий фрагмент, как правило, содержит по крайней мере один вариабельный домен. Вариабельный домен может иметь любой размер или аминокислотный состав и обычно содержит по крайней мере один CDR, смежный по или находящийся в пределах последовательности одного или нескольких каркасных участков. В антигенсвязывающих фрагментах, имеющих домен V_H, ассоциированный с доменом V_L, домены V_H и V_L могут быть расположены относительно друг друга в любой подходящей конфигурации. Например, вариабельная область может быть димерной и содержать димеры V_H-V_H, V_H-V_L или V_L-V_L. Альтернативно антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L.

В определенных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по крайней мере один вариабельный домен, соединенный ковалентной связью по крайней мере с одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации вариабельных и константных доменов, которые могут быть обнаружены в антигенсвязывающем фрагменте антитела согласно настоящему изобретению, включают

(i) V_H-C_H1;

(ii) V_H-C_H2;

(iii) V_H-C_H3;

(iv) V_H-C_H1-C_H2;

(v) V_H-C_H1-C_H2-C_H3;

(vi) V_H-C_H2-C_H3;

(vii) V_H-C_L;

(viii) V_L-C_H1;

(ix) V_L-C_H2;

(x) V_L-CH_3;

(xi) V_L-C_H1-C_H2;

(xii) V_L-C_H1-C_H2-C_H3;

(xiii) V_L-C_H2-C_H3; и

(xiv) V_L-C_L.

В любой конфигурации вариабельных и константных доменов, включая любую из упомянутых выше иллюстративных конфигураций, вариабельные и константные домены могут быть связаны друг с другом либо непосредственно, либо через полный или частичный шарнирный или линкерный участок. Шарнирный участок может состоять не менее чем из 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, что приводит к гибкой или полугибкой связи между смежными вариабельными и/или константными доменами в одной полипептидной молекуле. Кроме того, антигенсвязывающий фрагмент антитела по данному изобретению может содержать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) с любой из вышеперечисленных конфигураций вариабельного и константного доменов в нековалентной ассоциации друг с другом и/или с одним или несколькими мономерными доменами V_H или V_L (напри-

мер, посредством дисульфидной связи).

Антигенсвязывающие фрагменты, как и полноразмерные антитела, могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичный антигенсвязывающий фрагмент антитела, как правило, содержит не менее двух различных вариабельных доменов, при этом каждый вариабельный домен способен специфично связываться с отдельным антигеном или с другим эпитопом на том же антигене. Любой мультиспецифичный формат антитела, включая иллюстративные биспецифичные форматы антитела согласно настоящему изобретению, может быть адаптирован к использованию в контексте антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению при использовании стандартных приемов, доступных специалисту в данной области.

Антитела по настоящему изобретению могут функционировать посредством механизма комплементзависимой цитотоксичности (CDC) или антителозависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (ADCC). Термин "комплементзависимая цитотоксичность" (CDC) относится к лизису экспрессирующих антиген клеток антителом, описанным в изобретении, в присутствии комплемента. Термин "антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность" (ADCC) относится к опосредованной клеткой реакции, в которой неспецифичные цитотоксические клетки, экспрессирующие рецепторы Fc (FcRs) (например, клетки естественного киллера (NK-клетки), нейтрофилы и макрофаги), распознают связанное антитело на целевой клетке, что приводит к лизису целевой клетки. CDC и ADCC могут быть измерены с помощью методов, которые известны и доступны специалистам в данной области отрасли (см., например, патент США № 5500362 и 5821337; и Clynes et al. (1998), Proc. Natl. Acad. Sci., (США), 95:652-656). Константная область антитела важна для способности антитела фиксировать комплемент и участвовать в клеточноопосредованной цитотоксичности. Таким образом, изотип антитела может быть выбран исходя из того, желательно ли, чтобы антитело опосредовало цитотоксичность.

В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению являются человеческими антителами. Термин "человеческое антитело" в настоящем документе включает антитела, имеющие вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела, описанные в изобретении, могут включать аминокислотные остатки аминокислот, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, в результате мутаций, возникших в результате случайного или сайт-специфичного мутагенеза in vitro или соматической мутации in vivo), например, на участке CDR и в частности CDR3. Однако термин "человеческое антитело" в настоящем документе не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, например мыши, были привиты на последовательности каркасных участков человека.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела согласно настоящему изобретению могут быть рекомбинантными человеческими антителами. Термин "рекомбинантное человеческое антитело" в настоящем документе включает все человеческие антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные рекомбинантными методами, например антитела, экспрессированные с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, которым была трансфицирована клетка-хозяин (как описано далее), антитела, выделенные из библиотеки рекомбинантных комбинаторных человеческих антител (как описано далее), антитела, выделенные из животного (например, мыши), которое является трансгенным для генов иммуноглобулина человека (см., например, Taylor et al. (1992), Nucl. Acids. Res., 20:6287-6295), или антитела, полученные, экспрессированные, созданные или выделенные любым другим способом, включающим соединение последовательностей генов иммуноглобулина человека с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют вариабельные и константные области, полученные из последовательностей гена иммуноглобулина зародышевой линии человека. В определенных вариантах осуществления изобретения, однако, такие рекомбинантные человеческие антитела подвергают in vitro мутагенезу (или когда используется животное, трансгенное для последовательностей Ig человека, in vivo соматическому мутагенезу), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, после получения и будучи родственными зародышевой линии человека в последовательностях V_H и V_L, могут существовать в не являющимся природным репертуаре зародышевой линии антитела человека in vivo.

Человеческие антитела могут существовать в двух формах, ассоциированных с неоднородностью шарнирного участка. В одной форме молекула иммуноглобулина содержит стабильную четырехцепочечную конструкцию массой приблизительно 150-160 килодальтон, в которой димеры удерживаются рядом друг с другом межцепочечной дисульфидной связью между тяжелыми цепями. Во второй форме димеры не связаны межцепочечными дисульфидными связями и образуется молекула массой приблизительно 75-80 килодальтон, состоящая из ковалентно связанных легкой и тяжелой цепи (полу). Эти формы было чрезвычайно трудно разделить даже после аффинной очистки.

Частота присутствия второй формы в различных интактных изотипах IgG происходит, в частности, из-за структурных различий, ассоциированных с изотипом шарнирного участка антитела. Замена одной аминокислоты на шарнирном участке IgG4 человека может значительно уменьшить присутствие второй формы (Angal et al. (1993), Molecular Immunology, 30:105) до уровня, обычно наблюдаемого при исполь-

зовании шарнира человеческого IgG1. Настоящее изобретение включает антитела, имеющие одну или несколько мутаций на шарнирном участке, в области C_H2 или C_H3, которые могут быть желательными, например, при получении антитела для повышения выхода желаемой формы антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть выделенными антителами. В настоящем документе "выделенное антитело" означает антитело, которое было идентифицировано и отделено или извлечено по крайней мере из одного компонента природной среды. Например, в целях настоящего изобретения "выделенным антителом" является антитело, которое было отделено или удалено по крайней мере из одного компонента организма, ткани или клетки, в которой антитело в естественных условиях существует или образуется. Термин "выделенное антитело" также включает антитело in situ в рекомбинантной клетке. Выделенные антитела являются антителами, подвергнутыми по крайней мере одному этапу очистки или выделения. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения выделенное антитело может по существу не содержать другой клеточный материал и/или химические соединения.

Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению могут содержать одну или несколько аминокислотных замен, инсерций и/или делеций в каркасном участке и/или участках CDR вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела. Такие мутации могут быть легко установлены путем сравнения аминокислотных последовательностей, описанных в настоящем документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, в открытых базах данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, полученные из любой аминокислотной последовательности, раскрытой в настоящем документе, причем одна или несколько аминокислот в одном или нескольких каркасных участках и/или участках CDR в результате мутации изменены на соответствующий остаток последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело, или на соответствующий остаток другой последовательности зародышевой линии человека, или на замену консервативной аминокислоты соответствующего(их) остатка(ов) зародышевой линии (такие изменения последовательности в настоящем документе объединены под названием "мутации зародышевой линии"). Специалист в данной области техники может легко получить антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител начиная с последовательностей вариабельных областей тяжелой и легкой цепей, раскрытых в настоящем документе, которые содержат одну или несколько индивидуальных мутаций зародышевой линии или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления изобретения все остатки, которые входят в состав каркасного участка или участка CDR в пределах V_H и/или V_L, мутировали к первоначальному виду, в котором они присутствовали в оригинальной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления изобретения только определенные остатки мутировали к первоначальному виду в оригинальную последовательность зародышевой линии, например только мутировавшие остатки обнаружены в первых 8 аминокислотах участка FR1 или в последних 8 аминокислотах участка FR4 или только мутировавшие остатки обнаружены на участках CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления изобретения один или несколько каркасных участков и/или остатков CDR мутировали с образованием соответствующего(их) остатка(ов) другой последовательности зародышевой линии (т.е. последовательности зародышевой линии, отличающейся от последовательности зародышевой линии, из которой антитело было первоначально получено). Кроме того, антитела согласно настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию двух или больше мутаций зародышевой линии в каркасном участке и/или участках CDR, например, в котором отдельные остатки мутировали с образованием соответствующих остатков определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, отличающиеся от оригинальной последовательности зародышевой линии, сохранялись или мутировали с образованием соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. Полученные антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие одну или несколько мутаций зародышевой линии, могут быть легко испытаны на наличие одного или нескольких желаемых свойств, например улучшенной специфичности связывания, повышенной аффинности связывания, улучшенных или усиленных антагонистических или агонистических биологических свойств (в зависимости от обстоятельств), сниженной иммуногенности. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты антител, полученные этим общим способом, включены в настоящее изобретение.

Настоящее изобретение также включает антитела к PRLR, содержащие варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в настоящем документе и имеющих одну или несколько консервативных замен. Например, настоящее изобретение включает антитела к PRLR, имеющие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR, например, с 10 или менее, 8 или менее, 6 или менее, 4 или менее и т.д. консервативными заменами аминокислот относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, показанных в табл. 1.

Термин "эпитоп" относится к антигенной детерминанте, которая взаимодействует со специфичным антигенсвязывающим участком в вариабельной области молекулы антитела, известной как паратоп. Единственный антиген может иметь несколько эпитопов. Таким образом, различные антитела могут связываться с различными областями антигена и оказывать различные биологические эффекты. Эпитопы могут быть конформационными или линейными. Конформационный эпитоп образуется при пространст-

венном сопоставлении аминокислот из различных сегментов линейной полипептидной цепи. При определенных обстоятельствах эпитоп может включать функциональные группы сахаридов, фосфорильных или сульфонильных групп на антигене.

Термин "существенная идентичность" или "по существу идентичный", относящийся к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту, указывает, что при оптимальном выравнивании с соответствующими инсерциями или делециями нуклеотидов с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной цепью) существует идентичность нуклеотидной последовательности не менее приблизительно 95% и более предпочтительно не менее приблизительно 96, 97, 98 или 99% нуклеотидных оснований, измеренная при использовании любого известного алгоритма проверки идентичности последовательностей, например FASTA, BLAST или Gap, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, обладающая существенной идентичностью по отношению к референтной молекуле нуклеиновой кислоты в определенных случаях может кодировать полипептид, имеющий ту же или существенно сходную аминокислотную последовательность как и полипептид, закодированный референтной молекулой нуклеиновой кислоты.

В отношении полипептидов термин "существенное сходство" или "существенно сходный" означает, что для двух пептидных последовательностей при оптимальном выравнивании, например, с помощью программ GAP или BESTFIT при использовании штрафа за открытие гэпа по умолчанию идентичность последовательностей составляет не менее 95%, более предпочтительно 98 или 99%. Предпочтительно когда положения неидентичных остатков отличаются консервативными заменами аминокислоты. "Консервативная замена аминокислоты" означает замену, в которой аминокислотный остаток замещен другим аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь (R-группа) с сходными химическими свойствами (например, применительно к заряду или гидрофобности). В целом консервативная замена аминокислоты существенно не изменяет функциональные свойства белка. В случаях где две или больше последовательности аминокислот отличаются друг от друга консервативными заменами, процент идентичности последовательности или степень сходства могут быть увеличены для исправления консервативной природы замены. Средства для внесения такой корректировки хорошо известны специалистам в данной области техники. См, например, Pearson (1994), Methods Mol. Biol., 24:307-331.

Примеры групп аминокислот, имеющих боковые цепи с сходными химическими свойствами, включают

(1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин;

(2) алифатически-гидроксильные боковые цепи: серин и треонин;

(3) амидсодержащие боковые цепи: аспарагин и глютамин;

(4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан;

(5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин;

(6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат; и

(7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин.

Предпочтительными консервативно замещающими группами аминокислот являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и глютамин-аспарагин. Альтернативно консервативной заменой является любое изменение с положительным значением в матрице логарифмического правдоподобия PAM250, описанной Gonnet et al. (1992), Science, 256:1443-1445. "Умеренно консервативная" замена - это любое изменение, имеющее неотрицательное значение в матрице логарифмического правдоподобия PAM250.

Для измерения сходства последовательностей полипептидов, также называемого идентичностью последовательностей, как правило, используют программное обеспечение для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности, используя меры сходства, присвоенные различным заменам, делециям и другим модификациям, включая консервативные замены аминокислот. Например, программное обеспечение GCG включает программы, такие как Gap и Bestfit, которые могут использоваться с параметрами по умолчанию для определения степени гомологии последовательностей или идентичности последовательностей близкородственных полипептидов, например гомологичных полипептидов различных видов организмов или белком дикого типа и его мутантным вариантом. См, например, программное обеспечение GCG, версию 6.1. Для сравнения полипептидных последовательностей может применяться также программное обеспечение FASTA с использованием рекомендуемых параметров или параметров по умолчанию, программы GCG, версия 6.1. Программа FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивание и определения процента идентичности последовательностей в областях с наилучшим совпадением запрашиваемой и исследуемой последовательностей (Pearson (2000), см. выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении последовательности согласно изобретению с базой данных, содержащей большое количество последовательностей различных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с помощью параметров по умолчанию. См., например, Altschul et al. (1990), J. Mol. Biol., 215:403-410; и Altschul et al. (1997), Nucleic Acids Res., 25:3389-402.

pH-зависимое связывание.

Настоящее изобретение включает антитела к PRLR с pH-зависимыми характеристиками связывания. Например, антитело к PRLR согласно настоящему изобретению может демонстрировать сниженное

связывание с рецептором пролактина при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Альтернативно антитела к PRLR согласно настоящему изобретению проявляют повышенное связывание с рецептором пролактина при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Выражение "кислый pH" включает значения pH менее приблизительно 6,2, например приблизительно 6.0, 5.95, 5.9, 5.85, 5.8, 5.75, 5.7, 5.65, 5.6, 5.55, 5.5, 5.45, 5.4, 5.35, 5.3, 5.25, 5.2, 5.15, 5.1, 5.05, 5.0 или меньше. В настоящем документе выражение "нейтральный pH" означает pH приблизительно от 7,0 приблизительно до 7,4. Выражение "нейтральный pH" включает значения pH приблизительно 7.0, 7.05, 7.1, 7.15, 7.2, 7.25, 7.3, 7.35 и 7.4.

В определенных случаях "сниженное связывание с PRLR при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" выражают как отношения значения K_D связывания антитела с PRLR при кислом pH к значению K_D связывания антитела с PRLR при нейтральном pH (или наоборот). Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела могут рассматриваться, как проявляющие "сниженное связывание с рецептором пролактина при кислом pH по сравнению с нейтральным pH" в целях настоящего изобретения, если для антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела отношение K_D в кислой/нейтральной среде составляет приблизительно 3,0 или выше. В некоторых иллюстративных вариантах осуществления изобретения отношение K_D в кислой/нейтральной среде в кислой/нейтральной среде для антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению может быть приблизительно 3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0, 9.5, 10.0, 10.5, 11.0, 11.5, 12.0, 12.5, 13.0, 13.5, 14.0, 14.5, 15.0, 20.0. 25.0, 30.0, 40.0, 50.0, 60.0, 70.0, 100.0 или выше.

Антитела с pH-зависимыми характеристиками связывания могут быть получены, например, путем скрининга популяции антител для определения сниженного (или повышенного) связывания с определенным антигеном при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Кроме того, модификации антигенсвязывающего домена на уровне аминокислоты может приводить к созданию антитела с pH-зависимыми свойствами. Например, при замене одной или нескольких аминокислот в антигенсвязывающем домене (например, в CDR) на остаток гистидина может быть получено антитело со сниженным связыванием антигена при кислом pH по сравнению с нейтральным pH.

Варианты антител к PRLR, содержащие Fc.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения предложены антитела к PRLR, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько мутаций, усиливающих или ослабляющих связывание антитела с рецептором FcRn, например, при кислом pH по сравнению с нейтральным pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к PRLR, содержащие мутацию на участке C_H2 или C_H3 домена Fc, причем мутация(ии) увеличивает(ют) аффинность домена Fc к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где pH находится в диапазоне от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Такие мутации могут привести к увеличению периода полувыведения антитела из сыворотки в случае введения антитела животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например,

модификацию в положении 250 (например, E или Q), 250 и 428 (например, L или F), 252 (например, LA7F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T); или

модификацию в положении 428, и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, H/F или Y); или

модификацию в положении 250 и/или 428 или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434.

В одном варианте осуществления изобретения модификации включают

модификации 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S);

модификации 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F);

модификации 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y);

модификации в положениях 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E);

модификации 250Q и 428L (например, T250Q и M428L); и

модификации в положениях 307 и/или 308 (например, 308F или 308P).

Например, настоящее изобретение включает антитела к PRLR, содержащие домен Fc, содержащий одну или несколько пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из

250Q и 248L (например, T250Q и M248L);

252Y, 254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E);

428L и 434S (например, M428L и N434S); и

433K и 434F (например, H433K и N434F).

Все возможные комбинации вышеперечисленных мутаций домена Fc и других мутаций в вариабельных доменах антитела, предложенных в настоящем изобретения, входят в объем настоящего изобретения.

Биологические характеристики антител.

Настоящее изобретение включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые с высокой аффинностью связывают человеческий мономерный PRLR. Например, настоящее изобретение включает антитела к PRLR, связывающие человеческий мономерный PRLR (например, hPRLR.mmh) с K_D менее приблизительно 4,0 нМ согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в при-

мере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения предложены антитела к PRLR, которые связывают человеческий мономерный PRLR при 37°C с K_D менее приблизительно 4 нМ, менее приблизительно 3 нМ, менее приблизительно 2 нМ, менее приблизительно 1 нМ, менее приблизительно 900 пМ, менее приблизительно 800 пМ, менее приблизительно 700 пМ, менее приблизительно 600 пМ, менее приблизительно 500 пМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 300 пМ, согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, связывающие человеческий мономерный рецептор пролактина (например, hPRLR.mmh) с диссоциативным периодом полувыведения (t1/2) более приблизительно 5 мин согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при в 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения предложены антитела к PRLR, которые связывают человеческий мономерный рецептор пролактина при 37°C с t1/2 более приблизительно 5 мин, более приблизительно 6 мин, более приблизительно 8 мин, более приблизительно 10 мин, более приблизительно 12 мин, более приблизительно 14 мин, более приблизительно 16 мин, более приблизительно 18 мин, более приблизительно 20 мин, более приблизительно 30 мин, более приблизительно 40 мин или дольше, согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые с высокой аффинностью связывают человеческий димерный рецептор пролактина (например, hPRLR.mFc).

Например, настоящее изобретение включает антитела к PRLR, связывающие человеческий димерный рецептор пролактина с K_D менее приблизительно 250 пМ согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения предложены антитела к PRLR, которые связывают человеческий димерный рецептор пролактина при 37°C с K_D менее приблизительно 250 пМ, менее приблизительно 200 пМ, менее приблизительно 180 пМ, менее приблизительно 160 пМ, менее приблизительно 140 пМ, менее приблизительно 120 пМ, менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 80 пМ, менее приблизительно 70 пМ или менее приблизительно 60 пМ, согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа.

Настоящее изобретение включает также антитела и антигенсвязывающие фрагменты, связывающие человеческий димерный рецептор пролактина (например, hPRLR.mFc) с диссоциативным периодом полувыведения (t1/2) более приблизительно 55 мин согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения предложены антитела к PRLR, которые связывают человеческий димерный рецептор пролактина при 37°C с t1/2 более приблизительно 55 мин, более приблизительно 60 мин, более приблизительно 65 мин, более приблизительно 70 мин, более приблизительно 75 мин, более приблизительно 80 мин, более приблизительно 85 мин, более приблизительно 90 мин, более приблизительно 95 мин, более приблизительно 100 мин, более приблизительно 120 мин, более приблизительно 140 мин, более приблизительно 160 мин или дольше согласно результатам измерения методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 или 37°C, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 3 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, который связывают рецептор пролактина и блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих PRLR человека. Например, настоящее изобретение включает антитела к PRLR, блокирующие сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих PRLR человека, при IC_{50} менее чем приблизительно 1,3 нМ, согласно измерениям с использованием количественного анализа блокирования сигнального пути с участием пролактина, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 5 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа Согласно определенным вариантам осуществления изобретения предложены антитела к PRLR, которые блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих человеческий PRLR при IC_{50} менее приблизительно 1,3 нМ, менее приблизительно 1,2 нМ, менее приблизительно 1,0 нМ, менее приблизительно 900 пМ, менее приблизительно 800 пМ, менее при-

близительно 600 пМ, менее приблизительно 400 пМ, менее приблизительно 200 пМ, менее приблизительно 100 пМ, менее приблизительно 80 пМ, менее приблизительно 60 пМ, менее приблизительно 40 пМ, менее приблизительно 20 пМ, согласно результатам количественного анализа блокирования сигнального пути с участием пролактина, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 5 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа.

