

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291405 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.08.03

(22) Дата подачи заявки
2020.11.06

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К МЕЗОТЕЛИНУ И ЭРИБУЛИНА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 62/932,373

(32) 2019.11.07

(33) US

(86) PCT/IB2020/000917

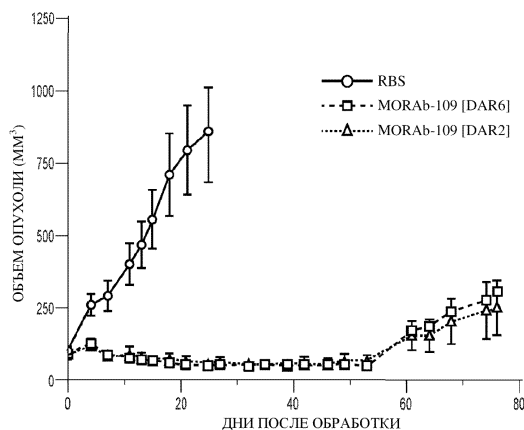
(87) WO 2021/090062 2021.05.14

(71) Заявитель:
ЭЙСАЙ Ар ЭНД Ди МЕНЕДЖМЕНТ
КО., ЛТД. (JP)

(72) Изобретатель:
Элбон Эрл Ф., Спайдел Джаред (US)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(57) Раскрыты антитела, антигенсвязывающие фрагменты и конъюгаты (например, конъюгаты антитела и лекарственного средства, такие как конъюгаты, содержащие эрибулин), которые связываются с мезотелином. Настоящее изобретение дополнительно относится к способам и композициям для применения в лечении рака путем введения композиций, представленных в данном документе.



A1

202291405

202291405

A1

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА И ЛЕКАРСТВЕННОГО СРЕДСТВА НА ОСНОВЕ АНТИТЕЛА К МЕЗОТЕЛИНУ И ЭРИБУЛИНА И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

[0001] Настоящее изобретение испрашивает преимущество приоритета на основании предварительной заявки на патент США № 62/932373, поданной 7 ноября 2019 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0002] Настоящее изобретение относится к антителам к мезотелину и их антигенсвязывающим фрагментам, а также к конъюгатам, таким как конъюгаты антитела и лекарственного средства (ADC), например содержащим эрибулин, и их применению в лечении и диагностике видов рака, которые экспрессируют мезотелин и/или поддаются лечению путем разрушения тубулина или путем введения раскрытой в данном документе композиции.

[0003] Рак является одной из ведущих причин заболеваемости и смертности во всем мире: в 2012 году было зарегистрировано примерно 14 миллионов новых случаев заболевания и 8,2 миллиона случаев смерти, связанных с раком. Наиболее частыми причинами смерти от рака являются такие виды рака: рак легких (1,59 млн смертей); печени (745000 смертей); желудка (723000 смертей); колоректальный рак (694000 смертей); рак молочной железы (521000 смертей) и пищевода (400000 смертей). Ожидается, что число новых случаев рака вырастет на приблизительно 70% в течение следующих двух десятилетий, до примерно 22 миллионов новых случаев рака в год (World Cancer Report 2014).

[0004] Мезотелин, заякоренный гликозилфосфатидилинозитолом (GPI) белок клеточной поверхности, является привлекательной мишенью для терапии рака на основе антител из-за его высокой экспрессии при различных типах рака, включая мезотелиому, рак яичника и аденокарциномы поджелудочной железы (Tang et al. (2013) *Anticancer Agents Med. Chem.* 13(2):276-80). Хотя полное понимание биологических функций мезотелина отсутствует, учитывая, что мыши с нокаутом мезотелина не демонстрируют какого-либо определяемого фенотипа, было высказано предположение, что мезотелин играет роль в адгезии и метастазировании опухоли (Bera and Pastan (2000) *Mol. Cell Biol.* 20(8):2902-6; Rump et al. (2004) *J. Biol. Chem.* 279(10):9190-8). Также считается, что мезотелин придает устойчивость к определенным формам химиотерапии и способствует прогрессированию опухоли, оказывая пролиферативный эффект на клетки (Bharadwaj et al. (2011) *Mol. Cancer.* 10:106; Li et al. (2008) *Mol. Cancer Ther.* 7(2):286-96).

[0005] Недавние исследования показали, что мезотелин может функционировать как основной регулятор эпителиально-мезенхимального перехода (EMT), процесса, тесно связанного с метастазированием и рецидивом рака (He et al. (2017) *Mol Cancer.* 16:63). Не желая быть связанными какой-либо теорией, считается, что ингибирование мезотелина, например связывание антителом, антигенсвязывающим фрагментом и/или ADC к мезотелину, может снижать степень EMT посредством индукции обратного процесса,

мезенхимально-эпителиального перехода (MET), путем подавления передачи сигналов с помощью TGF- β (трансформирующий фактор роста бета). И наоборот, считается, что избыточная экспрессия мезотелина может стимулировать ЕМТ за счет индукции фенотипов, подобных раковым стволовым клеткам, связанных с прогрессированием опухоли и плохим ответом на лечение (He et al. (2017). *Mol Cancer*. 16:63; Koyama et al. (2017). *J. Clin. Invest.* 127(4): 1254-1270).

[0006] Обычно встречающаяся проблема при терапии рака заключается в том, что ограниченный терапевтический индекс химиотерапевтических средств приводит к значительной токсичности в отношении нормальных тканей и, таким образом, ограничивает их терапевтическую применимость. Один из подходов к достижению более высокой специфичности для целенаправленного воздействия на раковые клетки заключается в применении антител для оказания цитотоксического действия на клетки, экспрессирующие определенные опухолеспецифические антигены, при сохранении нормальных клеток, которые экспрессируют гораздо более низкие уровни таких антигенов или не экспрессируют их (Awwad et al. *Pharmaceutics* (2018) 10(3); Lambert and Berkenblit (2018) 69: 191-207). Такое опухолеспецифическое целенаправленное воздействие можно использовать как для повышения противоопухолевой активности, так и для снижения нецелевой цитотоксичности терапевтических средств. Антитела, целенаправленно воздействующие на опухолеспецифические антигены, могут оказывать цитотоксическое действие с помощью различных механизмов, включая ингибирование биологической активности антигена, проявление иммунной эффекторной активности и/или индукцию антителозависимой клеточной цитотоксичности (Hendricks et al. *International Review of Cell and Molecular Biology* (2017); *Therapeutic Antibody Engineering* (2012): 163-196, 459-595).

[0007] Отбор опухолеспецифических антигенов для терапевтического подхода на основе антител может включать специфическую экспрессию антигена опухолевыми клетками и надежное уничтожение опухолевых клеток, экспрессирующих антиген. Было обнаружено, что при нескольких видах рака человека экспрессируется мезотелин на высоких уровнях, в том числе при раке легкого, раке яичника, раке поджелудочной железы и раке желудка (Hassan et al. *Eur. J. Cancer* (2008) 44(1): 46-53; Hassan et al. *J. Clin. Oncol.* (2016) 34(34): 4171-4179). Экспрессия мезотелина также была обнаружена при видах рака, устойчивых к лекарственным средствам, таких как виды рака легкого с мутациями KRAS и STK11 с плохим клиническим ответом на иммунотерапию на основе блокады контрольных точек и HER2-негативный рак желудка. Кроме того, сообщалось о корреляции между экспрессией мезотелина и общей выживаемостью пациентов с аденокарциномой легкого и пациентов с метастазами рака желудка, позволяя предположить, что высокая экспрессия мезотелина может быть прогностическим фактором худшего клинического исхода (Kachala et al. (2014) *Clin. Cancer. Res.* 20(4): 1020-1028; Han et al. (2017) *J. Pathol. Transl. Med.* 51(2): 122-128). Преобладание экспрессии мезотелина при видах рака человека и его связь с плохим клиническим исходом делают мезотелин потенциальной мишенью для подходов к доставке лекарственных средств, специфичных для опухолевого антигена, например

подхода, опосредованного антителами. Антитела, конъюгированные с цитотоксическими соединениями, такими как химиотерапевтические средства, также были исследованы на предмет повышения активности уничтожения клеток при доставке лекарственных средств на основе антител к опухолевым клеткам. Тем не менее, остается потребность в обеспечении подходящих антител и/или ADC, которые предлагают комбинацию эффективного целенаправленного воздействия на опухоль, целевых эффектов, неспецифического уничтожения и/или снижения нецелевых эффектов.

[0008] Эрибулин представляет собой синтетический аналог макроциклического соединения галихондрин В, которое, как было показано ранее, является мощным ингибитором полимеризации тубулина, сборки микротрубочек и тубулинозависимого гидролиза ГТФ. Тубулин образует динамические нитевидные белки цитоскелета, называемые микротрубочками, которые участвуют в различных жизненно важных клеточных функциях, включая внутриклеточную миграцию и транспорт, передачу клеточных сигналов, поддержание формы клетки и клеточное деление. Быстрая скорость деления раковых клеток делает их особенно чувствительными к блокированию функции тубулина. Таким образом, галихондрин В и эрибулин продемонстрировали заметную противораковую активность *in vitro* и *in vivo* (Tan et al. (2009) Clin Cancer Res. 15(12): 4213-4219; Vahdat et al. (2009) J. Clin. Oncol. 27(18): 2954-2961). Мезилатная соль эрибулина (эрибулина мезилат) в настоящее время продается под торговым названием Halaven™ для лечения пациентов с рефрактерным метастатическим раком молочной железы.

[0009] Несмотря на то, что в уровне техники сообщалось о путях применения эрибулина, в том числе в контексте ADC, остается потребность в лучшей адресной доставке эрибулина к определенным тканям, например к раковым тканям, которые экспрессируют мезотелин. Аналогичным образом, в данной области сохраняется потребность в улучшенных антителах, которые связывают мезотелин с превосходными свойствами, например в отношении связывания антигена и/или способности эффективно доставлять полезные нагрузки, такие как эрибулин, в клетку- или ткань-мишень, экспрессирующую мезотелин.

[0010] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение частично предусматривает новые антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые можно применять отдельно, в сочетании с одним или несколькими дополнительными средствами (например, в качестве ADC) или как часть более крупной макромолекулы (например, биспецифического антитела, мультиспецифического антитела, отдельно или в виде мультиспецифического антитела, связанного с полезной нагрузкой в формате ADC), и вводить как часть фармацевтических композиций или комбинированных способов лечения. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и сохраняют реактивность антитела, не являющегося человеческим, будучи менее иммуногенными для человека. В некоторых

вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут быть пригодны для лечения пациентов с раком человека.

[0011] В различных вариантах осуществления настоящее изобретение более конкретно относится к антителам и соединениям, представляющим собой конъюгаты антитела и лекарственного средства, которые способны к связыванию и/или уничтожению опухолевых клеток. В различных вариантах осуществления соединения также способны к интернализации в клетку-мишень после связывания. Раскрыты соединения ADC, содержащие линкер, который присоединяет фрагмент лекарственного средства, представляющего собой эрибулин, к фрагменту антитела. Фрагмент антитела может представлять собой полноразмерное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0012] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 и 1991))); или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)).