Настоящее изобретение также включает антитела и антигенсвязывающие фрагменты, связывающие PRLR, но не блокирующие сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих человеческий рецептор пролактина. В настоящем документе антитело или часть антитела, связанная антигеном, "не блокирует" сигнальный путь с участием пролактина, если при анализе блокирования сигнального пути с участием пролактина, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 5 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа, антитело не проявляет или проявляет лишь несущественную блокирующую активность. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела "не блокируют" сигнальный путь с участием пролактина, если IC_{50} антитела превышает приблизительно 10 нМ или превышает приблизительно 100 нМ согласно результатам количественного анализа блокирования сигнального пути с участием пролактина, например, при использовании формата количественного анализа, описанного в примере 5 в настоящем документе, или при использовании существенно сходного метода количественного анализа.

Антитела, согласно настоящему изобретению могут обладать одним или несколькими из вышеупомянутых биологических характеристик или комбинацией этих характеристик. Приведенный выше перечень биологических характеристик антител, описанных в изобретении, не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики свойств антител согласно настоящему изобретению будут очевидны для специалиста в данной области техника при рассмотрении настоящего изобретения, включая приведенные в документе иллюстративные примеры.

Конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC).

В настоящем изобретении предложены конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC), содержащие антитело к PRLR или антигенсвязывающий фрагмент антитела, конъюгированные с терапевтической группой, например цитотоксическим агентом, химиотерапевтическим препаратом или радиоизотопом.

Цитотоксические агенты включают любой агент, который вреден для роста, жизнеспособности или размножения клеток. Примеры подходящих цитотоксических агентов и химиотерапевтических агентов, которые могут образовывать конъюгаты с антителами к PRLR согласно данному аспекту изобретения, включают, например, 1-(2-хлороэтил)-1,2-диметансульфонил гидразид, 1,8-дигидроксибицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диен-13-он, 1-дигидротестостерон, 5-фтороурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотецин, актиномицин D, аманитин, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (AMC), ауристатин, блеомицин, бусульфан, масляную кислоту, калихеамицин, камптотецин, карминомицин, кармустин, цемадотин, цисплатин, колхицин, комбретастатин, циклофосфамид, цитарабин, цитохалазин B, дактиномицин, даунорубицин, декарбазин, диацентоксипентилдоксорубицин, дибромоманнитол, дигидрокси антрацин дион, дизоразол, доластатин (например, доластатин 10), доксорубицин, дуокармицин, эхиномицин, элеутеробин, эметин, эпотилон, эсперамицин, эстрамустин, бромид этидия, этопозид, фтороурацил, гельданмицин, грамицидин D, глюкокортикоид, иринотекан, ингибиторы белка кинезина (KSP), лептомицины, лейрозин, лидокаин, ломустин (CCNU), маитанзиноиды, меклоретамин, мелфалан, меркатопурин, метоптерин, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксин, прокаин, пропранолол, птередин, пуромицин, пирролобензодиазепин (PBD), ризокцин, стрептозотоцин, таллисомицин, таксол, тенопозид, тетракаин, тиотепа хлорамбуцил, томаимицин, топотекан, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорельбин и производные любого из вышеперечисленных веществ. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения цитотоксическим агентом, образующим конъюгат с антителом к PRLR, является майтанзиноид, например DM1 или DM4, производное томаимицина или производное доластатина. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения цитотоксическим агентом, образующим конъюгат с антителом к PRLR, является ауристатин, например MMAE, MMAF или их производные. В объеме настоящего изобретения предусмотрены также другие цитотоксические агенты, известные специалистам в данной области, включая, например, имеющие белковую природу токсины, такие как рицин, токсин C. difficile, экзотоксин Pseudomonas, рицин, дифтерийный токсин, ботулотоксин, бриодин, сапорин, токсины лаконоса (т.е. фитолаккатоксин и фитоллакагенин) и другие, описанные в публикации Sapra et al., Pharmacol & Therapeutics, 2013, 138:452-469.

Настоящее изобретение также включает конъюгаты антитела с радионуклидом (ARC), содержащие антитела к PRLR, конъюгированные с одним или несколькими радионуклидами. Примерами радионуклидов, которые могут использоваться в контексте данного аспекта изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленным, например, ^{225}Ac, ^{212}Bi, ^{213}Bi, ^{131}I, ^{186}Re, ^{227}Th, ^{222}Rn, ^{223}Ra, ^{224}Ra и ^{90}Y.

В определенных вариантах осуществления данного изобретения предложены ADC, которые содер-

жат антитело к PRLR, конъюгированное с цитотоксическим агентом (например, любой из перечисленных выше цитотоксических агентов) через молекулу линкера. Для создания или конструирования ADC согласно настоящему изобретению может быть использована любая линкерная молекула или линкерная технология, известная специалистам в данной области техники. В определенных вариантах осуществления изобретения линкер является расщепляемым линкером. Согласно другим вариантам осуществления изобретения линкер является нерасщепляемым линкером. Примеры линкеров, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, включают линкеры, содержащие или состоящие из, например, MC (6-малеимидокапроил), MP (малемеидопропаноил), вал-цит (цитруллин-валин), вал-ала (аланин-валин), дипептидный участок в линкере, расщепляемом протеазой, ала-фен (аланин-фенилаланин), дипептидный участок в линкере, расщепляемом протеазой, PAB (п-аминобензилоксикарбонил), SPP (N-сукцинимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноат), SMCC (N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SIAB (N-сукцинимидил (4-йод-ацетил)аминобензоат) и их варианты и комбинации. Дополнительные примеры линкеров, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, описаны, например, в патенте США № 7754681 и в публикации Ducry, BioconjugateChem., 2010, 21:5-13 и ссылках, цитируемых в этих источниках.

Настоящее изобретение включает ADC, в которых линкер соединяет антитело к PRLR или связывающую антиген молекулу с лекарственным средством или цитотоксином путем присоединения к определенной аминокислоте в антителе или связывающей антиген молекуле. Примеры присоединения аминокислот, которые могут использоваться в контексте данного аспекта изобретения, включают, например, лизин (см., например, патент США № 5208020; США № 2010/0129314; Hollander et al., Bioconjugate Chem., 2008, 19:358-361; WO 2005/089808; США № 5714586; США № 2013/0101546; и США № 2012/0585592), цистеин (см., например, США № 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; США № 2013/0101546; и США № 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039; и Hoferef et al., Proc. Natl. Acad. Sci, США, 2008, 705:12451-12456), формилглицин (см., например, Carrico et al., Nat. Chem. Biol., 2007, 3:321-322; Agarwal et al., Proc. Natl. Acad. Sci, США, 2013, 110:46-51; и Rabuka et al., Nat. Protocols, 2012, 10:1052-1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры могут быть также конъюгированы с антигенсвязывающим белком путем присоединения к углеводам (см., например, США № 2008/0305497, WO 2014/065661; и публикацию Ryan et al., Food & Agriculture Immunol, 2001, 73:127-130) и дисульфидным линкерам (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611; и публикацию Shaunak et al., Nat. Chem. Biol., 2006, 2:312-313).

Согласно определенным вариантам осуществления изобретения в настоящем изобретении предложены ADC, в котором антитело к PRLR согласно настоящему изобретению конъюгировано с композицией линкер-лекарственное средство, как описано в международной заявке на патент № PCT/US14/29757, поданной 14 марта 2014 г. (например, соединение "7", также называемое в настоящем документе "M0026").

В контексте настоящего изобретения для создания ADC, содержащего антитело к PRLR и описанного в настоящем документе, может быть использован любой известный в данной области техники способ образования конъюгата между химической группой и пептидом, полипептидом или другой макромолекулой. Иллюстративным способом образования конъюгата антитела с лекарственным средством является способ с использованием линкера, как описано в примере 6 в настоящем документе. Варианты этого иллюстративного способа очевидны специалистам в данной области техники и включены в объем настоящего изобретения.

Направленное воздействие ADC на клетки с низким уровнем экспрессии рецептора пролактина.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что ADC, содержащие антитело к PRLR, конъюгированное с цитотоксическим агентом, способны направленно воздействовать и уничтожать клетки с относительно низким уровнем экспрессии PRLR на клеточной поверхности. Например, в настоящем документе в примере 7 показано, что ADC, содержащий антитело к PRLR H1H6953N, конъюгированное с DM1, подавлял рост клеток T47D (экспрессирующих рецептор пролактина в количестве, лишь 12-кратно превышающем фоновый уровень) при IC_{50} 1,3 нМ и уничтожал 78% клеток. В отличие от этого ADC против других ассоциированных с опухолями антигенов, таких как ErbB2, как правило, требуют намного более высоких уровней экспрессии антигена-мишени на клетках для сопоставимой активности, приводящей к гибели клеток. Например, при применении конъюгата, содержащего антитело к ErbB2 и DM1, гибель клеток при IC_{50} в субнаномолярном диапазоне была достигнута только в случае клеток с уровнем экспрессии ErbB2, от 200-кратно до приблизительно 400-кратно превышавшим фоновый уровень (см., например, табл. 14-17 в настоящем документе). Способность уничтожать опухолевые клетки с относительно низким уровнем экспрессии ассоциированных с опухолью антигенов, к которым относится рецептор пролактина, означает, что ADC, содержащие антитело к PRLR согласно настоящему изобретению, могут обеспечивать значимую терапевтическую пользу при применении в более низкой дозе и/или менее частом введении по сравнению с ADC, оказывающими направленное воздействие на другие опухолевые антигены, например ErbB2.

Соответственно в настоящем изобретении предложены конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC), которые содержат антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, специфично свя-

зывающий человеческий PRLR, конъюгированные с цитотоксическим агентом, отличающиеся тем, что ADC эффективно уничтожают клетки (например, опухолевые клетки) с низким уровнем экспрессии PRLR. В близких вариантах осуществления изобретения настоящее изобретение включает способы, применяемые для эффективного уничтожения клеток с низким уровнем экспрессии PRLR. Способы согласно данному аспекту изобретения включают введение клеток в контакт с конъюгатами антитела с лекарственными средствами (ADC), содержащими антитело к PRLR, конъюгированное с цитотоксическим агентом. "Введение клеток в контакт" может быть выполнено in vitro или in vivo, например, путем введения ADC, содержащего антитело к PRLR, нуждающемуся в таком лечении пациенту, причем введение обуславливает контакт ADC с клетками, экспрессирующими рецептор пролактина.

В определенных контекстах, предполагаемых в объеме настоящего изобретения, "низкий уровень PRLR" означает уровень экспрессии, превышающий фоновый уровень менее чем 30-кратно. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения, предложены ADC, содержащие антитело к PRLR, которые эффективно уничтожают клетки с уровнем экспрессии PRLR, превышающем фоновый уровень менее чем 30-кратно, 25-кратно, 20-кратно, 18-кратно, 16-кратно, 14-кратно, 12-кратно, 8-кратно или менее. В настоящем документе термин "фон" означает (неспецифичный) сигнал, производимый, когда клетки взаимодействуют с изотипическим контрольным антителом (т.е. не обладающим специфичностью в отношении PRLR).

В определенных других контекстах "низкий уровень PRLR" может быть выражен количеством молекул PRLR из расчета на одну клетку. Например, в настоящем документе клетка "с низким уровнем экспрессии PRLR" экспрессирует менее приблизительно 1 млн копий PRLR на клетку. В определенных вариантах осуществления изобретения "низкий уровень" экспрессии PRLR" означает менее приблизительно 900000 копий, менее приблизительно 800000 копий, менее приблизительно 700000 копий, менее приблизительно 600000 копий, менее приблизительно 500000 копий, менее приблизительно 400000 копий, менее приблизительно 300000 копий, менее приблизительно 200000 копий, менее приблизительно 100000 копий, менее приблизительно 90000 копий, менее приблизительно 80000 копий, менее приблизительно 70000 копий, менее приблизительно 60000 копий, менее приблизительно 50000 копий, менее приблизительно 40000 копий, менее приблизительно 30000 копий, менее приблизительно 20000 копий или менее приблизительно 10000 копий PRLR на клетку.

В настоящем документе "эффективное уничтожение" означает, что ADC характеризуется IC_{50} менее приблизительно 20 нМ, или менее приблизительно 1 нМ (например, менее приблизительно 0,9 нМ, менее приблизительно 0,8 нМ, менее приблизительно 0,7 нМ, менее приблизительно 0,6 нМ, менее приблизительно 0,5 нМ, менее приблизительно 0,4 нМ или менее приблизительно 0,3 нМ) в количественном анализе киллинга опухолевых клеток, например количественном анализе, описанном в примере 7 в настоящем документе, или в существенно сходном количественном анализе. Согласно данному аспекту изобретения компонент ADC, представляющий собой антитело к PRLR, может быть любым антителом к PRLR, включая антитела к PRLR, содержащие любые аминокислотные последовательности CDR или HCVR/LCVR, показанные в табл. 1 в настоящем документе. Кроме того, цитотоксический компонент конъюгата ADC может быть любым цитотоксическим агентом, например DM1, или любым другим цитотоксическим агентом, упомянутым в настоящем документе.

ADC согласно настоящему изобретению способны подавлять рост опухоли и/или уменьшить размер опухоли у животных с опухолями, экспрессирующими PRLR (PRLR+). Например, как показано в примере 8 в настоящем документе введение ADC, содержащих антитело к PRLR и DM1, мышам с ксенотрансплантатом рака молочной железы PRLR+, привело к уменьшению опухоли до необнаружимого уровня. Таким образом, настоящее изобретение включает антитела к PRLR и ADC, содержащие такие антитела, отличающиеся тем, что введение антител или ADC животному с опухолью PRLR+ (например, с частотой приблизительно один раз в неделю и в дозе приблизительно от 1 до 15 мг/кг) приводит к подавлению роста опухоли и/или уменьшению размера опухоли (например, подавление роста опухоли на 100% или больше) к 52-му дню после введения или ранее.

Направленное воздействие на цитокиновый рецептор класса I.

PRLR принадлежит семейству цитокиновых рецепторов класса I. Как разъясняется выше и продемонстрировано на рабочих примерах в настоящем документе, неожиданно обнаружилось, что конъюгаты антитела с лекарственным средством (ADC), содержащие антитела к PRLR, могут эффективно направленно воздействовать и уничтожать клетки с низким уровнем экспрессии PRLR (см. пример 7 в настоящем документе). Кроме того, показано, что по сравнению с другими цитокиновыми рецепторами класса I (IL-4R и IL-6R) ADC способны также активно уничтожать клеточные линии с относительно низким уровнем экспрессии антигена-мишени (см. пример 9 в настоящем документе). Это свойство отличает их от ADC, направленных против других белков, экспрессируемых на клеточной поверхности, таких как ErbB2, где для эффективного уничтожения клеток требуется высокий уровень экспрессии мишени. Кроме того, неожиданно обнаружилось также, что интернализация антител к PRLR опухолевыми клетками (например, опухолевыми клетками T47D) происходит существенно быстрее, чем интернализация антител к Her2, и что это свойство коррелирует с более быстрой интернализацией и разрушением PRLR на клеточной поверхности клеток по сравнению с расположенным на клеточной поверхности рецептором Her2.

С учетом результатов, изложенных в настоящем документе, изобретатели полагают, что способность направленно воздействовать и уничтожать клетки с низким уронем экспрессии антигена на клеточной поверхности может быть общим свойством ADC, направленных против цитокиновых рецепторов I в целом и в частности против цитокиновых определенных рецепторов класса I, которые быстро подвергаются интернализации. Таким образом, настоящее изобретение включает способы направленного воздействия на цитокиновые рецепторы класса I (т.е. цитокиновые рецепторы класса I, быстро подвергающиеся интернализации) и способы уничтожения клеток, экспрессирующих цитокиновые рецепторы класса I, например клеток с низким уровнем экспрессии цитокиновых рецепторов класса I.

Способы согласно этому аспекту изобретения включают введение клетки, экспрессирующей цитокиновый рецептор класса I, с ADC, который содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, специфично связывающий цитокиновый рецептор класса I. Согласно определенным вариантам осуществления изобретения клетка-мишень имеет низкий уровень экспрессии (в том смысле, в каком экспрессия определяется в настоящем документе) цитокинового рецептора класса I и/или цитокинового рецептора класса I, который быстро интернализуется и разрушается (например, интернализуемого быстрее, чем референтная молекула на клеточной поверхности, например Her2). Также в настоящее изобретение включены конъюгированные с цитотоксическим агентом антитела или антигенсвязывающие фрагменты антител, которые специфично связывают цитокиновый рецептор класса I. В контексте данного аспекта изобретения может быть использован любой из цитотоксических агентов, линкеров и/или ADC-связанных технологий, описанных где-либо в настоящем документе. В настоящем документе "цитокиновый рецептор класса I" (также иногда называемый как "цитокиновый рецептор типа 1") означает трансмембранный рецептор, экспрессируемый на клеточной поверхности и реагирующий на цитокины с четырьмя альфа-спиральными цепями. Как разъясняется ниже, цитокиновые рецепторы класса I могут быть гетеродимерными или гомодимерными. В настоящем документе термин "цитокиновый рецептор класса I" включает и гетеродимерные, и гомодимерные рецепторы.

Гетеродимерные цитокиновые рецепторы класса I состоят из цитокин-специфичной цепи и "общей цепи". Соответственно такие гетеродимерные цитокиновые рецепторы класса I могут быть классифицированы на основании типа общей цепи, используемой рецептором для передачи сигнала. Примерами категорий гетеродимерных цитокиновых рецепторов класса I являются

(i) гетеродимерные рецепторы, содержащие общую гамма-цепь, такие как IL-2R, IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R и IL-15R;

(ii) гетеродимерные рецепторы, содержащие общую бета-цепь, такие как GM-CSF, IL-3R и IL-5R; и

(iii) gp130-содержащие гетеродимерные рецепторы, такие как IL-6R, IL-11R, рецептор CNTF, рецептор фактора, ингибирующего лейкемию (LIF), рецептор онкостатина M (OSM) и рецептор IL-12.

Гомодимерные цитокиновые рецепторы класса I включают рецептор фактора роста (GH), рецептор эритропоэтина (EPO), рецептор гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF), рецептор лептина и PRLR.

В определенных вариантах осуществления изобретения данного аспекта изобретения ADC содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, специфично связывающие гетеродимерный цитокиновый рецептор класса I. Согласно другим вариантам осуществления данного аспекта изобретения ADC содержит антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, специфично связывающие гомодимерный цитокиновый рецептор класса I.

Настоящее изобретение включает способы уничтожения клетки с низким уровнем экспрессии гетеродимерного цитокинового рецептора класса I. Способы согласно данному аспекту изобретения введение клетки с низким уровнем экспрессии гетеродимерного цитокинового рецептора класса I в контакт с ADC, содержащим антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфично связывают гетеродимерный цитокиновый рецептор класса I.

Альтернативно настоящее изобретение включает способы уничтожения клетки с низким уровнем экспрессии гомодимерного цитокинового рецептора класса I. Способы согласно данному аспекту изобретения введение клетки с низким уровнем экспрессии гомодимерного цитокинового рецептора класса I в контакт с ADC, содержащим антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые специфично связывают гомодимерный цитокиновый рецептор класса I.

Картирование эпитопов и связанные технологии.

Эпитоп, с которым связываются антитела по настоящему изобретению, может состоять из единственной непрерывной последовательности из 3 или большего количества (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или более) аминокислот белка PRLR. Альтернативно эпитоп может состоять из множества не-непрерывных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) рецептора пролактина. В некоторых вариантах осуществления изобретения эпитоп расположен на пролактин-связывающем домене PRLR или вблизи этого домена. В других вариантах осуществления изобретения эпитоп расположен за пределами пролактин-связывающего домена PRLR, например, на таком месте на поверхности PRLR, в котором антитело, связавшееся с таким эпитопом, не препятствует связыванию пролактина с PRLR.

Для того чтобы определить, взаимодействует ли антитело "с одной или несколькими аминокисло-

тами" полипептила или белка могут быть использованы разнообразные приемы, известные специалистам в данной области техники. Примеры таких приемов включают, например, стандартный эпитоп-перекрестный конкурентный количественный анализ, описанный в публикации Antibodies, Harlow-Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold. Spring Harb., Нью-Йорк), аланин-сканирующий мутационный анализ, пептидный блоттинг (Reineke, 2004, Methods Mol. Biol., 248:443-463) и анализ расщепления пептидов. Кроме того, могут использоваться следующие способы: эксцизия эпитопа, экстракция эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, Protein Science, 9:487-496). Другой способ, который может использоваться для идентификации аминокислот в составе полипептида, с которым взаимодействует антитело, представляет собой водородно-дейтериевый обмен с масс-спектрометрической детекцией. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает введение дейтериевой метки в интересующий белок с последующим связыванием антитела с меченым дейтерием белком.

Затем комплекс белок/антитело переносят в воду, чтобы создать условия для водородно-дейтериевого обмена во всех аминокислотных остатках кроме остатков, защищенных антителом (которые остаются меченными дейтерием). После диссоциации антитела белок-мишень подвергается расщеплению протеазой и масс-спектрометрическому анализу, посредством которого обнаруживают меченые дейтерием остатки, соответствующие специфичным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999), Analytical Biochemistry, 267(2):252-259; Engen, Smith (2001), Anal. Chem., 73:256A-265A.

Настоящее изобретение далее включает антитела к PRLR, которые связываются с тем же эпитопом, с которым связывается любое из специфичных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, показанных в табл. 1 в настоящем документе). Аналогично настоящее изобретение включает также антитела к PRLR, конкурирующие за связывание с PRLR с любым из специфичных иллюстративных антител, описанных в настоящем документе (например, антител, содержащих любую из аминокислотных последовательностей, показанных в табл. 1 в настоящем документе).

Используя стандартные методы, известные специалистам в данной области техники и проиллюстрированные в настоящем документе, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, с которым связывается референтное антитело к PRLR, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли испытуемое антитело с тем же эпитопом, с которым связывается референтное антитело к PRLR согласно изобретению, референтному антителу позволяют связаться с белком PRLR. Затем оценивают способность испытуемого антитела связываться с молекулой PRLR. Если испытуемое антитело способно связываться с PRLR после насыщения связывания с референтным антителом к PRLR, можно заключить, что испытуемое антитело и референтное антитело к PRLR связываются с разными эпитопами. С другой стороны, если испытуемое антитело не связывается с молекулой PRLR после насыщения связывания с референтным антителом к PRLR, то испытуемое антитело может связываться с тем же эпитопом, с которым связывается референтное антитело к PRLR согласно изобретению. После этого могут быть проведены дополнительные стандартные испытания (например, анализы мутантных пептидов и анализы связывания), чтобы проверить, обусловлено ли наблюдаемое отсутствие связывания испытуемого антитела в действительности связыванием с тем же эпитопом, с которым связывается референтное антитело, или же отсутствие связывания вызвано стерической блокадой (или другим феноменом). При проведении таких экспериментов могут применяться методы ИФА (ELISA), радиоиммуноанализ, BiaCore, проточная цитометрия или любой другой метод количественного анализа связывания антитела, доступный для специалиста. В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящего изобретения два антитела связываются с одни и тем же эпитопом (или частично совпадающими эпитопами), если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела подавляет связывание другого антитела не менее чем на 50%, но предпочтительно на 75, 90 или даже 99%, согласно результатам анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 1990, 50:1495-1502). Альтернативно полагают, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если по существу все мутации, затрагивающие аминокислоты в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела. Считается, что два антитела имеют "частично совпадающие эпитопы", лишь если субпопуляция мутаций, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого антитела.

Чтобы определить, конкурирует ли антитело за связывание (или имеет место перекрестная конкуренция за связывание) с референтным антителом к PRLR, вышеописанная методология применяется в двух ориентациях. В первой ориентации референтному антителу позволяют связаться с белком PRLR в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания испытуемого антитела с молекулой PRLR. Во второй ориентации испытуемому антителу позволяют связаться с молекулой в насыщающих условиях с последующей оценкой связывания референтного антитела с молекулой PRLR. Если в обеих ориентациях только первое (насыщающее) антитело способно связаться с молекулой PRLR, то делают заключение о конкуренции между испытуемым и референтным антителами за связывание с PRLR. Как очевидно для специалиста, антитело, конкурирующее за связывание с референтным антителом, не всегда

будет связываться с тем же эпитопом, что и референтное антитело, но может стерически заблокировать связывание референтного антитела посредством связывания с частично совпадающим или соседним эпитопом.

Получение человеческих антител.

Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению могут быть полностью человеческими антителами. Специалистам известны способы создания моноклональных антител, в том числе полностью человеческих моноклональных антител. В контексте настоящего изобретения любые такие известные способы могут применяться для получения человеческих антител, специфично связывающихся с человеческим PRLR.

Например, используя технологию VELOCIMMUNE™ или любой другой сходный известный способ создания полностью человеческих моноклональных антител, вначале выделяют высокоаффинные химерные антитела к PRLR, имеющие человеческую вариабельную область и мышиную константную область. Как описано ниже в экспериментальной части, антитела характеризуют и выбирают исходя из желательных характеристик, включающих аффинность, блокирующую лиганд активность, селективность, эпитоп и т.д. При необходимости мышиные константные области заменяют желаемой человеческой константной областью, например, дикого типа, или модифицированными IgG1 или IgG4, чтобы создать полностью человеческое антитело к PRLR. В то время как выбранная константная область может варьировать в соответствии с конкретным применением, характеристики высоко аффинного связывания с антигеном и специфичности в отношении мишени локализованы в вариабельной области. В определенных случаях полностью человеческие антитела к PRLR выделяют непосредственно из содержащих антиген В-лимфоцитов.

Биоэквиваленты.

Антитела к PRLR и антигенсвязывающие фрагменты антитела по настоящему изобретению включают белки с аминокислотными последовательностями, отличающимися от содержащихся в описанных антителах, но сохраняющими способность к связыванию человеческого PRLR. Такие варианты антител и фрагментов антител включают одну или несколько дополнительных аминокислот, делеций или замен аминокислот по сравнению с исходной последовательностью, но демонстрируют биологическую активность по существу эквивалентной активности описанных антител. Аналогично последовательности ДНК, кодирующие антитела к PRLR по настоящему изобретению, включают последовательности, содержащие одно или несколько добавленных нуклеотидов, делеций или замен нуклеотидов по сравнению с предложенной последовательностью, но при этом кодируют антитело к PRLR или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые по существу биоэквивалентны антителу к PRLR или фрагменту антитела согласно настоящему изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждаются выше.

Два антигенсвязывающих белка, или антитела, считают биоэквивалентными, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, скорость и степень всасывания которых статистически значимо не различаются при введении в той же молярной дозе при сходных экспериментальных условиях в однократной дозе или многократно. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они эквивалентны по степени всасывания, но не по скорости всасывания, и тем не менее могут считаться биоэквивалентными, потому что такие различия по скорости всасывания являются предусмотренными и отражены в справочной информации, не существенны для достижения эффективных концентраций лекарства в организме, например, при хроническом использовании и считаются с медицинской точки зрения незначимыми для определенного изучаемого лекарственного средства.

В одном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если между ними отсутствуют клинически значимые различия по безопасности, чистоте и активности.

В одном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если пациента можно один или несколько раз переводить с лечения референтным препаратом на биологический препарат без ожидаемого повышения риска нежелательных эффектов, включающих клинически значимое изменение иммуногенности или сниженную эффективность по сравнению с продолжением лечения без такого перехода.

В одном варианте осуществления изобретения два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентными, если у них общий механизм или механизмы действия для условия или условий использования в той степени, до которой такие механизмы известны.

Биоэквивалентность может быть продемонстрирована с использованием in vivo и in vitro методов. Меры по биоэквивалентности включают, например,

(a) испытание in vivo у людей или других млекопитающих, у которых концентрацию антител или их метаболитов как функцию от времени измеряют в крови, плазме, сыворотке или другой биологической жидкости;

(b) испытание in vitro, которое было скоррелированным и являлось обоснованно предсказательным применительно к данным о биодоступности в организме человека in vivo;

(c) испытание in vivo у людей или других млекопитающих, у которых измеряют соответствующий острый фармакологический эффект антитела (или его мишени) как функцию от времени; и

(d) в хорошо контролируемом клиническом исследовании, которое показало безопасность, эффективность, биодоступность или биоэквивалентность антитела.

Биоэквивалентные варианты антител к PRLR согласно изобретению могут быть сконструированы, например, посредством замещения остатков или последовательностей или удаления концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не нужны для биологической активности. Например, остатки цистеина, не существенные для биологической активности, могут быть удалены или заменены другими аминокислотами, чтобы не допустить образования ненужных или неправильных внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других контекстах биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител к PRLR, содержащие измененные аминокислоты, что приводит к изменению характеристик гликозилирования антител, например мутации, которые устраняют или удаляют гликозилирование.

Селективность в отношении определенных видов и перекрестная реактивность у разных видов.

В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения предложены антитела к PRLR, которые связываются с человеческим PRLR, но не связываются с PRLR других видов. Настоящее изобретение включает также антитела к PRLR, которые связываются с человеческим PRLR и с PRLR одного или нескольких видов, не относящихся к человеку. Например, антитела к PRLR согласно изобретению могут связываться с человеческим рецептором пролактина и могут связываться или не связываться в зависимости от обстоятельств с одним или несколькими рецепторами мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макаки-резуса или шимпанзе. Согласно определенным иллюстративным вариантам осуществления изобретения предложены антитела к PRLR, которые специфично связывают PRLR человека и PRLR яванского макака (например, Macaca fascicularis). Другие антитела к PRLR согласно изобретению, описанные в изобретении, связываются с человеческим PRLR, но не связываются или лишь слабо связываются с PRLR яванского макака.

Мультиспецифичные антитела.

Антитела согласно настоящему изобретению могут быть моноспецифичными или мультиспецифичными (например, биспецифичными). Мультиспецифичные антитела могут быть специфичными в отношении разных эпитопов одного полипептида-мишени или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфичные в отношении нескольких полипептидов-мишеней. См., например, Tutt et al., 1991, J. Immunol., 147:60-69; Kufer et al., 2004, Trends Biotechnol., 22:238-244. Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению могут быть соединены с или могут экспрессироваться совместно с другой функциональной молекулой, например другим пептидом или белком. Например, антитело или фрагмент антитела могут быть функционально соединены (например, посредством химического сопряжения, сплайсинга, нековалентной ассоциации или иначе) с одним или несколькими другими молекулярными группами, такими как другое антитело или фрагмент антитела, с образованием биспецифичного или мультиспецифичного антитела со второй специфичностью связывания.

Настоящее изобретение включает биспецифичные антитела, у которых один домен иммуноглобулина связывает человеческий PRLR, а другой домен иммуноглобулина является специфичным в отношении второго антигена. PRLR-связывающий домен может содержать любую из аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR или CDR, показанных в табл. 1 в настоящем документе. В определенных вариантах осуществления изобретения PRLR-связывающий домен связывает человеческий PRLR и блокирует связывание пролактина с PRLR. В других вариантах PRLR-связывающий домен связывает человеческий PRLR, но не блокирует связывание пролактина с PRLR.

Иллюстративным форматом биспецифичного антитела, которое может использоваться в контексте настоящего изобретения, является использование первого домена иммуноглобулина (Ig) C_H3 и второго домена IgC_H3, причем первый и второй домены IgC_H3 отличаются от друг друга по крайней мере одной аминокислотой, при этом различие по крайней мере на одну аминокислоту уменьшает связывание биспецифичного антитела с белком А по сравнению с биспецифичным антителом, у которого отсутствует различие по аминокислотному составу. В одном варианте осуществления изобретения первый домен IgC_H3 связывает Белок А и второй домен IgC_H3 содержит мутацию, которая уменьшает или отменяет связывание белка А, например модификацию H95R (нумерация экзона по системе IMGT); H435R (нумерация EC). Второй домен C_H3 может дополнительно содержать модификацию Y96F (IMGT; Y436F EC). Дополнительные модификации, которые могут быть обнаружены во втором домене C_H3, включают

D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I EC) в случае антител IgG1;

N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I EC) в случае антител IgG2; и

Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I EC) в случае антител IgG4.

Описанные выше варианты биспецифичного формата антитела входят в объем настоящего изобретения.

Другие иллюстративные биспецифичные форматы, которые могут использоваться в контексте настоящего изобретения, включают, не ограничиваясь перечисленным, например, форматы scFv или биспецифичные форматы диатела, сплайсинг IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрогибридому, структуру выступы-во-впадины, общую легкую цепь (например, общую легкую цепь с выступами-во-впадинах и т.д.), CrossMab, CrossFab, (SEED)тело, лейциновую застежку, дуотело, IgG1/IgG2, Fab двойного действия (DAF)-IgG и Mab^2 (см., например, Кляйн et al., 2012, mAbs, 4:6, 1-11; и ссылки, процитированные в эти документах, для ознакомления с вышеизложенными форматами). Биспецифичные антитела могут также быть сконструированы при использовании конъюгации между пептидом и нуклеиновой кислотой, причем, например, для создания сайт-специфичных конъюгатов антитела с олигонуклеотидом используются неприродные аминокислоты с ортогональной химической реактивностью, из которых затем в результате самосборки образуются мультимерные комплексы, имеющие определенный состав, валентность и геометрию (см., например, Kazane et al., J. Chem. Soc. [Epub: 4 декабря 2012]).

Терапевтический препарат и введение.

В изобретении предложены фармацевтические композиции, содержащие антитела к PRLR или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению. В состав фармацевтических композиций согласно изобретению входят подходящие носители, вспомогательные вещества и другие агенты, которые обеспечивают улучшенный перенос, доставку, переносимость и т.п. В фармакологических руководствах можно найти многочисленные соответствующие лекарственные формы, известные всем химикам-фармацевтам: Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Company, Истон, Пенсильвания. Эти лекарственные формы включают, например, порошки, пасты, мази, гели, воски, масла, липиды, липидсодержащие везикулы (катионные или анионные) (например, LIPOFECTIN™, LifeTechnologies, Карлсбад, Калифорния), конъюгаты ДНК, безводные адсорбирующие пасты, эмульсии типа "масло в воде" и "вода в масле", эмульсии карбовакс (полиэтиленгликоли с различными молекулярными массами), полутвердые гели и полутвердые смеси, содержащие карбовакс. См. также Powell et al., "Compendium of excipients for parenteral formulations" (Справочник по вспомогательным веществам для парентеральных лекарственных форм), PDA (1998), J. Pharm. Sci. Technol., 52:238-311.

Доза антитела, вводимая пациенту, может варьироваться в зависимости от возраста и размера пациента, подлежащего лечению заболевания, состояний, способов введения и т.п. Предпочтительная доза, как правило, рассчитывается по массе тела или площади поверхности тела. Для взрослых пациентов может быть предпочтительным внутривенное введение антитела согласно настоящему изобретению, причем, как правило, однократная доза составляет от приблизительно 0,01 до приблизительно 20 мг/кг массы тела, более предпочтительно от приблизительно 0,02 до приблизительно 7 мг/кг массы тела, от приблизительно 0,03 до приблизительно 5 мг/кг массы тела или от приблизительно 0,05 до приблизительно 3 мг/кг массы тела. Частота и продолжительность лечения могут быть скорректированы в зависимости от тяжести и продолжительности состояния. Эффективные дозировки и графики введения антитела к PRLR могут быть определены эмпирически; например, может проводиться периодическая оценка изменений в состоянии пациента с последующей корректировкой дозы. Кроме того, может быть выполнен межвидовой пересчет дозировок с помощью способов, известных в данной области техники (например, Mordenti et al., 1991, Pharmaceut. Res., 8:1351).

Известны различные системы доставки, которые могут использоваться для введения фармацевтической композиции согласно изобретению, например инкапсуляция в липосомах, микрочастицах, микрокапсулах, рекомбинантных клетках, способных экспрессировать мутантные вирусы, опосредованный рецептором эндоцитоз (см., например, Wu et al., 1987, J. Biol. Chem., 262:4429-4432). Способы введения включают, не ограничиваясь перечисленным, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, перидуральный и оральный способы. Композиция может вводиться любым удобным способом, например, посредством инфузии или струйного вливания, всасывания через эпителиальные или кожно-слизистые выстилки органов (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и кишечника и т.д.), и может вводиться вместе с другими биологически активными веществами. Введение может быть системным или местным.

Фармацевтическая композиция согласно настоящему изобретению может быть доставлена подкожно или внутривенно стандартной иглой и шприцем. Кроме того, относительно подкожной поставки для доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению вполне может применяться шприц-ручка. Такая шприц-ручка может быть предназначена для однократного или многократного использования. Шприц-ручка для многоразового использования обычно применяется со сменным картриджем, в котором находится фармацевтическая композиция. После введения всей содержащейся в картридже фармацевтической композиции и опорожнения картриджа пустой картридж может быть извлечен и заменен на новый картридж с фармацевтической композицией. Шприц-ручка снова готова к использованию. В одноразовой шприце-ручке сменный картридж отсутствует. Одноразовая шприц-ручка поставляется предварительно наполненной фармацевтической композицией, которая находится в резервуаре шприца. После освобождения резервуара от фармацевтической композиции шприц-ручка подлежит утилизации.

Для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению при-

меняются многочисленные разнообразные шприц-ручки для многократного использования и автоинъекторы. Примеры включают, не ограничиваясь перечисленным, AUTOPEN™ (Owen Mumford, Inc., Вудсток, Великобритания), DISETRONIC™ (Disetronic Medical Systems, Бергдорф, Швейцария), HUMALOG MIX 75/25™, HUMALOG™, HUMALIN 70/30™ (Eli Lilly and Co., Индианаполис, Индиана), NOVOPEN™ I, II и III (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), NOVOPEN JUNIOR™ (Novo Nordisk, Копенгаген, Дания), BD™ (Becton Dickinson, Франклин Лэйкс, Нью-Джерси), OPTIPEN™, OPTIPENPRO™, OPTIPENSTARLET™, и OPTICLIK™ (Sanofi-Aventis, Франкфурт, Германия) и многие другие устройства. Примеры одноразовых шприц-ручек, используемых для подкожной доставки фармацевтической композиции согласно настоящему изобретению, включают, не ограничиваясь перечисленным, SOLOSTAR™ (Sanofi-Aventis), FLEXPEN™ (Novo Nordisk) и KWIKPEN™ (Eli Lilly), автоинжектор SURECLICK™ (Amgen, Саузенд-Оукс, Калифорния), PENLET™ (Haselmeier, Штутгарт, Германия), EPIPEN (Dey, L.P.), HUMIRA™ (Abbott Labs, Эббот-Парк, Иллинойс) и многие другие устройства.

В определенных ситуациях для доставки фармацевтической композиции может применяться система с контролируемым высвобождением. В одном варианте осуществления изобретения может использоваться насос (см. Langer выше; Sefton, 1987, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng., 14:201). В другом варианте осуществления изобретения могут использоваться полимерные материалы (см. "Медицинское применение систем с контролируемым высвобождением", под ред. Langer, Wise, 1974, CRC Pres., Бока-Ратон, Флорида). В еще одном варианте осуществления изобретения система с контролируемым высвобождением может быть помещена вблизи мишени для композиции, при этом требуется только часть системной дозы (см., например, Goodson, 1984, в публикации "Медицинское применение систем с контролируемым высвобождением" выше, издание 2, с. 115-138). Другие системы с контролируемым высвобождением обсуждаются в обзоре Langer, 1990, Science, 249:1527-1533.

Инъекционные препараты могут включать лекарственные формы для внутривенных, подкожных, внутрикожных и внутримышечных инъекций, капельных инфузий и т.д. Эти инъекционные препараты могут быть получены с помощью известных способов. Например, инъекционные препараты могут быть получены путем растворения, суспендирования или эмульгирования антитела или его описанных выше солей в стерильной водной среде или масляной питательной среде, традиционно используемой для инъекций. В качестве водной среды для инъекций могут быть использованы, например, физиологический раствор, изотонический раствор, содержащий глюкозу и другие вспомогательные вещества, и т.д., которые могут использоваться в комбинации с соответствующими солюбилизирующим агентом, таким как спирт (например, этанол), полиспирт (например, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль), неионогенное поверхностно-активное вещество (например, полисорбат 80, HCO-50 (полиэтиленоксид (50 моль) аддукт гидрогенизируемого касторового масла)) и т.д. В качестве масляной среды используется, например, кунжутное масло, соевое масло и т.д., которые могут применяться в комбинации с соответствующим солюбилизирующим агентом, таким как бензилбензоат, бензиловый спирт и т.д. Приготовленным таким образом препаратом для инъекции предпочтительно заполняют соответствующие ампулы.

Предпочтительно готовить описанные выше фармацевтические композиции для перорального или парентерального введения в виде лекарственных форм в стандартной дозе, подходящей для корректировки дозы действующих веществ. Такие лекарственные формы в стандартной дозе включают, например, таблетки, пилюли, капсулы, препараты для инъекций (ампулы), суппозитории и т.д. Количество вышеупомянутого антитела в стандартной дозе обычно составляет от приблизительно 5 мг до приблизительно 500 мг в стандартной дозе лекарственной формы; предпочтительное содержание вышеупомянутого антитела составляет от приблизительно 5 мг до приблизительно 100 мг, особенно в лекарственных формах для инъекции, и от приблизительно 10 мг до приблизительно 250 мг в других лекарственных формах.

Терапевтическое применение антител.

Настоящее изобретение включает способы, включающие введение нуждающемуся в лечении пациенту данной терапевтической композиции, содержащей антитело к PRLR или конъюгата антитела с лекарственным средством, включающего антитела к PRLR (например, антитела к PRLR или ADC, содержащих любую из последовательностей HCVR/LCVR или CDR, показанные в табл. 1 в настоящем документе). Терапевтическая композиция может содержать любое антитело к PRLR, антигенсвязывающие фрагменты этих антител или ADC согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель.

Антитела и ADC согласно настоящему изобретению используются, среди прочего, для лечения, профилактики и/или уменьшения интенсивности любого заболевания или нарушения, связанного или опосредованного экспрессией или активностью рецептора пролактина, а также могущего быть излеченным посредством блокирования взаимодействия между PRLR и пролактином, или подавления активности PRLR и/или участия PRLR в сигнальном пути, и/или путем содействия интернализации рецептора и/или снижения численности рецепторов на клеточной поверхности.

Например, антитела и ADC согласно настоящему изобретению используются для лечения опухолей, экспрессирующих рецептор пролактина и/или зависимых от сигнальных путей с участием пролак-

тина, например опухолей молочной железы. Антитела и антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению могут также использоваться для лечения первичных и/или метастатических опухолей, образующихся в головном мозге и мягких мозговых оболочках, ротоглотке, легких и в бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужских и женских половых путях, мышцах, костях, коже и придатках кожи, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворной системе и костном мозге, в печени и мочевых путях и специальных сенсорных органах, таких как глаз. В определенных вариантах осуществления изобретения антитела и ADC согласно настоящему изобретению используются для лечения одного или нескольких следующих онкологических заболеваний: почечно-клеточной карциномы, карциномы поджелудочной железы, рака головы и шеи, рака предстательной железы, злокачественной глиомы, остеогенной саркомы, рака ободочной и прямой кишки, рака желудка (например, рака желудка с амплификацией гена MET), злокачественной мезотелиомы, множественной миеломы, рака яичников, мелкоклеточного рака легких, не мелкоклеточного рака легких, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, рака молочной железы или меланомы.

Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению также используются для лечения или профилактики одного или нескольких заболеваний или нарушений, выбранных из группы, включающей эндометриоз, аденомиоз, негормональную контрацепцию у женщин, доброкачественные заболевания молочных желез и масталгию, подавление лактации, доброкачественную гипертрофию предстательной железы, фиброзные опухоли, гипер- и нормопролактинемической алопеции и в составе гормональной терапии, направленной на подавление пролиферации эпителиальных клеток в молочных железах.

В контексте способов лечения, описанных в настоящем документе, антитело к PRLR может применяться в режиме монотерапии (т.е. как единственный терапевтический агент) или в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами (примеры которых описаны в других разделах данного документа).

Настоящее изобретение включает способы идентификации пациентов, которые могут быть пролечены антителами или ADC согласно настоящему изобретению, посредством анализа, направленного на выявление высокого уровня экспрессии PRLR в одной или нескольких тканях пациента, таких как опухолевая ткань. Близкий вариант осуществления настоящего изобретения включает способы лечения рака, характеризующегося высоким уровнем экспрессии PRLR. Например, настоящее изобретение включает способы лечения, включающие введение антитела к PRLR согласно настоящему изобретению, или ADC, содержащего такое антитело (например, любого из ADC, содержащего антитело к PRLR, описанного в других разделах настоящего документа), пациенту с опухолью, в которой был идентифицирован высокий уровень экспрессии PRLR. В определенных вариантах осуществления изобретения для идентификации высокого уровня экспрессии PRLR в опухоли применяется иммуногистохимическое исследование полученного при биопсии образца или другие методы визуализации, например иммуно-ПЭТ и т.д.

Комбинированная терапия и лекарственные формы.

Настоящее изобретение включает композиции и лекарственные формы, содержащие любое из антител к PRLR, описанное в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение такой комбинации пациенту.

Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав лекарственной формы и/или могут быть введены в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из следующих веществ: антагонист EGFR (например, антитело к EGFR (например, цетуксимаб или панитумумаб) или низкомолекулярный ингибитор EGFR (например, гефинитиб или эрлотиниб)), антагонист другого члена семейства рецепторов EGFR, например Her2/ErbB2, ErbB3 или ErbB4 (например, антитело к ErbB2 (например, трастузумаб или T-DM1 (KADCYLA®)), антитело к ErbB3, или антитело к ErbB4, или низкомолекулярный ингибитор рецепторов ErbB2, ErbB3 или ErbB4), антагонист EGFRvlll (например, антитело, специфично связывающее EGFRvlll), антагонист cMET (например, антитело к cMET), антагонист IGF1R (например, антитело к IGF1R), ингибитор B-raf (например, вемурафениб, сорафениб, GDC-0879, PLX-4720), ингибитор PDGFR-α (например, антитело к PDGFR-α), ингибитор PDGFR-β (например, антитело к PDGFR-β антитело или низкомолекулярный ингибитор киназы, например иматиниба мезилат или сунитиниба малат), ингибитор лиганда PDGF (например, антитело к PDGF-A, -B, -C или -D, аптамер, миРНК и т.д.), антагонист VEGF (например, VEGF-Trap, например, афлиберсепт (см. патент США 7087411), также упомянутый в настоящем документе как "ингибирующий VEGF химерный белок", антитело к VEGF (например, бевацизумаб), низкомолекулярный ингибитор киназы рецептора VEGF (например, сунитиниб, сорафениб или пазопаниб)), антагонист DLL4 (например, антитело к DLL4, предложенное в патенте США 2009/0142354, например, REGN421), антагонист Ang2 (например, антитело к Ang2, предложенное в патенте США 2011/0027286, например H1H685P), антагонист FOLH1 (например, антитело к FOLM), антагонист STEAP1 или STEAP2 (например, антитело к STEAP1 или антитело к STEAP2), антагонист TMPRSS2 (например, антитело к TMPRSS2), антагонист MSLN (например, антитело к MSLN), антагонист CA9 (например, антитело к CA9), антагонист уроплакина (например, анти-уроплакин (например, антитело к

UPK3A)), антагонист MUC16 (например, антитело к MUC16), антагонист Tn-антигена (например, антитело к Tn), антагонист CLEC12A (например, антитело к CLEC12A), антагонист TNFRF17 (например, антитело к TNFRF17), антагонист LGR5 (например, антитело к LGR5), моновалентный антагонист CD20 (например, моновалентное антитело к CD20, такое как ритуксимаб) и т.д. Другие агенты, которые могут принести пользу при введении в комбинации с антителами согласно изобретению, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокина, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокина и антитела, связывающиеся с цитокинами, например L-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с соответствующими рецепторами цитокинов.

Настоящее изобретение включает композиции и лекарственные формы, содержащие любое из антител к PRLR, описанных в настоящем документе, в комбинации с одним или несколькими химиотерапевтическими агентами. Примеры химиотерапевтических агентов включают

алкилирующие агенты, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan™);

алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфон и пипосульфан;

азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа, и уредопа;

этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентриофосфороамид и триметиломеламин;

хлорметины, например хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, мехлорэтамина оксид гидрохлорид, мелфалан, новембицин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин;

нитромочевины, такая как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномицины, актиномицин, отрамицин, азамерин, блеомицины, актиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карцинофилин, хромонинцины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идамбицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфиромицин, пуромицин, квеламицин, родоубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; пуриновые аналоги, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, триамиприн, тиогуанин; пиримидиновые аналоги, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолона пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; антиадреналы, такие как аминоглютетимид, митотан, трилостан; средства, восполняющие недостаток фолиевой кислоты, такие как фолиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминолевулиновая кислота; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; элфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK™; разоксан; сизафрран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид; ("Ara-C"); циклофосфамид; тиотепа; таксаны, например, паклитаксел (TAXOL™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доксетаксел (TAXOTER™, Aventis, Энтони, Франция); хлорамбицил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платина; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин C; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навелбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминоптерин; кселода; ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевая кислота; эсперамицины; и капецитабин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных веществ. Также в настоящее определение включают антигормональные агенты, которые действуют, регулируя или ингибируя действие гормонов на опухоли, например антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (Fareston); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и госерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеуказанных веществ.

Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению могут быть включены в состав лекарственной формы и/или могут быть введены в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгезирующими средствами, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами ЦОГ, кардиопротекторами, металлохелатами, ИФН-гамма и/или НПВС.

Дополнительный(ые) терапевтически активный(ые) компонент(ы), например любой из упомянутых выше агентов или его производные, может(могут) применяться непосредственно до, одновременно или вскоре после введения антитела к PRLR, описанного в настоящем изобретении; в целях настоящего изобретения такие схемы введения рассматриваются как назначение антитела к PRLR "в комбинации с" дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитела к PRLR согласно настоящему изобретению включены в состав,

содержащий одно или несколько дополнительных терапевтически активных компонентов, как описано в других разделах настоящего документа.

Схемы применения.

Согласно определенным вариантам осуществления настоящего изобретения, многократные дозы антитела к PRLR (или фармацевтической композиции, включающей комбинацию антитела к PRLR с любым из дополнительных терапевтически активных веществ, упомянутых в настоящем документе) могут быть введены пациенту в течение определенного интервала времени. Способы согласно этому аспекту изобретения включают последовательное введение пациенту многократных доз антитела к PRLR согласно изобретению. В настоящем документе "последовательное введение" означает, что каждая доза антитела к PRLR вводится пациенту в различные моменты времени, например в разные дни, разделенные заданным интервалом (например, в часах, днях, неделях или месяцах). Настоящее изобретение включает способы, предусматривающие последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела к PRLR с последующим введением одной или нескольких доз антитела к PRLR второй очереди и возможным последующим введением одной или нескольких доз антитела к PRLR третьей очереди.

Термины "начальная доза", "доза второй очереди" и "доза третьей очереди" относятся к временной последовательности введения антитела к PRLR, описанного в настоящем изобретении. Таким образом "начальная доза" является дозой, введенной в начале схемы лечения (также называемая "основной дозой"); "дозы второй очереди" являются дозами, введенными после начальной дозы; и "дозы третьей очереди" являются дозами, введенными после доз второй очереди. Начальные дозы, дозы второй и третьей очередей могут содержать одинаковое количество антитела к PRLR, но обычно могут различаться по частоте введения. Однако в определенных вариантах осуществления изобретения количество антител к PRLR, содержащихся в начальной дозе, дозах второй очереди и дозах третьей очереди варьирует в ходе лечения (например, увеличивается или уменьшается в зависимости от ситуации). В определенных вариантах осуществления изобретения в начале схемы лечения вводят две или более доз (например, 2, 3, 4, или 5) в качестве "насыщающих доз" с последующим более редким введением дальнейших доз (так называемых "поддерживающих доз").

В частных примерах вариантов осуществления настоящего изобретения каждая доза второй и/или третьей очереди вводится через 1-26 (например, 1, $1^1/_2$, 2, $2^1/_2$, 3, $3^1/_2$, 4, $4^1/_2$, 5, $5^1/_2$, 6, $6^1/_2$, 7, $7^1/_2$, 8, $8^1/_2$, 9, $9^1/_2$, 10, $10^1/_2$, 11, $11^1/_2$, 12, $12^1/_2$, 13, $13^1/_2$, 14, $14^1/_2$, 15, $15^1/_2$, 16, $16^1/_2$, 17, $17^1/_2$, 18, $18^1/_2$, 19, $19^1/_2$, 20, $20^1/_2$, 21, $21^1/_2$, 22, $22^1/_2$, 23, $23^1/_2$, 24, $24^1/_2$, 25, $25^1/_2$, 26, $26^1/_2$ или больше) недель после предыдущей дозы. В настоящем документе фраза "непосредственно предыдущая доза" означает в последовательности многократных введений дозу антитела к PRLR, введенную пациенту до введения непосредственно следующей дозы в последовательности без промежуточных доз.

Способы согласно данному аспекту изобретения могут включать введение пациенту любого количества доз второй и/или третьей очереди антитела к PRLR. Например, в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводят только дозу второй очереди. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) доз второй очереди. Аналогично в определенных вариантах осуществления изобретения пациенту вводят только дозу третьей очереди. В других вариантах осуществления изобретения пациенту вводят две или большее количество (например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или более) доз третьей очереди. Схема введения может применяться в течение неопределенного срока в течение всей жизни конкретного пациента или до тех пор, пока пациент не перестанет нуждаться в таком лечении или лечение перестанет приносить пользу.

В вариантах осуществления изобретения, включающих многократные дозы второй очереди, каждая доза второй очереди может быть введена с такой же частотой, как и другие дозы второй очереди. Например, каждая доза второй очереди может быть введена пациенту чрез 1-2 недели или 1-2 месяца после непосредственно предыдущей дозы. Аналогично в вариантах осуществления изобретения, включающих многократные дозы третьей очереди, каждая доза третьей очереди может быть введена с такой же частотой, как и другие дозы третьей очереди. Например, каждая доза третьей очереди может быть введена пациенту чрез 2-12 недель после непосредственно предыдущей дозы. В определенных вариантах осуществления изобретения частота введения дозы второй или третьей очереди пациенту может изменяться на протяжении курса лечения. Частота введения может корректироваться во время курса лечения врачом в зависимости от потребностей отдельного пациента после клинического обследования.

Настоящее изобретение включает схемы введения, в которых пациенту вводят от 2 до 6 насыщающих доз с первой частотой (например, один раз в неделю, один раз в две недели, один раз в три недели, один раз в месяц, один раз в два месяца и т.д.), с последующим более редким введением двух или более поддерживающих доз. Например, согласно этому аспекту изобретения, если насыщающие дозы вводятся с частотой один раз в месяц, то поддерживающие дозы могут вводиться пациенту один раз в шесть недель, один раз в два месяца, один раз в три месяца и т.д.

Диагностическое применение антител.

Антитела к PRLR согласно настоящему изобретению могут также использоваться для обнаружения и/или измерения количества рецепторов пролактина или экспрессирующих PRLR клеток в образце, например, в диагностических целях. Например, антитело к PRLR или его фрагмент может использоваться

для диагностирования состояния или заболевания, характеризующегося аберрантной экспрессией (например, чрезмерной экспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т.д.). Примеры диагностического количественного анализа рецептора пролактина могут включать, например, введение полученного у пациента образца в контакт с антителом к PRLR согласно настоящему изобретению, при этом антитело к PRLR должно быть помечено обнаружимой меткой или репортерной группой. Альтернативно для диагностики может применяться немеченное антитело к PRLR в комбинации с обнаружимо меченым вторичным антителом. В качестве обнаружимой метки или репортерной группы могут быть использованы радиоизотоп, такой как ^{3}H, ^{14}C, ^{32}P, ^{35}S или ^{125}I; флуоресцентная или хемолюминесцентная группа, например резорцинфталеин или родамин; или фермент, такой как как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Примеры специфичных анализов, которые могут использоваться для обнаружения или измерения рецептора пролактина в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ИФА; ELISA), радиоиммуноанализ (РИА), иммуно-ПЭТ (например, ^{89}Zr, ^{64}Cu и т.д.) и сортировку клеток с активацией флуоресценцией (FACS).

Образцы, которые могут использоваться в диагностических анализах PRLR согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, взятый у пациента, содержащий обнаружимые количества белка PRLR или его фрагментов в норме или патологии. Обычно вначале измеряют содержание рецептора пролактина в образце, полученном у здорового пациента (т.е. пациента, у которого отсутствует заболевание или состояние, ассоциированное с патологическим количеством или патологической активностью рецептора пролактина), чтобы установить исходный или стандартный уровень рецептора. Затем будет выполнено сравнение этого исходного уровня PRLR с содержанием PRLR в образцах, полученных у лиц с диагностированным или предполагаемым заболеванием или состоянием, связанным с PRLR.

Примеры

Следующие примеры показаны, чтобы представить специалистам в отрасли полную информацию и описание получения и использования способов и композиций согласно настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема изобретения, как его представляют авторы. Были приложены усилия для обеспечения точности количественных показателей (например, количеств, температуры и т.д.), но необходимо принимать во внимание некоторые ошибки и отклонения при проведении экспериментов. Если не указано иное, то они являются весовыми частями, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура выражена в градусах Цельсия и давление является атмосферным или близким к атмосферному.

Пример 1. Создание антител к PRLR.

Антитела к PRLR были получены путем иммунизации мыши VELOCIMMUNE® (т.е. генно-инженерной мыши, содержащей ДНК, кодирующую вариабельные области тяжелой цепи и легкой каппа цепи человеческого иммуноглобулина) иммуногеном, содержащим растворимый димерный эктодомен человеческого PRLR. Для мониторинга антительного иммунного ответа использовали PRLR-специфичный иммуноанализ. Когда желаемый иммунный ответ был достигнут, у животного получили спленоциты и слили их с клетками мышиной миеломы, чтобы сохранить жизнеспособность и получить линию гибридомных клеток. Затем был проведен скрининг и отбор гибридомных клеточных линий, чтобы идентифицировать клеточные линии, в которых образуются химерные антитела к PRLR. С помощью этого приема были получены несколько химерных антител к PRLR (т.е. антител, обладающих человеческими вариабельными доменами и мышиными константными доменами). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к PRLR были выделены непосредственно из антиген-положительных B-лимфоцитов без слияния с миеломными клетками, как описано в патенте США 2007/0280945 A1.

Ниже в примерах подробно описаны некоторые биологические свойства иллюстративных антител к PRLR, полученных в соответствии со способами, описанными в настоящем примере.

Пример 2. Аминокислотные последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепей и соответствующие им нуклеотидные последовательности.

В табл. 1 показаны идентификаторы аминокислотной последовательности вариабельных областей тяжелой и легкой цепи и CDR отдельных антител к PRLR согласно настоящему изобретению. Соответствующие идентификаторы нуклеотидных последовательностей показаны в табл. 2.

Таблица 1

Идентификаторы аминокислотных последовательностей

№ Идентификатора последовательности

Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H6762P	2	4	6	8	10	12	14	16
H1H6765P	18	20	22	24	26	28	30	32
H1H6774P	34	36	38	40	42	44	46	48
H1H6781P	50	52	54	56	58	60	62	64
H1H6782P	66	68	70	72	74	76	78	80
H1H6783P	82	84	86	88	90	92	94	96
H1H6785P	98	100	102	104	106	108	110	112
H1H6790P	114	116	118	120	122	124	126	128
H1H6792P	130	132	134	136	138	140	142	144
H1H6793P	146	148	150	152	154	156	158	160
H1H6795P	162	164	166	168	170	172	174	176
H1H6797P	178	180	182	184	186	188	190	192
H1H6800P	194	196	198	200	202	204	206	208
H1H6801P	210	212	214	216	218	220	222	224
H1H6803P	226	228	230	232	234	236	238	240
H1H6804P	242	244	246	248	250	252	254	256
H1H6807P	258	260	262	264	266	268	270	272
H1M6953N	274	276	278	280	282	284	286	288
H2M6958N2	290	292	294	296	298	300	302	304
H2M6959N2	306	308	310	312	314	316	318	320
H2M6960N	322	324	326	328	330	332	334	336
H2M6966N	338	340	342	344	346	348	350	352
H2M6967N	354	356	358	360	362	364	366	368
H2M6975N	370	372	374	376	378	380	382	384
H2M6976N	386	388	390	392	394	396	398	400

Таблица 2

Идентификаторы нуклеотидных последовательностей

№ идентификатора последовательности нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3
H1H6762P	1	3	5	7	9	11	13	15
H1H6765P	17	19	21	23	25	27	29	31
H1H6774P	33	35	37	39	41	43	45	47
H1H6781P	49	51	53	55	57	59	61	63
H1H6782P	65	67	69	71	73	75	77	79
H1H6783P	81	83	85	87	89	91	93	95
H1H6785P	97	99	101	103	105	107	109	111
H1H6790P	113	115	117	119	121	123	125	127
H1H6792P	129	131	133	135	137	139	141	143
H1H6793P	145	147	149	151	153	155	157	159
H1H6795P	161	163	165	167	169	171	173	175
H1H6797P	177	179	181	183	185	187	189	191
H1H6800P	193	195	197	199	201	203	205	207
H1H6801P	209	211	213	215	217	219	221	223
H1H6803P	225	227	229	231	233	235	237	239
H1H6804P	241	243	245	247	249	251	253	255
H1H6807P	257	259	261	263	265	267	269	271
H1M6953N	273	275	277	279	281	283	285	287
H2M6958N2	289	291	293	295	297	299	301	303
H2M6959N2	305	307	309	311	313	315	317	319
H2M6960N	321	323	325	327	329	331	333	335
H2M6966N	337	339	341	343	345	347	349	351
H2M6967N	353	355	357	359	361	363	365	367
H2M6975N	369	371	373	375	377	379	381	383
H2M6976N	385	387	389	391	393	395	397	399

В настоящем документе антитела, как правило, упоминаются согласно следующей номенклатуре: префикс Fc (например, "H1H", "H1M", "H2M" и т.д.), далее числовой идентификатор (например, "6762", "6953", "6958" и т.д.) с последующим суффиксом "P" или "N", как показано в табл. 1 и 2. Таким образом, согласно данной номенклатуре антитело может быть указано в настоящем документе как, например, "H1H6762P", "H1M6953N", "H2M6958N" и т.д. Префиксы H1H, H1M и H2M на обозначениях антитела, используемых в настоящем документе, указывают определенный изотип области Fc антитела. Например, антитело "H1H" имеет человеческий IgG1 Fc, антитело "H1M" имеет мышиный IgG1 Fc и антитело "H2M" имеет мышиный IgG2 Fc (все вариабельные области являются полностью человеческими, на то указывает первый 'H' в обозначении антитела). Как очевидно для специалиста, антитело, имеющее опре-

деленный изотип Fc, может быть преобразовано в антитело с другим изотипом Fc (например, антитело с мышиным IgG1 Fc может быть преобразовано в антитело с человеческим IgG4 и т.д.), но в любом случае вариабельные домены (включая CDR), которые в табл. 1 и 2 обозначены числовыми идентификаторами, остаются теми же, и ожидается, что свойства связывания, будут идентичными или существенно сходными независимо от природы участка Fc.

Контрольные конструкции, используемые в следующих примерах.

В сравнительных целях в описанные ниже эксперименты были включены контрольные конструкции.

Контроль I: человеческое антитело к PRLR с вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющими аминокислотные последовательности соответствующих доменов "he.06.642-2", показанные в WO2008/02295A2.

Контроль II: человеческое антитело к ErbB2 с вариабельными доменами тяжелой и легкой цепей, имеющими аминокислотные последовательности соответствующих доменов "4D5v8", показанные в публикации Carter et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci., США, 89:4285-4289.

Пример 3. Аффинность связывания, определенного методом поверхностного плазменного резонанса, и кинетические константы человеческих моноклональных антител к PRLR.

Аффинность связывания и кинетические константы человеческого моноклинального антитела к PRLR определяли методом поверхностного плазмонного резонанса при 25 и 37°C. На сенсорной поверхности с антителами к человеческому Fc захватывали антитела, экспрессированные как Fc человеческого IgG1 (т.е. обозначения "H1H") (формат захвата моноклонального антитела (mAb)), и на сенсорную поверхность инъекционно наносили растворимый мономерный (hPRLR.mmh; SEQ ID NO: 401 или Macaca fascicularis(mf) PRLR.mmh; SEQ ID NO: 403) или димерный (hPRLR.mFc; SEQ ID NO: 402) белок PRLR. Измерения проводились на приборе T200 BiaCore. Кинетические константы скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) были определены путем обработки и аппроксимации данных к модели связывания в соотношении 1:1 при использовании программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2,0. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и полупериод диссоциации ($t_{1/2}$) были вычислены из кинетических констант скорости как

$$K_D(M)=k_d/k_a; \text{ и}$$
$$t_{1/2}(\text{мин})=(\ln 2/(60*k_d)$$

Результаты показаны в табл. 3 и 4.