[0013] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR) из вариабельной области тяжелой цепи, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR) из вариабельной области легкой цепи, содержащие аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

[0014] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14, или последовательности, которые на по меньшей мере 90% идентичны раскрытым последовательностям. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1

человека, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой каппа-цепи Ig человека, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 17 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 18.

[0015] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 19 (HCDR1), SEQ ID NO: 20 (HCDR2) и SEQ ID NO: 21 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 22 (LCDR1), SEQ ID NO: 23 (LCDR2) и SEQ ID NO: 24 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 25 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2) и SEQ ID NO: 27 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 28 (LCDR1), SEQ ID NO: 29 (LCDR2) и SEQ ID NO: 30 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT.

[0016] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 31, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 32. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 33, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 34. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 35, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 36.

[0017] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент

представляют собой моноспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент или мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или Fab-фрагмент.

[0018] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с терапевтическим средством, например одной или несколькими малыми молекулами и/или дополнительными антителами или антигенсвязывающими фрагментами. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство представляет собой эрибулин. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой 345A12-HC15-LC4.

[0019] В различных вариантах осуществления ADC, раскрытый в данном документе, предусматривает формулу (I):



где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой терапевтическое средство, например фрагмент, представляющий собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, который ковалентно присоединяет Ab к D; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

[0020] В некоторых вариантах осуществления *p* представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления *p* равняется 2 или 6.

[0021] В некоторых вариантах осуществления ADC предусматривает расщепляемый линкер, содержащий расщепляемый фрагмент, который расположен таким образом, что никакая часть линкера или антитела или антигенсвязывающего фрагмента не остается связанной с терапевтическим средством (например, эрибулином) при расщеплении. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает

расщепляемый пептидный фрагмент, расщепляемый ферментом, таким как катепсин В. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает расщепляемый пептидный фрагмент, например аминокислотное звено, такое как Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное звено предусматривает валин-цитруллин (Val-Cit).

[0022] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает по меньшей мере одно спейсерное звено, содержащее по меньшей мере один фрагмент, представляющий собой PEG. В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено или линкер предусматривает $(PEG)_2$. В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено прикрепляется к фрагменту антитела через малеимидный (Mal) фрагмент ("Mal-спейсерное звено"). В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено присоединено к антителу или антигенсвязывающему фрагменту посредством остатка цистеина в антителе или антигенсвязывающем фрагменте (например, остатка LCys80 в антителе). В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено присоединено к остатку цистеина (например, LCys80) вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления p равняется 2, так что два фрагмента, представляющих собой -L-D, присоединены к антителу или антигенсвязывающему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент, представляющий собой -L-D, присоединен к остатку цистеина (например, LCys80) вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина представляет собой LCys80, т. е. остаток цистеина в аминокислотном положении 80 вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с системой нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает Mal-спейсерное звено и расщепляемый пептидный фрагмент, а расщепляемый пептидный фрагмент предусматривает Val-Cit. В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено присоединяет антитело или антигенсвязывающий фрагмент к расщепляемому фрагменту.

[0023] В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено предусматривает по меньшей мере один фрагмент, предусматривающий PEG. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal- $(PEG)_2$. В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено присоединяет фрагмент, представляющий собой антитело, к расщепляемому фрагменту в линкере. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент в линкере представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент, например аминокислотное звено. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal- $(PEG)_2$ -Val-Cit.

[0024] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент ADC непосредственно присоединен к эрибулину, или спейсерное звено прикрепляет расщепляемый фрагмент в линкере к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин, и расщепление конъюгата высвобождает эрибулин из антитела или

антигенсвязывающего фрагмента и линкера.

[0025] В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено, которое присоединяет расщепляемый фрагмент к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин, является саморасщепляемым. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляемое спейсерное звено содержит *n*-аминобензилоксикарбонил (pAB). В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено pAB присоединяет расщепляемый фрагмент к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин, через амин C-35. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент, например аминокислотное звено. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый линкер предусматривает Val-Cit-pAB. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Val-Cit-pAB и PEG-спейсерное звено, присоединяющее линкер к фрагменту, представляющему собой антитело, через фрагмент, представляющий собой Mal. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB.

[0026] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержит каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека или каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека с одной или несколькими обратными мутациями. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 14. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой каппа-цепи Ig человека, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 17 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 18.

[0027] В различных вариантах осуществления ADC имеет формулу (I):



где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ

ID NO:5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; и

p представляет собой целое число от 1 до 8, например *p* представляет собой целое число от 2 до 6 или от 3 до 4.

[0028] В некоторых вариантах осуществления *p* представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления *p* равняется 2 или 6.

[0029] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC (например, ADC, описанного выше) содержит каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека или каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека с одной или несколькими обратными мутациями. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 14. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой каппа-цепи Ig человека, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 17 и аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 18.

[0030] В различных вариантах осуществления ADC имеет формулу I:

Ab-(L-D)_p (I),

где Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-

Cit-pAB; и

p представляет собой целое число от 1 до 8, например p представляет собой целое число от 2 до 6 или от 3 до 4.

[0031] В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления p равняется 2 или 6.