Таблица 3

Определенные на приборе Biacore аффинности связывания Fc человеческих моноклональных антител (mAbs) при 25°C

Связывание при 25°C / Формат захвата антитела

Антитело	Аналит	k_a ($M^{-1}c^{-1}$)	k_d (c^{-1})	K_D (молярный)	T½ (мин)
H1H6953N	hPRLR.mmh	7.92E+05	2.12E-04	2.68E-10	54.5
	hPRLR.mFc	7.11E+05	4.77E-05	6.70E-11	242.2
	mfPRLR.mmh	7.27E+05	3.19E-04	4.38E-10	36.3
H1H6958N2	hPRLR.mmh	2.33E+05	2.72E-04	1.17E-09	42.5
	hPRLR.mFc	4.22E+05	3.66E-05	8.67E-11	315.8
	mfPRLR.mmh	1.95E+05	2.80E-04	1.44E-09	41.3
H1H6959N2	hPRLR.mmh	1.79E+05	3.60E-02	2.02E-07	0.3
		3.59E+05	5.18E-04	1.45E-09	22.3

	hPRLR.mFc				
	mfPRLR.mmh	1.29E+05	1.67E-02	1.29E-07	0.7
H1H6960N	hPRLR.mmh	1.08E+05	7.29E-04	6.74E-09	15.8
	hPRLR.mFc	2.52E+05	3.56E-05	1.41E-10	324.4
	mfPRLR.mmh	9.40E+04	5.83E-04	6.20E-09	19.8
H1H6966N	hPRLR.mmh	8.52E+05	2.57E-04	3.02E-10	44.9
	hPRLR.mFc	9.31 E+05	4.08E-05	4.39E-11	282.9
	mfPRLR.mmh	7.82E+05	3.25E-04	4.16E-10	35.6
H1H6967N	hPRLR.mmh	2.46E+05	3.32E-04	1.35E-09	34.8
	hPRLR.mFc	4.07E+05	4.45E-05	1.10E-10	259.3
	mfPRLR.mmh	1.90E+05	5.85E-04	3.08E-09	19.7
H1H6975N	hPRLR.mmh	1.50E+05	7.35E-05	4.90E-10	157.1
	hPRLR.mFc	2.87E+05	1.97E-05	6.84E-11	587.8
	mfPRLR.mmh	1.15E+05	1.31E-04	1.14E-09	88.2
H1H6976N	hPRLR.mmh	5.44E+05	8.64E-04	1.59E-09	13.4
	hPRLR.mFc	1.12E+06	1.01E-04	9.06E-11	114.4
	mfPRLR.mmh	4.66E+05	8.14E-04	1.75E-09	14.2
H1H6762P	hPRLR.mmh	6.92E+05	1.79E-04	2.59E-10	64
	hPRLR.mFc	6.51 E+05	6.45E-05	9.92E-11	179
	mfPRLR.mmh	4.08E+05	2.08E-04	5.11E-10	55
H1H6765P	hPRLR.mmh	9.07E+05	1.13E-04	1.24E-10	102
	hPRLR.mFc	8.69E+05	3.41 E-05	3.92E-11	339
	mfPRLR.mmh	5.27E+05	1.34E-04	2.54E-10	86
H1H6774P	hPRLR.mmh	7.15E+05	8.18E-04	1.14E-09	14
	hPRLR.mFc	7.98E+05	8.94E-05	1.12E-10	129
	mfPRLR.mmh	4.95E+05	8.75E-04	1.77E-09	13
H1H6781P	hPRLR.mmh	2.08E+05	1.27E-04	6.10E-10	91
	hPRLR.mFc	2.57E+05	6.05E-05	2.36E-10	191
	mfPRLR.mmh	1.43E+05	1.41E-04	9.86E-10	82
H1H6782P	hPRLR.mmh	3.60E+05	2.47E-04	6.85E-10	47
	hPRLR.mFc	3.17E+05	7.13E-05	2.25E-10	162
		2.66E+05	2.79E-04	1.05E-09	41

	mfPRLR.mmh				
H1H6783P	hPRLR.mmh	2.88E+05	4.13E-04	1.43E-09	28
	hPRLR.mFc	2.64E+05	8.77E-05	3.32E-10	132
	mfPRLR.mmh	1.89E+05	3.41 E-04	1.81E-09	34
H1H6785P	hPRLR.mmh	3.01 E+05	1.71E-04	5.67E-10	68
	hPRLR.mFc	2.63E+05	6.07E-05	2.31E-10	190
	mfPRLR.mmh	2.27E+05	1.67E-04	7.38E-10	69
H1H6790P	hPRLR.mmh	5.65E+05	7.99E-04	1.41E-09	14
	hPRLR.mFc	5.42E+05	1.04E-04	1.92E-10	111
	mfPRLR.mmh	3.89E+05	7.93E-04	2.04E-09	15
H1H6792P	hPRLR.mmh	3.24E+05	7.94E-04	2.45E-09	15
	hPRLR.mFc	3.03E+05	9.48E-05	3.13E-10	122
	mfPRLR.mmh	2.36E+05	9.83E-04	4.17E-09	12
H1H6793P	hPRLR.mmh	2.35E+05	3.32E-04	1.41E-09	35
	hPRLR.mFc	2.29E+05	7.57E-05	3.31E-10	153
	mfPRLR.mmh	1.77E+05	3.93E-04	2.22E-09	29
H1H6795P	hPRLR.mmh	1.17E+06	1.77E-03	1.52E-09	7
	hPRLR.mFc	1.54E+06	8.41 E-05	5.45E-11	137
	mfPRLR.mmh	8.44E+05	1.97E-03	2.33E-09	6
H1H6797P	hPRLR.mmh	1.13E+06	1.96E-03	1.73E-09	6
	hPRLR.mFc	9.82E+05	1.19E-04	1.22E-10	97
	mfPRLR.mmh	6.70E+05	2.09E-03	3.12E-09	6
H1H6800P	hPRLR.mmh	4.21 E+05	4.09E-04	9.72E-10	28
	hPRLR.mFc	4.73E+05	8.69E-05	1.84E-10	133
	mfPRLR.mmh	3.03E+05	3.80E-04	1.25E-09	30
H1H6801P	hPRLR.mmh	8.46E+05	7.56E-04	8.94E-10	15
	hPRLR.mFc	6.75E+05	1.09E-04	1.61E-10	106
	mfPRLR.mmh	6.57E+05	1.23E-03	1.88E-09	9
H1H6803P	hPRLR.mmh	8.24E+04	1.37E-04	1.67E-09	84
	hPRLR.mFc	1.04E+05	6.29E-05	6.07E-10	184
		6.21 E+04	2.09E-04	3.37E-09	55
	mfPRLR.mmh				
H1H6804P	hPRLR.mmh	4.53E+05	6.34E-04	1.40E-09	18
	hPRLR.mFc	4.51 E+05	8.69E-05	1.93E-10	133
	mfPRLR.mmh	3.31 E+05	6.57E-04	1.99E-09	18
H1H6807P	hPRLR.mmh	7.61 E+05	1.44E-04	1.89E-10	80
	hPRLR.mFc	6.80E+05	5.46E-05	8.03E-11	212
	mfPRLR.mmh	4.37E+05	1.51E-04	3.46E-10	76
Контроль I	hPRLR.mmh	5.11 E+05	7.44E-04	1.46E-09	15.5
	hPRLR.mFc	4.72E+05	7.53E-05	1.59E-10	153.5
	mfPRLR.mmh	2.38E+05	6.14E-03	2.59E-08	1.9

NB=Связывание не наблюдается в условиях эксперимента.

Таблица 4

Определенные на приборе Biacore аффинности связывания Fc человеческих моноклональных антител (mAbs) при 37°C

Связывание при 37°C / Формат захвата антитела

Антитело	Аналит	k_a (Mc^{-1})	k_d (c^{-1})	KD (молярный)	T½(мин)
H1H6953N	hPRLR.mmh	1.10E+06	1.22E-03	1.11E-09	9.4
	hPRLR.mFc	1.47E+06	1.70E-04	1.16E-10	68.0
	mfPRLR.mmh	9.47E+05	2.56E-03	2.71 E-09	4.5
H1H6958N2	hPRLR.mmh	4.13E+05	1.31E-03	3.16E-09	8.8
	hPRLR.mFc	8.29E+05	1.39E-04	1.67E-10	83.3
	mfPRLR.mmh	3.28E+05	1.34E-03	4.08E-09	8.6
H1H6959N2	hPRLR.mmh	4.06E+04	2.77E-02	6.81 E-07	0.4
	hPRLR.mFc	5.09E+05	2.30E-03	4.51 E-09	5.0
	mfPRLR.mmh	4.46E+04	1.65E-02	3.70E-07	0.7
H1H6960N	hPRLR.mmh	1.22E+05	1.98E-03	1.62E-08	5.8
	hPRLR.mFc	2.94E+05	1.47E-04	5.00E-10	78.7
	mfPRLR.mmh	8.64E+04	1.28E-03	1.49E-08	9.0
H1H6966N	hPRLR.mmh	1.58E+06	9.60E-04	6.07E-10	12.0
	hPRLR.mFc	1.88E+06	1.27E-04	6.72E-11	91.3
	mfPRLR.mmh	1.22E+06	1.20E-03	9.82E-10	9.6
H1H6967N	hPRLR.mmh	4.24E+05	9.33E-04	2.20E-09	12.4
	hPRLR.mFc	9.07E+05	9.73E-05	1.07E-10	118.8
	mfPRLR.mmh	3.56E+05	1.62E-03	4.54E-09	7.1
H1H6975N	hPRLR.mmh	2.11 E+05	2.73E-04	1.29E-09	42.3
	hPRLR.mFc	3.86E+05	7.09E-05	1.84E-10	163.0
	mfPRLR.mmh	1.40E+05	3.17E-04	2.27E-09	36.4

H1H6976N	hPRLR.mmh	7.77E+05	3.14E-03	4.04E-09	3.7
	hPRLR.mFc	1.37E+06	1.40E-04	1.02E-10	82.6
	mfPRLR.mmh	6.03E+05	3.16E-03	5.24E-09	3.7
H1H6762P	hPRLR.mmh	9.48E+05	4.55E-04	4.80E-10	25
	hPRLR.mFc	8.01 E+05	1.03E-04	1.28E-10	112
	mfPRLR.mmh	6.79E+05	5.58E-04	8.23E-10	21
H1H6765P	hPRLR.mmh	1.25E+06	3.66E-04	2.92E-10	32
	hPRLR.mFc	8.01 E+05	1.03E-04	1.28E-10	112
	mfPRLR.mmh	1.06E+06	5.37E-05	5.04E-11	215
H1H6774P	hPRLR.mmh	1.07E+06	3.17E-03	2.95E-09	4
	hPRLR.mFc	1.41E+06	1.94E-04	1.38E-10	60
	mfPRLR.mmh	7.23E+05	3.61 E-03	5.00E-09	3
H1H6781P	hPRLR.mmh	3.39E+05	3.09E-04	9.10E-10	37
	hPRLR.mFc	4.36E+05	9.84E-05	2.26E-10	117
	mfPRLR.mmh	2.47E+05	2.67E-04	1.08E-09	43
H1H6782P	hPRLR.mmh	5.57E+05	7.16E-04	1.28E-09	16
	hPRLR.mFc	5.98E+05	1.30E-04	2.17E-10	89
	mfPRLR.mmh	3.85E+05	7.67E-04	1.99E-09	15
H1H6783P	hPRLR.mmh	4.11 E+05	1.61E-03	3.91 E-09	7
	hPRLR.mFc	4.91 E+05	1.38E-04	2.82E-10	83
	mfPRLR.mmh	2.73E+05	1.30E-03	4.74E-09	9
H1H6785P	hPRLR.mmh	4.26E+05	4.84E-04	1.14E-09	24
	hPRLR.mFc	4.56E+05	1.17E-04	2.56E-10	99
	mfPRLR.mmh	2.97E+05	4.50E-04	1.52E-09	26
H1H6790P	hPRLR.mmh	9.40E+05	3.29E-03	3.50E-09	4
	hPRLR.mFc	6.46E+05	1.98E-04	3.06E-10	58
	mfPRLR.mmh	6.15E+05	3.21 E-03	5.22E-09	4

H1H6792P	hPRLR.mmh	4.35E+05	2.29E-03	5.27E-09	5
	hPRLR.mFc	4.99E+05	1.76E-04	3.52E-10	66
	mfPRLR.mmh	3.05E+05	2.86E-03	9.37E-09	4
H1H6793P	hPRLR.mmh	3.39E+05	1.02E-03	3.02E-09	11
	hPRLR.mFc	4.10E+05	1.42E-04	3.47E-10	81
	mfPRLR.mmh	2.33E+05	1.07E-03	4.59E-09	11
H1H6795P	hPRLR.mmh	1.36E+06	5.20E-03	3.81 E-09	2
	hPRLR.mFc	1.94E+06	7.77E-05	4.02E-11	149
	mfPRLR.mmh	9.73E+05	5.99E-03	6.16E-09	2
H1H6797P	hPRLR.mmh	1.29E+06	8.22E-03	6.37E-09	1
	hPRLR.mFc	1.80E+06	1.25E-04	6.91E-11	93
	mfPRLR.mmh	9.14E+05	9.06E-03	9.90E-09	1
H1H6800P	hPRLR.mmh	8.08E+05	1.19E-03	1.47E-09	10
	hPRLR.mFc	6.44E+05	1.47E-04	2.29E-10	79
	mfPRLR.mmh	4.39E+05	1.09E-03	2.48E-09	11
H1H6801P	hPRLR.mmh	9.51 E+05	4.41 E-03	4.63E-09	3
	hPRLR.mFc	7.93E+05	2.21 E-04	2.79E-10	52
	mfPRLR.mmh	7.11 E+05	7.71 E-03	1.08E-08	1
H1H6803P	hPRLR.mmh	1.29E+05	3.64E-04	2.83E-09	32
	hPRLR.mFc	1.34E+05	6.20E-05	4.61E-10	186
	mfPRLR.mmh	8.73E+04	6.36E-04	7.28E-09	18
H1H6804P	hPRLR.mmh	6.07E+05	3.85E-03	6.34E-09	3
	hPRLR.mFc	5.54E+05	2.05E-04	3.69E-10	56
	mfPRLR.mmh	4.55E+05	4.26E-03	9.35E-09	3
H1H6807P	hPRLR.mmh	1.08E+06	3.36E-04	3.10E-10	34
	hPRLR.mFc	1.22E+06	1.10E-04	9.00E-11	105
	mfPRLR.mmh	8.02E+05	3.59E-04	4.48E-10	32

Контроль I	hPRLR.mmh	5.99E+05	2.42E-03	4.04E-09	4.8
	hPRLR.mFc	8.47E+05	2.14E-04	2.53E-10	54.0
	mfPRLR.mmh	1.53E+05	1.54E-02	1.01E-07	0.8

NB=Связывание не наблюдается в условиях эксперимента.

Как показано в табл. 3 и 4, для нескольких антител согласно изобретению аффинность к человеческому и обезьяньему белкам PRLR находится в субнаномолярном диапазоне и аффинность превышает аффинность контрольного антитела к PRLR (контроль I). Например, при 37°C многие антитела к PRLR согласно изобретению связывались с мономерным человеческим согласно настоящему изобретению при значениях K_D менее 4 нМ и времени $T^1/_2$, превышавшем 5 мин, и с димерным человеческим PRLR при значениях K_D менее 250 пМ и времени $T^1/_2$, превышавшем 60 мин. Эти характеристики связывания существенно лучше наблюдавшихся для контрольного антитела I в тех же экспериментальных условиях.

Пример 4A. Антитела к PRLR связываются с клеточными линиями, в которых происходит эндогенная сверхэкспрессия PRLR.

Далее определяли способность антител к PRLR выборочно связываться с клеточными линиями, экспрессирующими PRLR. С помощью метода трансфекции, опосредованной Lipofectamine 2000, в клетки HEK293 были стабильно введены конструкции человеческого, обезьяньего Macaca fascicularis и мышиного PRLR с меткой HA. Трансфектанты (HEK293/hPRLR, HEK293/mfPRLR и HEK293/mPRLR) отбирали в течение по крайней мере 2 недель в полной ростовой среде плюс G418.

Экспрессию рецептора пролактина на поверхности клеток 293/hPRLR оценивали методом FACS. Вкратце 1×10^5 клеток инкубировали в присутствии контрольного антитела I в концентрации 10 мкг/мл или контроля изотипа в течение 30 мин на льду в буфере для разбавления антител. После двух промывок буфером для разбавления антитела клетки инкубировали в присутствии PE, конъюгированного с вторичными антителами к человеческим антителам в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин на льду. После двух дополнительных промывок образцы были пропущены через цитометр Hypercyt® и проанализированы в ForeCyt™ (IntelliCyt, Альбукерке, Нью-Мексико). Средние интенсивности флуоресценции (CHO; MFI) выражали как кратное изменение выше уровней контроля изотипа (фона). Связывание FACS подтвердило, что контрольное антитело I селективно связалось с клетками, экспрессирующими 293/hPRLR, при СИФ, 30-кратно превышающей фона (контроль изотипа) и менее чем 2-кратным связыванием на родительских клетках.

Было также количественно определено количество копий PRLR на клеточной поверхности клеточных линий T47D, MCF7 и MCF7/hPRLR со сверхэкспрессией PRLR. Вкратце 1×10^5 клеток инкубировали в присутствии антитела к PRLR H1H6953N-Alexa647 в концентрации 100 нМ в течение 30 мин на льду в буфере для разбавления антител. После двух промывок буфером для разбавления антитела клетки инкубировали в присутствии PE, конъюгированного с вторичными антителами к человеческим антителам в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин на льду. После двух дополнительных промывок образцы пропускали через цитометр Hypercyt® и анализировали в ForeCyt™ (IntelliCyt, Альбукерке, Нью-Мексико). Полученное для каждой клеточной линии значений СИФ преобразовывали в молекулы эквивалентного растворимого флуорохрома (MESF) Alexa647, используя набор QuantumAlexaFluor647 MESF согласно инструкциям производителя (Bangs Laboratories, Inc, Фишерс, Индиана). Для определения среднего числа флуорофоров из расчета на белок H1H6953N-A647 (отношение F/P) использовали комплект антител к человеческому IgG Simply Cellular anti-Human IgG человека согласно инструкциям производителя (Bangs Laboratories, Inc, Фишерс, Индиана). Значения MESF делили на отношение F/P для определения количества копий PRLR на клеточной поверхности или для определения антигенсвязывающей способности H1H6953N на каждой клеточной линии. С помощью этого метода для разных клеточных линий было определено приблизительное количество копий PRLR на клеточной поверхности: T47D=27,000; MCF7=3,000; и MCF7/hPRLR=190,000.

Далее антитела к PRLR согласно настоящему изобретению были испытаны методом FACS на селективное связывание с генно-инженерными клеточными линиями HEK293, характеризующимися сверхэкспрессией PRLR, с клеточными линиями HEK293, не экспрессирующими PRLR, и с наивной клеточной линией, экспрессирующей PRLR (T47D). Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5

Связывание антител к PRLR на клеточной поверхности, определенное методом FACS

Связывание клеток, определенное методом FACS (кратность относительно фона)

Антитело	HEK293	HEK293/ hPRLR	HEK293/ mfPRLR	HEK293/ mPRLR	T47D
Без окрашивания	1	1	1	1	1
Только вторичные антитела	1	1	1	1	1
Контроль 1	1	31	13	7	30
*H1H6762P	1	36	26	2	38
*H1H6765P	2	38	27	1	40
H1H6774P	1	1	29	1	39
*H1H6781P	1	37	26	1	40
H1H6782P	3	41	32	4	43
*H1H6783P	1	37	27	1	38
*H1H6785P	1	37	26	2	40
*H1H6790P	1	37	24	1	34
*H1H6792P	1	37	28	3	37
H1H6793P	2	2	32	2	43
H1H6795P	1	1	22	1	34
H1H6797P	1	1	25	2	38
*H1H6800P	1	35	29	1	41
H1H6801P	7	47	88	56	45
*H1H6803P	1	39	28	1	39
H1H6804P	1	1	29	1	34
*H1H6807P	2	32	27	2	34
*H1H6953N	2	37	29	2	40
*H1H6958N2	1	35	30	1	37
H1H6959N2	1	6	11	2	9
*H1H6960N	1	29	23	1	33
*H1H6966N	1	29	18	1	31
*H1H6967N	1	38	28	2	41
*H1H6975N	1	38	29	1	46
H1H6976N	1	8	29	1	37
Изотип контр. I	1	1	1	1	Н/Д
Изотип контр.II	1	1	Н/Д	Н/Д	1

* Обозначает антитела со специфичным связыванием с клеточными линиями HEK293/hPRLR, HEK293/mfPRLR и T47D и менее чем 2-кратное повышение связывания с родительскими клетками HEK293.

Как показано в табл. 5, большинство антител к человеческому специфически связались с клетками HEK293/PRLR при >25-кратном превышении фонового уровня при несущественном связывании с родительской линией. Антитела, связавшиеся с человеческим рецептором пролактина, аналогичным образом связывались с обезьяньим (macaca fasciculahs) PRLR на клетках HEK293/mfPRLR. Антитела, прочно связывавшиеся с клетками HEK293/hPRLR, аналогичным образом устойчиво связывались с PRLR на клетках T47D с нативной экспрессией PRLR. Перекрестная реактивность с PRLR грызунов не наблюдалась.

Подводя итог, антитела согласно настоящему изобретению продемонстрировали прочное связывание с человеческим и обезьяньим рецептором пролактина на инженерных клеточных линиях и также с эндогенно экспрессируемым PRLR.

Пример 4B. Антитела к PRLR подвергаются in vitro интернализации клетками, экспрессирующими PRLR.

В этом примере оценивали интернализацию антител к PRLR клеткам, экспрессирующим рецептор пролактина (T47D). Вкратце 20000 клеток T47D были засеяны на покрытый коллагеном 96-луночный планшет. На следующий день клетки инкубировали совместно с антителами к человеческому PRLR-антителами (в концентрации 10 мкг/мл) в течение 30 мин на льду с последующими двумя промывками фосфатно-солевым буферным раствором (PBS). Далее клетки инкубировали на льду в течение 30 мин с вторичными антителами к hFcFab, конъюгированными с alexa488, с последующими двумя дополнительными промывками PBS. Для интернализации антитела помещали на 1 ч в буфер для интернализации при 37°C (PBS +2% FBS) или оставили при 4°C. Клетки были зафиксированы в 4% формальдегиде, ядра окрашивали реактивом DRAQ5 (клеточный сигнал) и получали изображения на приборе ImageXpress microXL (Molecular Devices). Для определения интенсивности окрашивания цельных клеток с alexa488 при 37°C (связывание) и интенсивности окрашивания с alexa488 во внутриклеточных везикулах при 37°C (интернализация) использовали программное обеспечение для анализа изображений Columbus (Perkin Elmer). В табл. 6 показаны значения интенсивности окрашивания, выраженные в процентах от

антитела H1H6975N, продемонстрировавшего самую высокую степень интернализации.

Таблица 6

Клеточная линия: T47D [mAb] 1мкг/мл (0.67 нМ)		
Антитело	**% от интернализации по сравнению с контрольным 1 антителом I**	**% от общего связывания по сравнению с контрольным антителом I**
Контрольное антитело к PRLR I	**100.0**	**100.0**
H1H6975N	214.2	225.9
H1H6800P	198.3	186.8
H1H6803P	190.5	205.5
H1H6762P	186.3	176.7
H1H6765P	186.3	191.3
H1H6793P	179.9	177.9
H1H6782P	179.3	209.9
H1H6976N	169.5	180.4
H1H6785P	169.1	168.0
H1H6958N2	169.0	161.5
H1H6967N	168.6	158.6
H1H6781P	165.1	166.2
H1H6774P	162.3	173.7
H1H6783P	160.7	165.8
H1H6792P	155.9	110.6
H1H6953N	153.9	164.2
H1H6795P	150.7	123.4
H1H6801P	148.9	155.7
H1H6807P	147.0	152.7
H1H6790P	146.9	122.8
H1H6797P	145.2	151.2
H1H6804P	138.9	149.6
H1H6966N	137.2	111.3
H1H6960N	120.0	89.7
H1H6959N2	15.3	2.0

За исключением H1H6959N2 все протестированные антитела связывались с T47D и почти 100% от всех связавшихся mAbs были интернализованы в течение 1 ч. Общая интенсивность окрашивания интернализованных антител для большинства антител была выше, чем для контрольного антитела к человеческому PRLR (контроль I).

Пример 5. Антитела к PRLR подавляют опосредованную пролактином активацию рецептора в клетках, экспрессирующих человеческий PRLR.

Для исследования способности антител к PRLR блокировать опосредованную пролактином (PRL) активацию рецептора использовали анализ репортерного гена люциферазы. Эндокринный гормон пролактин связывается с внеклеточным доменом когнатного рецептора PRLR, инициируя быструю гомодимеризацию и активируя несколько нисходящих сигнальных каскадов.

В этом примере инженерную клеточную линию использовали для определения способности антител к PRLR блокировать активацию лиганда рецептора пролактина. Вкратце посредством последовательных циклов Lipofectamine® 2000-опосредованной трансфекции были созданы клеточные линии HEK293/hPRLR/STAT5-Luc со стабильным включением кассетной конструкции, экспрессирующей человеческий PRLR и STAT5-зависимого репортера люциферазы (LifeTechnologies, Карлсбад, Калифорния). Клетки отбирали в течение по крайней мере двух недель в присутствии G418 (hPRLR) в концентрации и гигромицина B в концентрации 100 мкг/мл (STAT5-Luc). При проведении количественного анализа STAT5-Luc использовали 2×10^5 клеток HEK293/hPRLR/STAT5-Luc, засеянных в полную ростовую среду в 96-луночном планшете с PDL-покрытием, которые выращивали в течение ночи при 37°C и 5% CO_2. Для построения кривых ингибирования антител клетки инкубировали (в течение 6 ч при 37°C) в присутствии серийно разбавленных антител к человеческому PRLR (от 100 нМ до 24 пМ) в присутствии постоянного пролактина с концентрацией 5 нМ до регистрации сигнала. Кривые зависимости эффекта от дозы пролактина получали при добавлении к клеткам серийно разбавленного пролактина (в концентрации от 100 нМ до 24 пМ) и регистрации сигнала после 6-часовой инкубации (37°C) в отсутствие антител. Также оценивали способность антител активировать рецептор пролактина в отсутствие лиганда.

Для измерения активности люциферазы использовали реактив ONE-Glo™ (Promega, Мадисон, W1). Относительные световые единицы (OCE; RLU) были измерены на люминометре Victor (Perkin Elmer, Шелтон, Коннектикут). Для определения значений EC_{50}/IC_{50} на приборе GraphPad Prism использовали 4-параметрическое логистическое уравнение и построенную по 8 точкам кривую ответа. Показаны процент блокирования и процент активации для самой высокой дозы антитела. Результаты показаны в табл. 7.

Таблица 7

IC_{50} и процент блокирования опосредованного PRL сигнала антителами к PRLR

Антитело	IC_{50} блокирования 5 нМ PRL [M]	Процент блокирования при дозе антитела 100 нМ
H1H6762P	2.19E-11	100
H1H6765P	3.30E-11	100
H1H6774P	NB	0
H1H6781P	2.70E-11	100
H1H6782P	NB	0
H1H6783P	ND	59
H1H6785P	3.45E-10	100
H1H6790P	2.06E-10	100
H1H6792P	5.70E-10	100
H1H6793P	ND	65
H1H6795P	NB	0
H1H6797P	NB	0
H1H6800P	3.55E-10	100
H1H6801P	1.40E-10	100
H1H6803P	6.27E-10	100
H1H6804P	7.89E-09	100
H1H6807P	6.00E-10	100
H1H6953N	1.05E-10	100
H1H6958N2	1.98E-10	100
H1H6959N2	ND	52
H1H6960N	1.58E-09	100
H1H6966N	ND	54
H1H6967N	7.68E-10	100
H1H6975N	2.41E-10	100
H1H6976N	ND	23
Контроль I	1.33E-09	100

NB: блокирование отсутствовало;

ND: не определено из-за неполного блокирования.

Как показано в табл. 7, большинство антител согласно настоящему изобретению блокировали активацию репортера STAT5 при значениях IC_{50} в диапазоне от 22 пМ до 8 нМ. Все ингибирующие антитела блокировали активацию до исходных уровней (блокирование составило 100%). Кроме того, антитела, протестированные с помощью этого анализа, не активировали STAT5 в отсутствие лиганда PRL.

Подводя итоги, данные этого примера демонстрируют, что большинство антител к PRLR согласно изобретению блокируют опосредованную пролактином активацию рецептора. Кроме того, большинство антител ингибируют активацию рецептора более эффективно, чем контрольные антитела к PRLR I. Например, несколько антител к PRLR согласно настоящему изобретению блокировали опосредованный пролактином сигнал при IC_{50} менее приблизительно 1,3 нМ. С другой стороны, некоторые другие антитела к PRLR согласно изобретению несмотря на способность связывать рецептор пролактина не проявили блокирующую пролактин активность. Такое отсутствие блокирования со стороны антител к PRLR может найти использование в различных терапевтических ситуациях, в которых желательно направленное взаимодействие с рецептором пролактина без нарушения нормальной передачи сигнала с участием пролактина.

Пример 6. Получение и определение характеристик конъюгатов антитела к PRLR с лекарственным средством.

Отобранные антитела к PRLR были конъюгированы с майтанзиноидом DM1 через линкер SMCC с использованием способов, изложенных в патенте США № 5208020 и заявке на патент США № 2010/0129314. Конъюгаты были очищены методом гель-хроматографии и подвергнуты стерилизующему фильтрованию. Все исходные материалы и растворители были приобретены у коммерческих поставщиков и использовались без очистки, если не указано иное.

Для определения концентрации белка и линкера/полезной нагрузки использовали спектральный анализ в УФ-диапазоне и масс-спектрометрию MALDI-TOF. Гель-хроматография показала, что все используемые конъюгаты на >95% являлись мономерными, и ВЭЖХ с обращенной фазой показала, что содержание неконъюгированной линкерной полезной нагрузки составляет <0,5%. Результаты в пересчете на белок показаны в табл. 8 и 9. Все конъюгированные антитела были проанализированы с использованием УФ-спектрофотометра для определения значений линкерной полезной нагрузки в соответствии с

Hamblett et al., 2004, Clinical Cancer Research, 10(20):7063-7070 и посредством определения разности масс, нативной по сравнению с массой конъюгата.

Таблица 8

Концентрации белка в неконъюгированных антителах к PRLR

Соединение	**ε252 нм ($см^{-1} М^{-1}$)**	**ε280 нм ($см^{-1} М^{-1}$)**
SMCC-DM1	26790	5700
Антитело (неконъюгированное)	**ε252 нм ($см^{-1} М^{-1}$)**	**ε280 нм ($см^{-1} М^{-1}$)**
H1H6958N2	74462	195440
H1H6959N2	77485	209420
H1H6960N	84926	214460
H1H6953N	80673	220420
H1H6975P	81120	199804
Контроль изотипа	84723	218360

Таблица 9

Концентрации полезной нагрузки/антитела с линкером для конъюгатов, образованных антителом к PRLR и SMCC-DM1

Конъюгат антитела	**Полезная нагрузка: антитело молярное отношение (УФ)**	**Полезная нагрузка: антитело молярное отношение (МС)**	**Выход %**
H1H6958N2-DM1	4.0	3.4	64
H1H6959N2-DM1	3.8	3.3	64
H1H6960N-DM1	3.6	3.0	64
H1H6953N-DM1	3.2	2.7	52
H1H6803P-DM1	ND	3.1	55
H1H6762P-DM1	ND	2.9	70
H1H6765P-DM1	ND	2.3	55
H1H6782P-DM1	ND	2.8	65
H1H6793P-DM1	ND	3.8	55
H1H6975P-DM1	3.0	3.4	60
H1H6800P-DM1	3.0	3.2	50
Контроль изотипа-DM1	3.3	3.3	80

ND: не определено.

Этот пример иллюстрирует конъюгацию антител к PRLR согласно настоящему изобретению с DM1 через линкер SMCC. Было рассчитано молярное отношение полезной нагрузки к антителу, составившее для конъюгированных антител по этому примеру от приблизительно 2,3 до приблизительно 3,8 для конъюгированных антител согласно данному примеру. Выраженный в процентах выход антител согласно изобретению составил приблизительно 50-70%.

Пример 7. Конъюгаты антитела к PRLR с лекарственным средством эффективно уничтожают клетки с низкими или умеренными уровнями экспрессии PRLR и также клетки с высоким уровнем экспрессии PRLR.

Чтобы определить относительную киллерную активность ADC, содержащих антитела к PRLR, по сравнению со сходными ADC, содержащими антитела к ErbB2, был проведен анализ киллинга клеток, принадлежащих к нескольким клеточным линиям, экспрессирующим PRLR, ErbB2 или оба рецептора.

Для оценки способности конъюгированных антител к PRLR снижать жизнеспособность клеток были получены клетки с повышенным уровнем экспрессией рецептора пролактина, включая HEK293, PC3, MCF7 и NCI-N87, были сгенерированы. Для сравнения были получены также клетки PC3 и T47D с повышенным уровнем экспрессии ErbB2 и клеточная линия MCF7, характеризуемая повышенной экспрессией рецепторов hPRLR и hErbB2. Вкратце, для того чтобы создать клетки HEK293, экспрессирующие человеческий PRLR (HEK293/hPRLR) или человеческий рецептор ErbB2 (HEK293/hErbB2), использова-

ли методологию трансфекции, опосредованной Lipofectamine® 2000. Для получения клеток PC3, экспрессирующих человеческий PRLR (PC3/hPRLR) или человеческий рецептор ErbB2 (PC3/hErbB2), использовали Lipofectamine LTX с Реагентом Плюс. Для получения клеток MCF7, экспрессирующих человеческий PRLR (MCF7/hPRLR), клеток NCI-N87, экспрессирующих человеческий PRLR (NCI-N87/hPRLR), клеток T47D с повышенным уровнем экспрессии человеческого ErbB2 (T47D/hErbB2) и клеток MCF7, экспрессирующих человеческий PRLR и человеческий ErbB2 (MCF7/hPRLR/hErbB2), использовали опосредованную лентивирусом трансдукцию. Селекцию всех линий проводили в течение по крайней мере 2 недель в полной ростовой среде с добавлением соответствующих реактивов для отбора. Популяции со стабильной экспрессией обогащали для экспрессии PRLR посредством FACS с использованием контрольного антитела к PRLR I.

Для анализа экспрессии рецепторов PRLR и ErbB2 на клеточной поверхности клеток использовали FACS и контрольное антитело к PRLR I или контрольное антитело к HER2 II соответственно. Кроме того, была определена эндогенная экспрессия PRLR на клеточной поверхности линии T47D#11, варианта линии T47D, отобранной, как продемонстрировавшей наиболее агрессивный опухолевый рост in vivo. Приблизительно 1×10^6 клеток инкубировали в присутствии контрольного антитела к PRLR I в концентрации 10 мкг/мл (контроль I), контрольного антитела к ErbB2 II (контроль II), или изотипа контроля в течение 30 мин на льду в буфере для разбавления антител. После двух промывок буфером для разбавления антитела клетки инкубировали в присутствии PE, конъюгированного с вторичными антителами к человеческим антителам в концентрации 10 мкг/мл в течение 30 мин на льду. После двух дополнительных промывок образцы пропускали через цитометр AccuriC6 (BD) с программным обеспечением FlowJo (TreeStar, Inc., Ашленд, Орегон). Результаты, отражающие относительную экспрессию, показаны в табл. 10.

Таблица 10

Экспрессия человеческого рецептора пролактина на клеточной поверхности (эндогенные и инженерные клеточные линии)

Клеточная линия	**Определение связывания методом FACS (кратность СИФ относительно контроля изотипа)**				
	Без окрашивания	**Вторичное антитело**	**Контроль изотипа**	**Антитело к PRLR (Контроль I)**	**Антитело к ErbB2 (Контроль II)**
293	1X	1X	1X	1X	28X
293/hErbB2	1X	1X	1X	1X	215X
293/hPRLR	1X	1X	1X	18X	18X
PC3	1X	1X	1X	1X	41X
PC3/hErbB2	1X	1X	1X	1X	238X
PC3/hPRLR	1X	1X	1X	13X	31X
T47D	1X	1X	1X	12X	87X
T47D#11	1X	1X	1X	10X	ND
T47D/hErbB2	1X	1X	1X	12X	437X
SK-BR-3	1X	1X	1X	1X	600X
MCF7	1X	1X	1X	3X	42X
MCF7/hPRLR	1X	1X	1X	55X	36X
MCF7/hPRLR/hErbB2	1X	1X	1X	55X	349X
NCI-N87	1X	1X	1X	1X	1,400X
NCI-N87/hPRLR	1X	1X	1X	6X	1,400X

В целом поверхностная экспрессия экзогенного PRLR варьировала от 6-кратного до 55-кратного превышения фона, большинство инженерных клеток продемонстрировали 12-18-кратный уровень экспрессии рецептора пролактина по сравнению с фоном. Экспрессия эндогенного PRLR 3-кратно превышала фоновое значение в клетках MCF7, но не обнаруживалась в родительских линиях HEK293, PC3 и NCI-N87. Экспрессия эндогенного PRLR была 12-кратно превышала фоновые значения в клеточной линии T47D и 10-кратно в варианте клеточной линии T47D#11. Экспрессия ErbB2 была обнаружена во всех клеточных линиях, экспрессирующих PRLR, и 18-1400-кратрно превышала фоновое значение.

Далее, способность конъюгата с лекарственным средством, содержащего антитело к PRLR и DM1 антитела (т.е. антитела к PRLR, конъюгированного с DM1 через нерасщепляемый линкер (SMCC)) уменьшать жизнеспособность клетки определяли с помощью клеточного анализа in vitro. 96-Луночные планшеты с PDL-покрытием засеивали клетками по 1500-10000 клеток в лунке и выращивали в полной ростовой среде в течение ночи. Для построения кривых жизнеспособности клеток к клеткам добавляли ADC или свободный DM1 (в форме метилдисульфидного производного DM1-SMe) до конечных концентраций от 500 нМ до 5 пМ и инкубировали в течение 3 суток. Клеточные линии 293, PC3 и T47D в течение последних 1-3 ч инкубировали в присутствии CCK8 (Dojindo, Роквилль, Мэриленд) и определяли

оптическую плотность при длине волны 450 нМ (OD_{450}) на приборе Flexstation3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Клетки MCF7 обрабатывали красителем для ядер клеток Hoechst33342 и фиксировали 4% формальдегидом. Изображения получали на приборе ImageXpress micro XL (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния) и для подсчета ядер использовали программное обеспечение для анализа изображений Columbus Image (Perkin Elmer, Шелтон, Коннектикут). Из значений, полученных для всех лунок, вычитали фоновые значения OD_{450} (PC3, 293, и T47D) или количество ядер (MCF7) в клетках, обработанных дигитонином (40 нМ), и жизнеспособность клеток выражали в процентах от значений, полученных для необработанных контрольных образцов. Для определения значений IC_{50} использовали 4-параметрическое логистическое уравнение и построенную по 10 точкам кривую ответа (GraphPad Prism). Значения IC_{50} и проценты уничтоженных клеток показаны в табл. 11 и 12.

Таблица 11

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных антителом к PRLR и лекарственным средством DM1

Конъюгат антитела с лекарственным средством	293		293/PRLR		PC3		PC3/PRLR	
	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения
DM1 (свободное лекарство)	0.27	98	0.36	97	0.47	91	0.59	80
H1H6953N-DM1	100	88	0.28	95	110	78	0.86	67
H1H6958N2-DM1	75	98	0.10	95	150	83	0.43	83
H1H6959N2-DM1	75	100	4.82	95	150	79	11.6	82
H1H6960N-DM1	75	100	0.38	95	150	80	1.13	82
H1H6975N-DM1	100	87	ND	ND	200	71	2.70	68
H1H6762P-DM1	100	89	ND	ND	250	78	0.98	66
H1H6765P-DM1	100	86	ND	ND	200	70	0.57	70
H1H6782P-DM1	100	86	ND	ND	300	67	0.92	64
H1H6793P-DM1	100	84	ND	ND	200	72	3.65	65
H1H6800P-DM1	150	85	ND	ND	150	72	1.37	68
H1H6803P-DM1	300	7	ND	ND	150	72	2.32	70
Контроль I-DM1	100	92	0.28	95	>100	79	7.28	80
Изотип контр.-DM1	100	60	100	93	125	78	110	63

Значения IC_{50} показаны в нМ;
ND: не определено.

Таблица 12

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных антителом к PRLR и лекарственным средством DM1

Конъюгат антитела с лекарственным средством	T47D		MCF7		MCF7/PRLR	
	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения
DM1 (свободное лекарство)	0.45	86	1.17	83	1.47	88
H1H6953N-DM1	1.64	79	100	55	0.29	76
H1H6958N2-DM1	1.34	71	100	77	0.19	77
H1H6959N2-DM1	48.90	71	100	82	0.47	80
H1H6960N-DM1	5.10	71	100	77	0.29	78
H1H6975N-DM1	6.90	80	150	73	0.49	87
H1H6762P-DM1	12.60	80	110	64	0.46	83
H1H6765P-DM1	1.63	78	150	68	0.18	84
H1H6782P-DM1	4.19	74	120	57	0.65	85
H1H6793P-DM1	11.10	53	125	67	0.54	87
H1H6800P-DM1	3.20	79	150	65	0.40	85
H1H6803P-DM1	8.61	77	150	60	0.44	84
Контроль I-DM1	24.50	65	100	46	0.59	75
Изотип контр.-DM1	150	61	120	66	100	84

Значения IC_{50} показаны в нМ.

Как показано в табл. 11 и 12, несколько конъюгатов, образованных антителом к PRLR и DM1, эффективно снижали жизнеспособность клеток при многочисленных фоновых показателях при низких IC_{50}, составляющих всего 100 пМ. Иллюстративное конъюгированное антитело к PRLR, H1H6958N2-DM1, снижало жизнеспособность клеток HEK293, PC3 и MCF7, экспрессирующих рецептор пролактина, при IC_{50} в субнаномолярном диапазоне от 100 до 460 пМ, и обеспечивало уничтожение клеток T47D с эндогенной экспрессией PRLR при IC_{50}=1,3 нМ. Аналогично контрольное конъюгированное антитело к PRLRI (контроль I-DM1) лишь в несколько раз превосходило по активности H1H6958N2-DM1 во всех клеточных линиях. Незаслепленные контроли по изотипу и неконъюгированные антитела не оказывали влияния на жизнеспособность клетки.

Дополнительно в клеточной линии T47D оценивали влияние лиганда рецептора пролактина, PRL, на уничтожение клеток конъюгатом PRLR-SMCC-DM1. Клетки T47D инкубировали одновременно с PRL (в концентрации 15 нМ) и либо не блокирующим антителом к PRLR (H1H6782P), либо с антителом, блокирующим рецептор (H1H6958N2). Результаты показаны в табл. 13.