[0032] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC содержит константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой каппа-цепи Ig человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой каппа-цепи Ig, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[0033] В различных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие описанные антитела, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты и/или композиции ADC. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит одно или несколько антител или антигенсвязывающих фрагментов и/или один или несколько ADC, описанных в данном документе, вместе с по меньшей мере фармацевтически приемлемым носителем. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит множество копий антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит множество копий ADC, раскрытых в данном документе, где среднее значение p ADC составляет от приблизительно 1 до приблизительно 6. В некоторых вариантах осуществления среднее значение p ADC в композиции составляет приблизительно 1,7 или 2 или приблизительно 6.

[0034] В различных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены пути терапевтического применения описанных антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов и/или композиций ADC, например, при лечении рака. В определенных аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы лечения рака, при котором экспрессируется антиген, являющийся мишенью для антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или фрагмента, представляющего собой антитело, конъюгата или ADC, такой как мезотелин. В определенных аспектах в настоящем изобретении предусмотрены способы уничтожения или ингибирования пролиферации опухолевых клеток или раковых клеток путем введения терапевтически эффективного количества и/или схемы любого из антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов и/или ADC, описанных в данном документе. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак, при котором экспрессируется мезотелин, такой как мезотелиома, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак

легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак яичника (например, серозный или светлоклеточный рак яичника), рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, рак уротелия, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

[0035] В определенных аспектах в настоящем изобретении предусмотрены пути применения описанных антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов и/или соединений и композиций на основе ADC, например, для определения того, будет ли субъект, имеющий рак или подозрение на его наличие (например, рак, при котором экспрессируется мезотелин), отвечать на лечение при помощи средства, целенаправленно воздействующего на мезотелин, например антитела или связывающего фрагмента антитела, конъюгата или ADC, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления способ предусматривает получение биологического образца от субъекта; приведение образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, раскрытым в данном документе; и обнаружение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с одной или несколькими раковыми клетками в образце.

[0036] В определенных других аспектах в настоящем изобретении предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитело или связывающий фрагмент антитела, конъюгат и/или ADC и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель и/или вспомогательное вещество. Также предусмотрены способы получения раскрытого антитела или связывающего фрагмента антитела, конъюгата или соединений и композиций на основе ADC.

[0037] В некоторых вариантах осуществления предусмотрена(-ы) последовательность(-и) нуклеиновой кислоты, кодирующая(-ие) антитело или антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат или ADC по настоящему изобретению. Нуклеиновая(-ые) кислота(-ы) может(-гут) быть в форме выделенной нуклеиновой кислоты, нуклеиновой кислоты, встроенной в выделенный вектор, содержащий и/или антитело или антигенсвязывающий фрагмент, экспрессируемый клеточной популяцией в условиях, подходящих для продуцирования антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

[0002] КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0038] На фиг. 1 показано определение специфической реактивности иммунных сывороток против мезотелина человека с помощью проточной цитометрии.

[0039] На фиг. 2 показано определение специфической реактивности культуральных супернатантов по отношению к мезотелину человека с помощью ELISA.

[0040] На фиг. 3 с помощью гель-электрофореза показана амплификация антител к мезотелину при помощи ПЦР In-Fusion.

[0041] На фиг. 4 показаны клоны к мезотелину для клонирования и экспрессии In-Fusion.

[0042] На фиг. 5 показана сводная информация о 48 очищенных антителах Rb-hu-xi к мезотелину.

[0043] На фиг. 6 показаны результаты эффективности in-vitro на основе клеток для

конъюгатов антитела к мезотелину и AuF.

[0044] На фиг. 7 показана характеристика эпитоп-специфической сортировки антител к мезотелину.

[0045] На фиг. 8 показаны результаты анализа DSC для гуманизированных антител 345A12. Фрагменты 345A12 F(ab')₂ подвергали термическому анализу в диапазоне от 25 до 100°C с использованием скорости сканирования 100°C/час.

[0046] На фиг. 9 показана стабильность MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулин) (DAR2) в различных матрицах.

[0047] На фиг. 10A и фиг. 10B показан противоопухолевый эффект (фиг. 10A) и изменение массы тела (фиг. 10B) на модели ксенотрансплантата немелкоклеточного рака легкого (NSCLC) человека NCI-H2110, обработанного с помощью ADC 345A12-HC1-LC2-димер эрибулина diOH в концентрации 2,5 мг/кг или ADC 102A6A2-HC1-LC2-димер эрибулина diOH в концентрации 2,5 мг/кг (исследование M109-004-2016).

[0048] На фиг. 11A и фиг. 11B показано изменение массы тела самок мышей CD-1, обработанных с помощью ADC 345A12-HC1-LC2-димер эрибулина diOH (5, 10, 15 или 20 мг/кг) (фиг. 11A) или с помощью ADC 345A12-HC15-LC4-димер эрибулина diOH (5, 10 или 20 мг/кг) (фиг. 11B) (исследование M109-006-2017).

[0049] На фиг. 12A и фиг. 12B показан противоопухолевый эффект (фиг. 12A) и изменение массы тела (фиг. 12B) на модели ксенотрансплантата NSCLC человека NCI-H2110, обработанной с помощью ADC 345A12-HC10-LC4-димер эрибулина diOH в концентрации 2,5 мг/кг или ADC 345A12-HC15-LC4-димер эрибулина diOH в концентрации 2,5 мг/кг (исследование M109-007-2017).

[0050] На фиг. 13A и фиг. 13B показан противоопухолевый эффект (фиг. 13A) и изменение массы тела (фиг. 13B) на модели ксенотрансплантата рака желудка человека NCI-N87, обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2 или DAR6) (исследование M109-010-2018).

[0051] На фиг. 14A и фиг. 14B показан противоопухолевый эффект (фиг. 14A) и изменение массы тела (фиг. 14B) на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека HAY, обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2 или DAR6) или эрибулина (исследование M109-010-2018).

[0052] На фиг. 15A и фиг. 15B показан противоопухолевый эффект (фиг. 15A) и изменение массы тела (фиг. 15B) на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека PDX (Meso7212), обработанной с помощью MORAb-109 (DAR6) или эрибулина.

[0053] На фиг. 16A и фиг. 16B показан противоопухолевый эффект (фиг. 16A) и изменение массы тела (фиг. 16B) на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека PDX (Meso7212), обработанной с помощью различных видов DAR MORAb-109 или эрибулина.

[0054] На фиг. 17 показан корреляционный анализ между экспрессией мезотелина (MSLN) и эффективностью *in vitro* (IC₅₀) эрибулина и MORAb-109 (DAR2 и DAR6) в различных клеточных линиях. Корреляцию для MORAb-109 (DAR2) анализировали во всей

51 клеточной линии и в подмножестве клеточных линий с более высокими уровнями экспрессии мезотелина (окрашивание FACS со средней интенсивностью флуоресценции (MFI), равной или > 80). Подмножество исключало клеточные линии с более низкими уровнями экспрессии мезотелина (окрашивание FACS с $MFI < 80$).

[0055] На фиг. 18А-С показан противоопухолевый эффект (фиг. 18А и фиг. 18В) и изменение массы тела (фиг. 18С) на модели ксенотрансплантата рака желудка человека NCI-N87, обработанной с помощью различных доз MORAb-109 (DAR2) в диапазоне от 5 мг/кг до 25 мг/кг.

[0056] На фиг. 19 показаны концентрации (мкг/мл) общего и интактного MORAb-109 (DAR2) у мышей с опухолями NCI-N87 после обработки с помощью различных доз MORAb-109 (DAR2) в диапазоне от 5 мг/кг до 25 мг/кг.

[0057] На фиг. 20А и фиг. 20В показан противоопухолевый эффект (фиг. 20А) и изменение массы тела (фиг. 20В) на модели ксенотрансплантата рака яичника человека OVCAR-3-A1-T1, обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (5 мг/кг) или эрибулина (0,1 или 3,2 мг/кг).

[0058] На фиг. 21А и фиг. 21В показан противоопухолевый эффект (фиг. 21А) и изменение массы тела (фиг. 21В) на модели PDX NSCLC человека (LC-F-25), обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (10 мг/кг) или эрибулина (0,1 или 3,2 мг/кг).

[0059] На фиг. 22А и фиг. 22В показан противоопухолевый эффект (фиг. 22А) и изменение массы тела (фиг. 22В) на модели PDX NSCLC человека (LXFA-737), обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (10 мг/кг) или эрибулина (0,2 или 3,2 мг/кг).

[0060] На фиг. 23А и фиг. 23В показан противоопухолевый эффект (фиг. 23А) и изменение массы тела (фиг. 23В) на модели ксенотрансплантата рака желудка человека NCI-N87, обработанной с помощью однократной дозы MORAb-109 (DAR2 или DAR6) в концентрации 10 мг/кг (3 мыши на группу).

[0061] На фиг. 24А и фиг. 24В показаны DAR MORAb-109 (DAR2) (фиг. 24А) или MORAb-109 (DAR6) (фиг. 24В) в образцах плазмы мышей с опухолями NCI-N87 после обработки с помощью однократной дозы MORAb-109 (DAR2 или DAR6) в концентрации 10 мг/кг.

[0062] На фиг. 25А и фиг. 25В показана цитотоксичность (% уничтожения) MORAb-109 (DAR2) (фиг. 25А) или BAY 94-9343 (фиг. 25В) на клетках рака желудка NCI-N87. Оба ADC к MSLN оценивали отдельно и в присутствии неконъюгированного антитела.

[0063] На фиг. 26А и фиг. 26В показана активность ADCC MORAb-109 (DAR2) и 345A12-HC15-LC4 (фиг. 26А) или BAY 94-9343 и анетумаба (фиг. 26В), измеренная при помощи анализа с люциферазой. Активность ADCC рассчитывали по относительной площади под кривой (AUC).

[0064] На фиг. 27 показан анализ стабильности ADC к MSLN, MORAb-109 (DAR2) и BAY 94-9343, в плазме крови мыши и человека.

[0065] На фиг. 28А и фиг. 28В показан противоопухолевый эффект (фиг. 28А) и изменение массы тела (фиг. 28В) на модели ксенотрансплантата рака желудка человека

NCI-N87, обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (5 мг/кг), BAY 94-9343 (5 мг/кг) или эрибулина (1 мг/кг).

[0066] На фиг. 29А и фиг. 29В показан противоопухолевый эффект (фиг. 29А) и изменение массы тела (фиг. 29В) на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека HAY, обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (5 мг/кг), BAY 94-9343 (5 мг/кг) или эрибулина (1 мг/кг).

[0067] На фиг. 30А и фиг. 30В показан противоопухолевый эффект (фиг. 30А) и изменение массы тела (фиг. 30В) на модели PDX мезотелиомы человека (Meso7212), обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (10 мг/кг), BAY 94-9343 (10 мг/кг), эрибулина (1 мг/кг) или DM4 (0,3 мг/кг).