Таблица 13

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных антителом к PRLR и лекарственным средством DM1, в присутствии лиганда PRLR (PRL)

	HEK293		**T47D**	
Обработка	**IC_{50} (нМ)**	**% уничтожения**	**IC_{50} (нМ)**	**% уничтожения**
Me-SS-May Свободный DM1	0.6	94	0.30	100
Контроль изотипа-SMCC-DM1	100	78	300	94
Контроль изотипа-SMCC-DM1 +15nMPRL	170	82	97	89
H1H6958N2-SMCC-DM1	90	88	1.0	100
H1H6958N2-SMCC-DM1 +15nMPRL	110	86	3.0	100
H1H6782P-SMCC-DM1	90	83	1.0	98
H1H6782P-SMCC-DM1 + 15nM PRL	70	78	2.0	97

Как показано в табл. 13, присутствие PRL оказало лишь незначительное влияние на уничтожение клеток, опосредованное конъюгатом антитела к PRLR с лекарственным средством; наблюдалось 2-3-кратное снижение эффективности уничтожения клеток протестированными моноклональными антителами.

Выполнена оценка активности конъюгированных антител к PRLR по сравнению с аналогичными конъюгированными антителами ErbB2, коэкспрессируемыми на клеточной поверхности. Оба рецептора, PRL и ErbB2, экспрессируются большинством злокачественных опухолей молочной железы, и конъюгаты, образованные антителом к ErbB2 и DM1, продемонстрировали клиническую эффективность при направленном воздействии на ErbB2(+) клетки рака молочной железы (Hurvitz et al., 2013). Контрольное антитело к ErbB2 (контроль II), конъюгированное с DM1 (контроль II-DM1), было изучено в in vitro анализе жизнеспособности клеточных линий, полученных, как описано выше. В табл. 14-17 показана эффективность уничтожения клеток конъюгированными антителами к PRLR по сравнению с конъюгированными антителами к ErbB2.

Таблица 14

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных лекарственным средством DM1 и антителом к PRLR и лекарственным средством DM1 и антителом к ErbB2

Конъюгат антитела с лекарственным средством	**293**		**293/ErbB2**		**293/PRLR**	
	IC_{50}	**% уничтожения**	**IC_{50}**	**% уничтожения**	**IC_{50}**	**% уничтожения**
DM1 (свободное лекарство)	0.5	95	0.26	100	0.82	95
H1H6953N-DM1 (антитело к PRLR-DM1)	100	92	120	98	0.43	93
Контроль II-DM1 (антитело к ErbB2-DM1)	100	89	2.0	98	100	88
Контроль изотипа-DM1	150	86	110	98	150	86
Экспрессия PRLR	1X		1X		18X	
Экспрессия ErbB2	28X		215X		18X	

Значения IC_{50} показаны в нМ.

Таблица 15

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных лекарственным средством DM1 и антителом к PRLR и лекарственным средством DM1 и антителом к ErbB2 (продолжение)

Конъюгат антитела с лекарственным средством	**PC3**		**PC3/ErbB2**		**PC3/PRLR**	
	IC_{50}	**% уничто-жения**	**IC_{50}**	**% уничто-жения**	**IC_{50}**	**% уничто-жения**
DM1 (свободное лекарство)	0.44	88	0.42	85	0.24	82
H1H6953N-DM1 (антитело к PRLR-DM1)	100	80	80	73	0.68	76
Контроль II-DM1 (антитело к ErbB2-DM1)	90	80	1.1	80	100	62
Контроль изотипа-DM1	85	82	90	71	100	62
Экспрессия PRLR	1X		1X		13X	
Экспрессия ErbB2	41X		238X		31X	

Значения IC_{50} показаны в нМ.

Таблица 16

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных лекарственным средством DM1 и антителом к PRLR и лекарственным средством DM1 и антителом к ErbB2 (продолжение)

Конъюгат антитела с лекарственным средством	T47D		T47D/ErbB2		SK-BR-3		MCF7	
	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения	IC_{50}	% уничтожения
DM1 (свободное лекарство)	0.21	80	0.18	71	0.39	74	0.54	78
H1H6953N-DM1 (антитело к PRLR-DM1)	1.3	78	2.4	80	100	77	82	74
Контроль II-DM1 (антитело к ErbB2-DM1)	100	59	1.18	81	0.48	81	80	68
Контроль изотипа-DM1	100	62	120	75	110	76	100	65
Экспрессия PRLR	12X		12X		1X		3X	
Экспрессия ErbB2	87X		437X		600X		42X	

Значения IC_{50} показаны в нМ.

Таблица 17

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных лекарственным средством DM1 и антителом к PRLR и лекарственным средством DM1 и антителом к ErbB2 (продолжение)

Конъюгат антитела с лекарственным средством	**MCF7/PRLR**		**MCF/PRLR +ErbB2**		**NCI-N87**		**NCI-N87/PRLR**	
	IC_{50}	**% уничтожения**	**IC_{50}**	**% уничтожения**	**IC_{50}**	**% уничтожения**	**IC_{50}**	**% уничтожения**
DM1 (свободное лекарство)	1.85	79	0.82	77	0.84	95	1.45	98
H1H6953N-DM1 (антитело к PRLR-DM1)	0.33	76	0.33	77	90	83	2.9	94
Контроль II-DM1 (антитело к ErbB2-DM1)	100	56	0.63	76	0.22	95	0.66	94
Контроль изотипа-DM1	150	61	100	70	90	85	85	88
Экспрессия PRLR	55X		55X		1X		6X	
Экспрессия ErbB2	36X		349X		1400X		1400X	

Значения IC_{50} показаны в нМ.

Конъюгаты антител к PRLR-DM1 эффективно уничтожали клетки даже при относительно низких уровнях экспрессии PRLR. Например, антитело H1H6953N-DM1 (антитело к PRLR-DM1) подавляло рост клеток T47D (с уровнем экспрессии PRLR лишь 12-кратно превышавшим фон) при IC_{50}=1,3 нМ и обеспечило уничтожение 78% клеток. Это же антитело подавляло рост клеток 293/hPRLR (с уровнем экспрессии PRLR лишь 18-кратно превышавшим фон) при IC_{50}=0,43 нМ и обеспечило уничтожение 93% клеток. Эквивалентное уничтожение клеток конъюгатом DM1 с антителом к ErbB2 (контроль II) наблюдалось только в клетках с уровнем экспрессии рецептора, 200-400-кратно превышавшим фоновый уровень (см., например, линию PC3/hErbB2 с уровнем экспрессии ErbB2, 238-кратно превышающим фоновую экспрессию, и линию T47D/hErbB2 с уровнем экспрессии ErbB2, 437-кратно превышающим фоновую экспрессию). Таким образом, эти данные указывают на способность конъюгатов, образованных антителом к PRLR и лекарственным средством, оказывать эффективное направленное воздействие и уничтожать опухолевые клетки с относительно низким уровнем экспрессии PRLR, в то время как конъюгаты, образованные антителом к ErbB2 и лекарственным средством, эффективны только против опухолей с очень высокими уровнями экспрессии ErbB2.

Наконец, было выполнено сравнение активности конъюгатов антител к PRLR, связанных с DM1 через нерасщепляемый линкер SMCC, с активностью конъюгатов антител к PRLR, связанных с MMAE через расщепляемый линкер: mc-vc-PAB (поставщик Concortis, Сан-Диего, Калифорния). В этом эксперименте использовали клеточные линии PC3, PC3/hPRLR, MCF7/ATCC и MCF7/PRLR. Результаты показаны в табл. 18.

Таблица 18

Эффективность уничтожения клеток при использовании конъюгатов, образованных лекарственным средством и антителом к PRLR

	PC3		PC3/hPRLR		MCF7/ATCC		MCF7/PRLR	
	IC_{50} (нМ)	% уничтожения	IC_{50} (нМ)	% уничтожения	IC_{50} (нМ)	% уничтожения	IC_{50} (нМ)	% уничтожения
Свободный DM1	0.5	90	1.0	70	3.0	80	1.9	86
Свободный MMAE	1.4	90	1.0	77	2.4	83	1.5	95
Контроль изотипа l-SMCC-DM1	95	79	100	79	100	71	100	76
Контроль изотипа l-mc-VC-PAB-MMAE	200	33	145	55	143	23	143	21
H1H6953N-SMCC-DM1	90	81	0.4	83	80	70	0.1	80
H1H6953N-mc-VC-PAB-MMAE	130	49	0.2	80	150	42	0.1	85
H1H6958N2-SMCC-DM1	110	81	0.5	79	90	72	0.2	83
H1 H6958N2-mc-VC-PAB-MMAE	100	39	0.5	82	150	53	0.2	88
H1H6765P-SMCC-DM1	80	80	0.3	83	90	71	0.1	81
H1H6765P-mc-VC-PAB-MMAE	150	29	0.40	85	150	38	0.2	86

Как показано в табл. 18, при использовании нерасщепляемых конъюгатов с DM1 (H1H6953-SMCC-DM1, H1H6958N2-SMCC-DM1 и H1H6765-SMCC-DM1) и конъюгатов с расщепляемым MMAE (H1H6953 mc vc PAB MMAE, H1H6958N2 mc VC PAB MMAE и H1H6765-mc-VC-PAB- MMAE) наблюдалось почти эквивалентное уничтожение клеток.

Были также протестированы дополнительные токсины (DM4, MeNHC3-May и MMD), конъюгированные с антителами к PRLR, в клеточных линиях T47D и MCF7/hPRLR, и результаты этих испытаний показаны в табл. 19 (уничтожение клеточных линий 293 и T47D) и 20 (уничтожение клеточных линий MCF7/ATCC и MCF7/PRLR) (ND=не обнаружено).

Таблица 19

Конъюгаты, образованные антителом к PRLR и лекарственным средством - способность к уничтожению клеток (клеточные линии 293 и T47D)

			Клеточная линия			
			293		T47D	
Антитело	**Линкер**	**Лекарственный препарат**	**IC_{50} нМ**	**% уничтожения**	**IC_{50} нМ**	**% уничтожения**
Свободный		DM1 (Me-SS-May)	1.2	95	1.5	100
		MMAE	0.9	100	1	100
		DM4	0.6	100	0.5	100
		MMD	0.9	100	2	100
		MeNHC3-May	60	90	90	100
Контроль изотипа I	**SMCC**	DM1	150	80	140	50
	mc-VC-PAB	MMAE	300	30	300	20
		MMD	300	70	140	70
		MeNHC3-May	300	30	300	30
	SPDB	DM4	50	90	30	100
H1H6953N	**SMCC**	DM1	100	90	1.5	100
	mc-VC-PAB	MMAE	ND	ND	1.0	80
		MMD	110	70	1.0	90
		MeNHC3-May	300	20	1.0	90
H1H6958N2	**SMCC**	DM1	100	90	2	100
	mc-VC-PAB	MMAE	ND	ND	1	90
	SPDB	DM4	ND	ND	1	100
H1H6975P	**SMCC**	DM1	80	90	2	100
	mc-VC-PAB	MMD	110	80	3	90
H1H6782P	**SMCC**	DM1	120	80	3	100
	mc-VC-PAB	MMD	230	70	2	90
	mc-VC-PAB	MeNHC3-May	60	90	2	90
H1H6765P	**SMCC**	DM1	85	100	1	90
	mc-VC-PAB	MMAE	ND	ND	1	90

Таблица 20

Конъюгаты, образованные антителом к PRLR и лекарственным средством - способность к уничтожению клеток (клеточные линии MCF7/ATCC и MCF7/PRLR)

			Клеточная линия			
			MCF7/ATCC		MCF7/PRLR	
Антитело	**Линкер**	**Лекарственный препарат**	**IC_{50} нМ**	**% уничтожения**	**IC_{50} нМ**	**% уничтожения**
Свободный		DM1 (Me-SS-May)	1.3	80	0.8	80
		MMAE	2.4	80	1.5	95
		DM4	1.3	90	2	90
		MMD	2	90	0.4	90
		MeNHC3-May	100	70	50	80
Контроль изотипа 1	**SMCC**	DM1	300	60	150	70
	mc-VC-PAB	MMAE	140	20	140	20
		MMD	300	40	70	75
		MeNHC3-May	300	30	200	55
	SPDB	DM4	70	80	80	90
H1H6953N	**SMCC**	DM1	90	70	0.3	80
	mc-VC-PAB	MMAE	150	40	0.1	85
		MMD	300	50	0.2	90
		MeNHC3-May	150	60	0.2	80
H1H6958N2	**SMCC**	DM1	70	70	0.2	80
	mc-VC-PAB	MMAE	150	50	0.2	90
	SPDB	DM4	25	80	0.8	90
H1H6975P	**SMCC**	DM1	200	70	0.2	80
	mc-VC-PAB	MMD	150	50	0.2	90
H1H6782P	**SMCC**	DM1	250	70	0.3	80
	mc-VC-PAB	MMD	200	50	0.3	90
	mc-VC-PAB	MeNHC3-May	250	50	0.2	80
H1H6765P	**SMCC**	DM1	150	70	0.3	90
	mc-VC-PAB	MMAE	150	40	0.2	90

Все изученные конъюгаты, образованные лекарственным средством и антителом к PRLR, независимо от использованных токсина и линкера, специфично уничтожали протестированные клетки. IC_{50} применительно к жизнеспособности клеток T47D составляла от 0,6 до 3.4 нМ, и I_{C50} применительно к жизнеспособности клеток MCF7/hPRLRIC_{50} составляла 0,2 до 0,8 нМ.

Пример 8. Конъюгаты антитела к PRLR с лекарственным средством эффективно подавляют рост опухоли in vivo.

Для определения эффективности конъюгатов, образованных антителом к PRLR с лекарственным средством-DM1 в условиях in vivo, были проведены исследования на мышах со сниженным иммунитетом с ксенотрансплантатами рака молочной железы с экспрессией PRLR (PRLR+).

Вкратце клетки MCF7/PRLR (ATCCHTB-22, трансфецированные полноразмерным hPRLR, как описано ранее) в количестве 20×10^6 были имплантировали подкожно самкам бестимусной мыши NCr в жировую ткань в левой молочной железе. В других исследованиях 10×10^6 клеток PC3/PRLR (ATCCCRL-1435, трансфицированные полноразмерным hPRLR, как описано ранее) были имплантированы подкожно в левый бок самцов мыши SCID. Кроме того, в левый бок самок мыши CB17 SCID были подкожно имплантированы 10×10^6 клеток родительской линии T47D (ATCCHTB-133) или $7{,}5\times10^{10}$ клеток линии T47D#11 (ATCCHTB-133, после серийного пассирования in vivo, как описано ниже) были подкожно внедрены в левый фланг мышей CB17 SCID женского пола. Все мыши были приобретены в питомнике Taconic (Гудзон, Нью-Йорк). В дополнение к каждой порции клеток животным были введены гранулы эст-

рогена с замедленным (90-дневным) высвобождением (1,7 мг/гранула; Innovative Research America, Сарасота, Флорида). После того как средний объем опухоли достиг 250 мм^3, мыши были рандомизированы по группам по 7 животных в группе и получали конъюгаты антитела к PRLR с лекарственным средством согласно изобретению либо контрольные препараты. Контрольные препараты представляли собой носитель PBS, свободный метилдисульфид DM1 (DM1-SMe) и контроль изотипа 1-DM1.

В исследовании многократных доз животным вводили конъюгат один раз в неделю в течение трех недель, объемы опухоли и массу тела измеряли дважды в неделю в течение всего исследования. В исследованиях с многократным дозированием исследуемые ADC вводили в дозе 5 и/или 15 мг/кг. В исследованиях однократной дозы мышам однократно ввели дозу исследуемого ADC, объемы опухоли и массы тела проверяли дважды в неделю в течение всего исследования. В исследованиях однократной дозы исследуемые ADC вводили в дозе 1, 2.5, 5 и 15 мг/кг. Для каждой группы рассчитывали средний размер опухоли и также подавление роста опухоли относительно группы, получавшей носитель. Опухоли измеряли кронциркулем два раза в неделю, пока средний размер в группе, получавшей носитель, не достиг 1000 мм^3. Размер опухоли рассчитывали по формуле

$$(\text{длина}\times\text{ширина}^2)/2$$

Подавление роста опухоли рассчитывали по следующей формуле:

$$(1-((T_{\text{конечная}}-T_{\text{начальная}})/(C_{\text{конечная}}-C_{\text{начальная}})))\times 100,$$

где Т (экспериментальная группа) и С (контрольная группа) отражают среднюю массу опухоли в день, кода в группе, получавшей носитель, объем опухоли достиг 1000 мм^3.

Животные наблюдались до дня 52. Результаты показаны в табл. 21-25 (исследование многократных доз) и табл. 26 (исследование однократной дозы). NT=не исследовано в показанном эксперименте.

Таблица 21

Размер опухоли и подавление роста опухоли после многократного введения доз конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, и контрольных препаратов - опухоли MCF7/PRLR (исследование № 1) (бестимусные мыши линии NCr - данные, полученные в день 52)

Группа	**Доза (мг/кг)**	**Конечный размер опухоли мм^3 (среднее значение ± СОС)**	**Среднее подавление роста опухоли (%)**
Носитель	--	1068 ±384	-
Свободный DM1	0.2	625 ±141	57
Контроль изотипа Ab-DM1	5	NT	NT
	15	300 ±141	96
H1H6958N2	15	483 ± 46	74
H1H6958N2-DM1	5	51 ±33	128
	15	0±0	133
H1H6953N	15	421 ± 23	79
H1H6953N-DM1	5	107 ± 45	120
	15	0±0	133
H1H6975N	15	659 ±144	51
H1H6975N-DM1	5	125 ±46	118
	15	0±0	135
H1H6782P	15	NT	NT
H1H6782P-DM1	5		
	15		
H1H6765P	15	NT	NT
H1H6765P-DM1	5		
	15		

Таблица 22

Размер опухоли и подавление роста опухоли после многократного введения доз конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, и контрольных препаратов - опухоли MCF7/PRLR (исследование № 2) (бестимусные мыши линии NCr - данные, полученные в день 63)

Группа	**Доза (мг/кг)**	**Конечный размер опухоли мм^3 (среднее значение ± СОС)**	**Среднее подавление роста опухоли (%)**
Носитель	--	870 ±211	-
Свободный DM1	0.2	1080 ±451	-33
Контроль изотипа Ab-	5	1106 ±371	-39
	15	712±214	24
H1H6958N2	15	766 ±128	17
H1H6958N2-DM1	5	117 ± 10	116
	15	0±0	137
H1H6953N	15	NT	NT
H1H6953N-DM1	5		
	15		
H1H6975N	15	NT	NT
H1H6975N-DM1	5		
	15		
H1H6782P	15	300 ± 83	88
H1H6782P-DM1	5	74 ±34	123
	15	0±0	137
H1H6765P	15	737 ±182	19
H1H6765P-DM1	5	90 ±56	122
	15	0±0	136

Таблица 23

Размер опухоли и подавление роста опухоли после многократного введения доз конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, и контрольных препаратов - опухоли PC3/PRLR (исследование № 1) (мыши линии SCID - данные, полученные в день 63)

Группа	**Доза (мг/кг)**	**Конечный размер опухоли мм^3 (среднее значение ± СОС)**	**Среднее подавление роста опухоли (%)**
Носитель	--	1311 ±257	-
Свободный DM1	0.2	1361 ±120	-5
Контроль изотипа Ab-DM1	5	1379 ±128	-7
	15	1091 ±93	19
H1H6958N2	15	1507 ±106	-19
H1H6958N2-DM1	5	1247 ±171	5
	15	808 ±83	46
H1H6953N	15	1306±127	0
H1H6953N-DM1	5	1058 ±138	23
	15	892 ± 53	39
H1H6975N	15	1185 ±97	12
H1H6975N-DM1	5	973 ±169	31
	15	895 ± 63	38
H1H6782P	15	NT	NT
H1H6782P-DM1	5		
	15		
H1H6765P	15	NT	NT
H1H6765P-DM1	5		
	15		

Таблица 24

Размер опухоли и подавление роста опухоли после многократного введения доз конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, и контрольных препаратов - опухоли PC3/PRLR (исследование № 2) (мыши линии SCID - данные, полученные в день 55)

Группа	**Доза (мг/кг)**	**Конечный размер опухоли мм^3 (среднее значение ± СОС)**	**Среднее подавление роста опухоли (%)**
Носитель	--	1222 ±99	0
Свободный DM1	0.2	1147 ±59	7
Контроль изотипа Ab-DM1	5	1052±101	16
	15	1049 ±127	16
H1H6958N2	15	917 ±253	28
H1H6958N2-DM1	5	566 ± 63	61
	15	230 ± 22	94
H1H6953N	15	NT	NT
H1H6953N-DM1	5		
	15		
H1H6975N	15	NT	NT
H1H6975N-DM1	5		
	15		
H1H6782P	15	1154 ± 212	6
H1H6782P-DM1	5	490 ± 63	69
	15	321 ± 33	85

Таблица 25

Размер опухоли и подавление роста опухоли после многократного введения доз конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, и контрольных препаратов - опухоли T47D#11 (мыши линии SCID - данные, полученные в день 66)

Группа	**Доза (мг/кг)**	**Конечный размер опухоли мм^3 (среднее значение ± СОС)**	**Среднее подавление роста опухоли (%)**
Носитель	--	1234 ±88	0
Свободный DM1	0.2	1433 ±23	-19
Контроль изотипа Ab-DM1	5	1340±176	-9
	15	1678 ±67	-42
H1H6958N2	15	1259 ±122	-3
H1H6958N2-DM1	5	168 ± 19	102
	15	44 ±5	112
H1H6953N	15	NT	NT
H1H6953N-DM1	5		
	15		
H1H6975N	15	NT	NT
H1H6975N-DM1	5		
	15		
H1H6782P	15	1537 ±111	-29
H1H6782P-DM1	5	293 ± 20	90
	15	124 ±36	106
H1H6765P	15	1278 ±164	-3
H1H6765P-DM1	5	183 ±28	100
	15	69 ± 12	111

Таблица 26

Размер опухоли и подавление роста опухоли после введения однократной дозы конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, и контрольных препаратов - опухоли MCF7/PRLR (данные, полученные в день 55)

Группа	**Доза (мг/кг)**	**Конечный размер опухоли мм^3 (среднее значение ± СОС)**	**Среднее подавление роста опухоли (%)**
Носитель	--	710 ±249	0
Контроль изотипа Ab-DM1	15	514 ±86	38
H1H6958N2	15	703 ±160	1
H1H6958N2-1	1	274 ±142	86
H1H6958N2-1	2.5	172 ± 53	109
H1H6958N2-1	5	107 ±26	120
H1H6958N2-1	15	33 ±23	136

Обсуждение.