[0068] На фиг. 31А и фиг. 31В показан противоопухолевый эффект (фиг. 31А) и изменение массы тела (фиг. 31В) на модели PDX NSCLC человека (LXFA-586), обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (25 мг/кг), BAY 94-9343 (DAR ~ 4) (25 мг/кг) или эрибулина (3,2 мг/кг).

[0069] На фиг. 32А и фиг. 32В показан противоопухолевый эффект (фиг. 32А) и изменение массы тела (фиг. 32В) на модели PDX NSCLC человека (LXFL-529), обработанной с помощью MORAb-109 (DAR2) (25 мг/кг), MORAb-109 (DAR2) (12,5 мг/кг), MORAb-109 (DAR2) (12,5 мг/кг, QWx3), BAY 94-9343 (DAR ~ 4) (12,5 мг/кг) или эрибулина (3,2 мг/кг).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0070] Раскрытые композиции и способы можно легче понять со ссылкой на следующее подробное описание, взятое в сочетании с сопутствующими фигурами, которые образуют часть настоящего изобретения. Следует понимать, что используемая в данном документе терминология предназначена для описания конкретных вариантов осуществления только в качестве примера и не предназначена для ограничения заявленных композиций и способов, если контекст не указывает иное.

[0071] На всем протяжении данного текста описания относятся к композициям и способам применения композиций. Если в настоящем изобретении описывается или заявляется признак или вариант осуществления, ассоциированные с композицией, такие признак или вариант осуществления равным образом приложимы к способам применения композиции. Аналогичным образом, если в настоящем изобретении описывается или заявляется признак или вариант осуществления, ассоциированные со способом применения композиции, такие признак или вариант осуществления равным образом приложимы к композиции.

[0072] Если представлен диапазон значений, он включает варианты осуществления с применением любого конкретного значения в пределах диапазона. Кроме того, ссылка на значения, изложенные в диапазоне, включает все без исключения значения в пределах данного диапазона. Все диапазоны включают свои предельные значения и являются комбинируемыми. Если значения выражены как приблизительные значения с помощью применения предшествующего слова "приблизительно", будет понятно, что конкретное

значение образует другой вариант осуществления. Ссылка на конкретное числовое значение включает по меньшей мере данное конкретное значение, если контекст явно не предусматривает иное. Применение "или" будет означать "и/или", если конкретный контекст его применения не предусматривает иное. Все ссылки, процитированные в данном документе, включены посредством ссылки для любой цели. Если ссылка и описание противоречат друг другу, то описание будет иметь преимущественную силу.

[0073] Следует понимать, что определенные признаки раскрытых композиций и способов, которые для ясности описаны в данном документе в контексте отдельных вариантов осуществления, также могут быть представлены в комбинации в одном варианте осуществления. И наоборот, различные признаки раскрытых композиций и способов, которые для краткости описаны в контексте одного варианта осуществления, также могут быть представлены по отдельности или в любой подкомбинации.

Определения

[0074] На всем протяжении настоящей заявки и формулы изобретения используются различные термины, связанные с аспектами настоящего описания. Если не указано иное, таким терминам присваивается их обычное значение из области техники. Другие специфически определяемые термины следует толковать в том смысле, который соответствует определениям, представленным в данном документе.

[0075] Применяемая в данном документе форма единственного числа включает форму множественного числа, если контекст явно не предусматривает иное.

[0076] Термины "приблизительно" или "примерно" в контексте числовых значений и диапазонов относятся к значениям или диапазонам, которые приблизительно равны описанным значениям или диапазонам или близки к ним, так что вариант осуществления можно осуществлять, как задумано, как, например, имеется требуемое количество нуклеиновых кислот или полипептидов в реакционной смеси, как очевидно специалисту в данной области на основании идей, содержащихся в данном документе. Таким образом, эти термины охватывают значения помимо тех, которые являются результатом систематической ошибки. В некоторых вариантах осуществления "приблизительно" означает плюс или минус 10% от числового количества.

[0077] Термины "конъюгат антитела и лекарственного средства" "конъюгат на основе антитела", "конъюгат", "иммуноконъюгат" и "ADC" используются взаимозаменяемо и относятся к терапевтическому соединению (например, фрагменту, представляющему собой эрибулин), которое соединено с фрагментом, представляющим собой антитело, и определяется общей формулой: $Ab-(L-D)_p$ (формула I), где Ab представляет собой фрагмент, представляющий собой антитело (например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент), L представляет собой линкерный фрагмент, D представляет собой фрагмент, представляющий собой лекарственное средство (например, фрагмент, представляющий собой лекарственное средство эрибулин), и p представляет собой число фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на фрагмент, представляющий собой антитело. В ADC, содержащих фрагмент, представляющий собой лекарственное средство

эрибулин, "p" относится к числу фрагментов, представляющих собой эрибулин, связанных с фрагментом, представляющим собой антитело. В некоторых вариантах осуществления линкер L может включать расщепляемый фрагмент, который может либо непосредственно прикрепляться к фрагменту, представляющему собой антитело, и к терапевтическому соединению, либо расщепляемый фрагмент может быть прикреплен к одному или обоим из фрагмента, представляющего собой антитело, и терапевтического соединения с помощью спейсерного(-ых) звена(-ьев). В некоторых вариантах осуществления, если спейсерное звено прикрепляет расщепляемый фрагмент к терапевтическому соединению, оно представляет собой саморасщепляющееся спейсерное звено.

[0078] Термин "антитело" применяется в самом широком смысле для обозначения молекулы иммуноглобулина, которая распознает и специфически связывается с мишенью, такой как белок, полипептид, углевод, полинуклеотид, липид или комбинации вышеуказанного, посредством по меньшей мере одного сайта распознавания антигена в пределах варибельной области молекулы иммуноглобулина. Тяжелая цепь антитела состоит из варибельного домена тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Легкая цепь состоит из варибельного домена легкой цепи (VL) и константного домена легкой цепи (CL). Для целей данной заявки каждый зрелый варибельный домен тяжелой цепи и легкой цепи содержит три определяющие комплементарность области (CDR1, CDR2 и CDR3) в пределах четырех каркасных областей (FR1, FR2, FR3 и FR4), расположенных от N-конца к С-концу: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. "Антитело" может быть встречающимся в природе или созданным человеком, таким как моноклональные антитела, полученные с помощью традиционной гибридомной технологии. Термин "антитело" включает полноразмерные моноклональные антитела и полноразмерные поликлональные антитела, а также фрагменты антител, такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела. Антитело может принадлежать к любому из пяти основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или к их подклассам (например, изотипам IgG1, IgG2, IgG3, IgG4). Термин дополнительно охватывает антитела человека, химерные антитела, гуманизированные антитела и любую модифицированную молекулу иммуноглобулина, содержащую сайт распознавания антигена, при условии, что она демонстрирует требуемую биологическую активность.

[0079] Применяемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции практически однородных антител, т. е. отдельные антитела, входящие в состав популяции, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, направлены против одного антигенного эпитопа. В отличие от этого, традиционные препараты (поликлональных) антител, как правило, включают большое разнообразие антител, направленных против (или специфических в отношении) разных эпитопов. Модификатор "моноклональный" указывает на характеристику антитела как полученного из практически однородной популяции антител и не должен

рассматриваться как требующий получения антитела с помощью какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, подлежащие применению в соответствии с настоящим изобретением, могут быть получены посредством гибридного способа, впервые описанного в Kohler et al. (1975) Nature 256:495, или могут быть получены посредством способов рекомбинантной ДНК (см., например, патент США № 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговых библиотек антител с использованием способов, описанных в Clackson et al. (1991) Nature 352:624-8 и Marks et al. (1991) J. Mol. Biol. 222:581-97, к примеру.

[0080] Моноклональные антитела, описанные в данном документе, в частности, включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепей идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от конкретного вида или принадлежащих к конкретному классу или подклассу антител, в то время как остальная часть цепи(-ей) идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных от другого вида или принадлежащих к другому классу или подклассу антител, а также фрагменты таких антител, при условии, что они специфически связывают антиген-мишень и/или проявляют требуемую биологическую активность.

[0081] Применяемый в данном документе термин "химерное антитело" относится к антителам, в которых аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина получена от двух или более видов. В некоторых случаях переменные области обеих тяжелой и легкой цепей соответствуют переменным областям антител, полученных от одного вида с требуемой специфичностью, аффинностью и активностью, в то время как константные области гомологичны антителам, полученным от другого вида (например, человека), чтобы минимизировать иммунный ответ у последнего вида.

[0082] Используемый в данном документе термин "гуманизированное антитело" означает формы антител, которые содержат последовательности из антител, отличных от антител человека (например, кролика), а также антител человека. Такие антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина, отличного от иммуноглобулина человека. В целом, гуманизированное антитело будет содержать практически весь из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все из гиперпеременных петель соответствуют петлям иммуноглобулина, отличного от иммуноглобулина человека, а все или практически все из каркасных областей (FR) представляют собой каркасные области из последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также будет содержать по меньшей мере часть константной области (Fc) иммуноглобулина, как правило, часть константной области иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело может быть дополнительно модифицировано посредством замены остатков в каркасной области Fv и/или в пределах замененных остатков, отличных от человеческих, для улучшения и оптимизации специфичности, аффинности и/или активности антитела.

[0083] Используемый в данном документе термин "антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающий домен" или "антигенсвязывающая часть" антитела относится к одному или нескольким фрагментам антитела или белка, которые сохраняют способность специфично связываться с антигеном (например, мезотелином). Антигенсвязывающие фрагменты также могут сохранять способность к интернализации в клетку, экспрессирующую антиген. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие фрагменты также сохраняют иммунную эффекторную активность. Было показано, что фрагменты полноразмерного антитела способны выполнять антигенсвязывающую функцию полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий фрагмент", "антигенсвязывающий домен" или "антигенсвязывающая часть" антитела включают (i) Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из VL-, VH-, CL- и CH1-доменов; (ii) F(ab')₂-фрагмент, двухвалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) Fd-фрагмент, состоящий из VH- и CH1-доменов; (iv) Fv-фрагмент, состоящий из VL- и VH-доменов одного плеча антитела; (v) dAb-фрагмент, который содержит один переменный домен, например VH-домен (см., например, Ward et al. (1989) *Nature* 341:544-6 и международную публикацию № WO 1990/005144); и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR). Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, VL и VH, кодируются отдельными генами, с применением рекомбинантных способов они могут быть соединены с помощью синтетического линкера, который позволяет получать их как единую белковую цепь, в которой области VL и VH формируют пару с образованием одновалентной молекулы (известной как одноцепочечный Fv (scFv)). См., например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-6 и Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83. Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антигенсвязывающий фрагмент" или "антигенсвязывающая часть" антитела, и они известны из уровня техники как иллюстративный тип связывающего фрагмента, который может подвергаться интернализации в клетки после связывания (см., например, Zhu et al. (2010) 9:2131-41; He et al. (2010) *J. Nucl. Med.* 51:427-32 и Fitting et al. (2015) *MAbs* 7:390-402). В определенных вариантах осуществления молекулы scFv могут быть включены в слитый белок. Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой бивалентные биспецифические антитела, у которых VH- и VL-домены экспрессируются в виде одной полипептидной цепи, но с применением линкера, который слишком короткий, чтобы позволить образование пар между двумя доменами в одной цепи, что, таким образом, заставляет домены образовывать пары с комплементарными доменами другой цепи и создавать два антигенсвязывающих сайта (см., например, Holliger et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-8 и Poljak et al. (1994) *Structure* 2:1121-3). Антигенсвязывающие фрагменты получают с применением традиционных методик, известных специалистам в данной области, и связывающие фрагменты подвергают скринингу в отношении применимости (например, аффинности связывания, интернализации) так же, как и интактные антитела. Антигенсвязывающие