В этом примере первоначально была выполнена оценка способности 5 иллюстративных к PRLR, конъюгированных с DM1, уменьшать объем опухолей MCF7/PRLR и PC3/PRLR в исследованиях с многократным введением доз. В первом исследовании многократных доз (табл. 21) антитела H1H6958N2-DM1,

H1H6953N-DM1 и H1H6975N-DM1 в обеих дозах, 5 и 15 мг/кг, эффективно подавляли рост опухоли MCF7/PRLR. При введении в самой высокой дозе все три антитела, конъюгированные с DM1, уменьшили опухоли до необнаружимого уровня, причем выраженное в процентах уменьшение объема опухоли составило приблизительно 133-135%. Этот результат был воспроизведен во втором исследовании многократных доз (табл. 22), в котором антитело H1H6958N2-DM1 тестировали параллельно с двумя дополнительными иллюстративными антителами к PRLR, конъюгированными с DM1: H1H6782P и H1H6765P. В этом втором исследовании рост опухоли тоже снизился до необнаружимого уровня после назначения самой высокой дозы 15 мг/кг, причем выраженное в процентах уменьшение объема опухоли составило приблизительно 136-137%. Хотя лечение неконъюгированными антителами к PRLR привело к умеренному уменьшению объема опухоли (на 17-79%) по сравнению с группой, получавшей носитель, наибольшее подавление размеров опухоли наблюдалось в группах, получавших конъюгаты антитела с лекарственным средством.

Затем противоопухолевую эффективность этих же иллюстративных антител к PRLR, конъюгированных с DM1, оценивали в исследованиях многократных доз на мышах с ксенотрансплантатами PC3/PRLR, экспрессирующими PRLR (табл. 23 и 24). После того как опухоли росли в течение 21 дня, проводилось лечение мышей. Все антитела: H1H6958N2-DM1, H1H6953N-DM1 и H1H6975N-DM1 обеспечивали подавление роста опухоли, наиболее выраженное после применения в самой высокой дозе 15 мг/кг (табл. 23). Противоопухолевый эффект наблюдался также во втором исследовании, в котором антитело H1H6958N2-DM1 исследовали параллельно с антителами H1H6765P-DM1 и H1H6782P-DM1 после 15-дневного роста опухоли. После введения в самой высокой дозе степень подавления опухоли в разных исследованиях составляла от 8 до 98% (табл. 24). По сравнению с этими данными контроль изотипа, конъюгированный с DM1, обеспечивал подавление опухоли лишь на 16%, причем конечные объемы опухоли не различались значимо от объемов опухоли у контрольных животных, получавших носитель.

Дальнейшая оценка конъюгатов антитела PRLR с лекарственным препаратом, которые вводили многократно в дозах 5 и 15 мг/кг, проводилась на мышах с ксенотрансплантатами T47D#11, эндогенно экспрессирующими рецептор пролактина (табл. 25). Как и в других моделях опухоли лечение начинали, когда размер опухоли составил в среднем 200 $мм^3$. Результаты, полученные в этой модели опухоли, согласуются с более ранними результатами и убедительно демонстрируют противоопухолевую активность антител к PRLR, конъюгированных с DM1. Например, конъюгаты H1H6958N2-DM1, H1H6765P-DM1 и H1H6782P-DM1 в дозах 5 и 15 мг/кг эффективно подавляли рост опухоли. Конъюгаты антител к PRLR-DM1 в дозе 5 мг/кг подавляли опухоль на 89-100%, тогда как эти же конъюгаты в дозе 15 мг/кг подавляли рост опухоли на 106-112%. Важно отметить, что неконъюгированные антитела к PRLR не обладали противоопухолевой эффективностью в этой эндогенной модели опухоли, что указывает на значение конъюгирования с DM1 в возникновении противоопухолевой эффективности. Кроме того, эффективность конъюгатов антитела к PRLR с лекарственным средством была высокоспецифичной, так как контрольные конъюгаты с лекарственным препаратом не влияли на рост опухоли.

В последнем примере H1H6958N2, конъюгат антитела к PRLR с DM1, оценивали у мышей с ксенотрансплантатами MCF7/PRLR в исследовании однократной дозы (табл. 26). Как и в исследованиях многократных доз, перед тем как ввести однократную дозу, ожидали увеличения размера опухолей приблизительно до 200 $мм^3$. В этом исследовании конъюгат H1H6958N2-DM1 вводили в дозах 1, 2.5, 5 и 15 мг/кг. Как показано в табл. 26, в том исследовании наблюдался дозозависимый противоопухолевый эффект в широком диапазоне доз. Противоопухолевым эффектом обладали все изученные дозы, причем доза 1 мг/кг вызывала значимое уменьшение объема опухоли относительно опухолей у животных из контрольной группы, получавших носитель. Далее, хотя контроль изотипа I-DM1 в дозе 15 мг/кг контроль изотипа

I-DM1 тоже обладал некоторым противоопухолевым эффектом (подавление роста опухоли ~38%), конъюгат антитела к PRLR-DM1 в дозах 2,5 мг/кг, и обеспечивал значимое уменьшение объема опухоли (все изученные дозы выше 1 мг/кг вызывали подавление роста опухоли на >100%). Противоопухолевая эффективность однократных доз 5 и 15 мг/кг была сопоставимой с наблюдавшейся после многократного введения соответствующих доз, что иллюстрирует активность конъюгата антитела к PRLR-DM1.

В заключение этот пример иллюстрирует, что конъюгаты антитела к PRLR согласно настоящему изобретению являлись сильнодействующими ингибиторами роста опухоли и в различных протестированных моделях опухоли оказались способны уменьшать размер опухоли до необнаружимого уровня.

Пример 9. Конъюгаты антител к цитокиновым рецепторам класса I с лекарственным средством, эффективно уничтожающие клеточные линии с низким уровнем экспрессии антигена-мишени.

Как обсуждалось в настоящем документе, конъюгаты антитела к PRLR с лекарственным средством эффективно уничтожают клеточные линии, экспрессирующие рецептор пролактина, включая линии с относительно низким уровнем экспрессии антигена-мишени. Как отмечалось выше, рецептор пролактина принадлежит к семейству цитокиновых рецепторов класса I, включающему IL-4R и IL-6R. Подобно рецептору пролактина, IL-4R и IL-6R являются односторонними трансмембранными рецепторами; IL-4R

участвует в передаче сигнала IL-4 и IL-13, в то время как IL-6R участвует в передаче сигнала IL-6 через совместный комплекс с рецептором gp130. Для дополнительного подтверждения общей концепции о том, что ADC с направленным воздействием на цитокиновые рецепторы класса I могут использоваться для эффективного уничтожения клеток, включая клетки с низким уровнем экспрессии антигена-мишени, была выполнена оценка конъюгатов, образованных лекарственных средством и антителами к IL-4R и IL-6R, на предмет способности уничтожать клетки.

Вначале была выполнена количественная оценка антигенов на поверхности клеток с эндогенной или рекомбинантной экспрессией IL-4R или IL-6R методом FACS. Вкратце приблизительно 1 млн клеток KG-1 (IL-4R$^+$), HEK293/IL-4R и Ramos (IL-6R$^+$) инкубировали в присутствии иллюстративных антител к IL-4R (H4H083P2; см. патент США № 7608693) и антител к IL-6R (W6A9-5; см. патент США № 7582298) в течение 30 мин на льду. После промывки добавляли PE, конъюгированный с вторичными антителами к человеческим антителам в концентрации 10 мкг/мл на 30 мин с последующей второй промывкой, затем образцы анализировали на цитометре AccuriC6 (BD) с программным обеспечением FlowJo (TreeStar, Inc., Ашленд, Орегон). Результаты, отражающие относительную экспрессию IL-4R и IL-6R на клеточной поверхности, рассчитывали как среднюю интенсивность флуоресценции (СИФ), превышавшую уровень контроля изотипа. Уровни экспрессии показаны в табл. 27.

Таблица 27

Относительная экспрессия IL-4R и IL-6R на поверхности клеток в клеточных линиях с эндогенной или рекомбинантной экспрессией IL-4R и IL-6R

	Уровень экспрессии в клеточной линии; кратность по сравнению с фоном			
Экспрессия рецептора	**HEK293**	**HEK293/ IL4R**	**KG-1**	**Ramos**
IL-4R	2	50	1	4
IL-6R	1	1	7	1

Как показано в табл. 27, клетки HEK293 и Ramos эндогенно экспрессировали IL-4R на уровне, 2- и 4-кратно превышавшем фоновые значения соответственно, в то время как уровень экспрессии IL-4R в инженерной клеточной лини HEK293/IL-4R более чем 50-кратрно превышал фоновые значения. Экспрессия IL-4R не была выявлена по сравнению с фоновым значением В клеточной линии KG-1 экспрессия IL-4R не превышала фоновые значения. В клеточной линии KG-1, но не в линиях Ramos или HEK293, уровень экспрессии IL-6R 7-кратно превышал фоновые значения.

Далее были получены конъюгаты иллюстративных антител к IL-4R (H4H083P2) и к IL-6R (W6A9-5) антитела с цитотоксическим препаратом, DM1, и выполнена количественная оценка цитотоксичности конъюгатов. Вкратце клетками, принадлежащими к линиям HEK293/IL-4R, Ramos или KG-1, а также к родительской линии HEK293, засевали 96-луночные планшеты с покрытием PDL, по 1500-10000 клеток на лунку. К клеткам добавляли конъюгаты или свободный DM1 (в форме метилдисульфидного производного DM1-SMe) до конечных концентраций от 300 нМ до 15 пМ и инкубировали в течение 3 суток. В течение последних 1-3 ч клетки инкубировали в присутствии CCK8 (Dojindo, Роквилль, Мэриленд) и определяли оптическую плотность при длине волны 450 нМ (OD_{450}) на приборе Flexstation3 (Molecular Devices, Саннивейл, Калифорния). Из значений, полученных для всех лунок, вычитали фоновые значения OD_{450}, полученные для клеток, обработанных дигитонином (40 нМ), и жизнеспособность клеток выражали в процентах от значений, полученных для необработанных контрольных образцов. Для определения значений IC_{50} использовали 4-параметрическое логистическое уравнение и построенную по 10 точкам кривую ответа (GraphPad Prism). Результаты представлены в табл. 28.

Таблица 28

Способность конъюгатов, образованных лекарственным средством и антителом к IL4R или IL6R, к уничтожению клеток, принадлежащих к клеточным линиям, экспрессирующим IL4R и IL-6R

Конъюгат антитела с лекарственным средством	**HEK293**		**HEK293/ hIL4R**		**KG-1**		**Ramos**	
	IC50 (нМ)	**% уничтожения**	**IC50 (нМ)**	**% уничтожения**	**IC50 (нМ)**	**% уничтожения**	**IC50 (нМ)**	**% уничтожения**
DM1 (свободное лекарство)	0.27	100	0.33	98	1.26	89	0.34	100
Контроль изотипа-DM1	70	89	110	91	100	74	60	91
Конъюгат антитела к IL-4R и DM1	80	91	0.22	95	90	83	18	91
Конъюгат антитела к IL-6R и DM1	100	88	70	92	38	77	70	94
Уровни экспрессии рецепторов: кратность относительно контроля изотипа								
IL-4R	2		50		1		4	
IL-6R	1		1		7		1	

Как показано в табл. 28, конъюгаты, образованные антителом к IL-4R и DM1, снижали жизнеспособность клеток Ramos при IC_{50} 18 нМ, хотя экспрессия IL-4R на поверхности клеток лишь 4-крано превышала фоновые значения. Конъюгаты, образованные антителом к IL-4R и DM1, снижали жизнеспособность клеток HEK293/IL-4R с высоким уровнем экспрессии IL-4R при IC_{50}=0,22 нМ. Конъюгат антитела к IL-4R с DM1 оказывал умеренное, но воспроизводимое влияние на жизнеспособность клеток KG-1 (с уровнем экспрессии IL-6R, 7-кратно превышающим фоновые значения) при IC_{50} 38 нМ по сравнению с IC_{50} 100 нМ, измеренной для эквивалентного конъюгата, образованного контролем изотипа и лекарственным средством.

В итоге данный пример демонстрирует, что конъюгаты, образованные антителами к IL-4R или IL-6R антител и лекарственным средством, продемонстрировали выраженную и воспроизводимую цитотоксичность даже в отношении клеточных линий с умеренным уровнем экспрессии рецепторов. Этот результат аналогичен результату, полученному для конъюгата, образованного антителом к PRLR и лекарственным средством, где эффективное уничтожение клеток было достигнуто даже в отношении клеточных линий с низким уровнем экспрессии PRLR (см., например, пример 7 в настоящем документе). Таким образом, данный пример дополнительно подтверждает концепцию изобретения, согласно которой конъюгаты, образованные лекарственным средством и антителом к цитокиновым рецепторам класса I, в целом могут являться эффективными терапевтическими агентами, направленными против клеточных линий и опухолей, экспрессирующих цитокиновые рецепторы класса I, даже при низком уровне экспрессии.

Объем настоящего изобретения не ограничивается описанными в настоящем документе частными вариантами осуществления. В действительности различные модификации изобретения в дополнение к описанным в настоящем документе должны быть очевидны для специалистов в данной области техники из предшествующего описания и рисунков. Такие модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела, которые связываются с экспрессируемым на клеточной поверхности рецептором пролактина (PRLR) человека и блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих PRLR человека, отличающиеся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела

содержат определяющий комплементарность участок тяжелой цепи

(HCDR)-1 с последовательностью SEQ ID NO: 292;

HCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 294;

HCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 296, и

включают определяющий комплементарность участок легкой цепи

(LCDR)-1 с последовательностью SEQ ID NO: 300;

LCDR2 с последовательностью SEQ ID NO: 302; и

LCDR3 с последовательностью SEQ ID NO: 304.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспресси-

рующих PRLR человека, с IC_{50} меньше, чем приблизительно 600 пМ.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих PRLR человека, с IC_{50} меньше, чем приблизительно 400 пМ.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих PRLR человека, с IC_{50} меньше, чем приблизительно 200 пМ.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела блокируют сигнальный путь с участием пролактина в клетках, экспрессирующих PRLR человека, с IC_{50} меньше, чем приблизительно 40 пМ.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по п.1, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела содержат

вариабельную область тяжелой цепи (HCVR) с последовательностью SEQ ID NO: 290; и

вариабельную область легкой цепи (LCVR), с последовательностью SEQ ID NO: 298.

7. Конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC), предназначенный для ингибирования роста опухолевых клеток на опухолевых клетках, экспрессирующих PRLR, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-6, конъюгированные с цитотоксическим агентом.

8. Конъюгат по п.7, где цитотоксический агент является майтанозиноидом.

9. Конъюгат по п.8, где майтанзиноид является DM1, DM4 или производным этих соединений.

10. Конъюгат по п.8 или 9, где майтанзиноид конъюгирован с антителом через расщепляемый линкер.

11. Конъюгат по п.8 или 9, где майтанзиноид конъюгирован с антителом через нерасщепляемый линкер.

12. Конъюгат по п.7, где цитотоксический агент выбирают из группы, включающей 1-(2-хлорэтил)-1,2-диметансульфонил гидразид, 1,8-дигидрокси-бицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диин-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотецин, актиномицин D, аманитин, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (AMC), ауристатин, блеомицин, бусульфан, масляную кислоту, калихемицин, камптотецин, карминомицин, кармустин, цемадотин, цисплатин, колхицин, комбретастатин, циклофосфамид, цитарабин, цитохаласин B, дактиномицин, даунорубицин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубицин, дибромоманнитол, дигидроксиантрациндион, дизоразол, доластатин, доластатин 10, доксорубицин, дуокармицин, эхиномицин, элеутеробин, эметин, эпотилон, эсперамицин, эстрамустин, этидия бромид, этопозид, фторурацил, гелданамицин, грамицидин D, глюкокортикоид, иринотекан, ингибитор кинезина веретена деления (KSP), лептомицин, лейрозин, лидокаин, ломустин (CCNU), мехлорэтамин, мелфалан, меркаптопурин, метоптерин, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксин, прокаин, пропранолол, птеридин, пуромицин, пирролобензодиазепин (PBD), ризоксин, стрептозотоцин, таллисомицин, таксол, тенопозид, тетракаин, тиоэпахлорамбуцил, томаимицин, топотекан, тубульсин, винбластин, винкристин, виндезин, винорельбин.

13. Конъюгат по любому из пп.7-12, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела конъюгированы с цитотоксическим агентом через линкер, содержащий MC (6-малеимидокапроил), MP (малеимидопропаноил), вал-цит (валин-цитрулиин), вал-ала (валин-аланин), дипептид, расщепляемый протеазой, ала-фен (аланин-фенилаланин), PAB (п-аминобензилоксикарбонил), SPP (N-сукциниимидил 4-(2-пиридилтио)пентаноат), SMCC (N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SIAB (N-сукцинимидил (4-йод-ацетил)аминобензоат).

14. Конъюгат по п.8 или 9, где майтанзиноид конъюгирован с антителом или с его антигенсвязывающим фрагментом через линкер, представляющий собой N-сукцинимидил 4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC).

15. Применение конъюгата по любому из пп.7-14 для уничтожения клеток с низким уровнем экспрессии PRLR на клеточной поверхности.

16. Применение по п.15, где клетки являются опухолевыми клетками.

17. Применение по п.16, где клетки являются клетками опухоли молочной железы.

18. Применение по любому из пп.15-17, где опухолевые клетки экспрессируют менее 1 млн копий рецептора пролактина на клетку.

19. Применение по п.18, где опухолевые клетки экспрессируют между 10000 и 500000 копий рецептора пролактина на клетку.

20. Применение выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-6 для лечения рака, экспрессирующего PRLR или зависимого от сигнального пути с участием пролактина.

21. Применение по п.20, где рак выбирают из группы, включающей почечноклеточную карциному, карциному поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак предстательной железы, злокачественную глиому, остеосаркому, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, злокачественную мезотелиому, мно-

жественную миелому, рак яичника, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, синовиальную саркому, рак щитовидной железы, рак молочной железы и меланому.

22. Применение по п.21, где рак является раком молочной железы.

23. Применение по любому из пп.20-22 для ингибирования или уменьшения роста опухоли.

24. Применение выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента антитела по любому из пп.1-6 для in vitro или ex vivo диагностики рака, экспрессирующего PRLR или зависимого от сигнального пути с участием пролактина.

25. Применение по п.24, где рак выбирают из группы, включающей почечноклеточную карциному, карциному поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак предстательной железы, злокачественную глиому, остеосаркому, рак толстой и прямой кишки, рак желудка, злокачественную мезотелиому, множественную миелому, рак яичника, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, синовиальную саркому, рак щитовидной железы, рак молочной железы и меланомы.

26. Применение по п.25, где рак является раком молочной железы.

27. Фармацевтическая композиция, включающая выделенное антитело, или антигенсвязывающий фрагмент антитела по любому из пп.1-6, или конъюгат по любому из пп.7-14, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель для уничтожения опухолей или уменьшения роста опухоли.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, где опухоль выбирают из группы, включающей опухоль почки, опухоль поджелудочной железы, опухоль головы и шеи, опухоль молочной железы, опухоль предстательной железы, опухоль толстой кишки, опухоль желудочно-кишечного тракта, опухоль яичников, опухоль легкого и опухоль кожи.

29. Фармацевтическая композиция по п.28, где опухоль представляет собой опухоль молочной железы.

30. Применение конъюгата по любому из пп.7-14 для лечения рака, экспрессирующего PRLR или зависимого от сигнального пути с участием пролактина.

31. Выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связывают рецептор пролактина (PRLR) и блокируют опосредованный пролактином сигнальный путь в клетках, экспрессирующих PRLR человека, при этом антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

три определяющих комплементарность участка (CDR) в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 290; и

три определяющих комплементарность участка в вариабельной области легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 298.

32. Конъюгат антитела с лекарственным средством (ADC), содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают рецептор пролактина (PRLR) человека, при этом антитело или его фрагмент конъюгированы с цитотоксическим агентом, где ADC ингибирует рост экспрессирующих PRLR клеток, а антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат

три определяющих комплементарность участка (CDR) в вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 290; и

три определяющих комплементарность участка в вариабельной области легкой цепи (LCVR) с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 298.

33. Конъюгат по п.7, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи (HCVR), содержащую SEQ ID NO: 290, и вариабельную область легкой цепи (LCVR), содержащую SEQ ID NO: 298.

34. Конъюгат по п.12, где цитотоксическим агентом является ауристатин.

35. Конъюгат по п.7, который уничтожает экспрессирующие PRLR клетки с уровнем экспрессии, менее чем в 30 раз превышающим фоновый уровень.

36. Конъюгат по п.7, который уничтожает экспрессирующие PRLR клетки с уровнем экспрессии, менее чем в 20 раз превышающим фоновый уровень.

37. Конъюгат по п.7, который уничтожает экспрессирующие PRLR клетки с уровнем экспрессии, более чем в 12 раз, но менее чем в 30 раз превышающим фоновый уровень.

38. Применение конъюгата по п.7 при изготовлении лекарственного средства для уничтожения клеток с низким уровнем экспрессии PRLR человека на клеточной поверхности, при этом конъюгат содержит антитело к PRLR или его антигенсвязывающий фрагмент.

39. Применение конъюгата по п.7 при изготовлении лекарственного средства для лечения рака.

40. Применение по п.39, где раком является рак молочной железы.

Евразийская патентная организация, ЕАПВ
Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2