фрагменты можно получать путем расщепления интактного белка, например с помощью протеазы или химического расщепления.

[0084] "Интернализирующиеся", как применяется в данном документе при ссылке на антитело или антигенсвязывающий фрагмент, относится к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, которые могут захватываться через липидную бислойную мембрану клетки во внутренний компартмент (т. е. "подвергаться интернализации") после связывания с клеткой, предпочтительно в компартмент деградации в клетке. Например, интернализирующееся антитело к мезотелину представляет собой антитело, которое может захватываться в клетку после связывания с мезотелином на клеточной мембране. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, применяемые в ADC, раскрытых в данном документе, целенаправленно воздействуют на антиген клеточной поверхности (например, мезотелин) через интернализирующееся антитело или интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент (давая возможность ADC транспортироваться через клеточную мембрану после связывания антигена).

[0085] Применяемый в данном документе термин "мезотелин" или "MSLN" относится к любой нативной форме мезотелина (MSLN) человека. Термин охватывает полноразмерный мезотелин (например, эталонную последовательность в NCBI: AAC50348.1), а также любую форму мезотелина человека, которая может возникать в результате процессинга в клетке. Этот термин также охватывает встречающиеся в природе варианты мезотелина, включая без ограничения варианты сплайсинга, аллельные варианты и изоформы. Мезотелин может быть выделен из клеток человека или может быть получен рекомбинантным путем или с помощью способов синтеза. Термин может также охватывать любой синтетический вариант, с которым может специфически связываться антитело, например антитело, раскрытое в данном документе, и/или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину.

[0086] Термин "антитело к мезотелину" или "антитело, которое специфически связывает мезотелин" означает любую форму антитела или его фрагмента, которая специфически связывает мезотелин, и охватывает моноклональные антитела (включая полноразмерные моноклональные антитела), поликлональные антитела и биологически функциональные фрагменты антител, при условии, что они специфически связывают мезотелин. В некоторых вариантах осуществления антитело к мезотелину, применяемое в ADC, раскрытых в данном документе, представляет собой интернализирующееся антитело или интернализирующийся фрагмент антитела. 345A12 (например, 345A12-HC15-LC4) и 102A6A2 представляют собой иллюстративные интернализирующиеся антитела к мезотелину человека. Используемые в данном документе термины "специфический", "специфически связывает" и "связывается специфически" относятся к селективному связыванию антитела с эпитопом антигена-мишени. Антитела можно тестировать в отношении специфичности связывания путем сравнения связывания с соответствующим антигеном со связыванием с нерелевантным антигеном или смесью антигенов при определенном наборе условий. Если

антитело связывается с соответствующим антигеном с аффинностью, превышающей в по меньшей мере 2, 5, 7 или 10 или более раз аффинность к нерелевантному антигену или к смеси антигенов, то считается, что оно является специфическим. "Специфическое антитело" или "мишень-специфическое антитело" представляет собой антитело, которое связывается только с антигеном-мишенью (например, мезотелином), но не связывается (или проявляет минимальное связывание) с другими антигенами.

[0087] Термин "эпитоп" относится к части антигена, которую может распознавать антитело или специфически связываться с ней. Если антиген представляет собой полипептид, эпитопы могут быть образованы из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, приводимых в соприкосновение за счет третичной укладки полипептида. Эпитоп, связываемый антителом, может быть идентифицирован с применением любой методики картирования эпитопов, известной из уровня техники, включая рентгеноструктурную кристаллографию для идентификации эпитопов путем непосредственной визуализации комплекса антиген-антитело, а также отслеживания связывания антитела с фрагментами или мутированными вариантами антигена или отслеживание доступа растворителя к разным частям антитела и антигена. Иллюстративные стратегии, применяемые для картирования эпитопов антитела, включают без ограничения олигопептидное сканирование на основе массива, ограниченный протеолиз, сайт-направленный мутагенез, высокопроизводительное картирование на основе мутагенеза, водород-дейтериевый обмен и масс-спектрометрию (см., например, Gershoni et al. (2007) 21:145-56 и Hager-Braun and Tomer (2005) *Expert Rev. Proteomics* 2:745-56).

[0088] Для определения антител, совместно связывающих идентичные или перекрывающиеся эпитопы, также можно применять конкурентное связывание и эпитоп-специфическую сортировку. Конкурентное связывание может оцениваться с применением анализ перекрестного блокирования, такого как анализ, описанный в "Antibodies, A Laboratory Manual", Cold Spring Harbor Laboratory, Harlow and Lane (1^{oe} изд. 1988, 2^{oe} изд. 2014). В некоторых вариантах осуществления конкурентное связывание идентифицируется, если тестируемое антитело или связывающий белок снижают степень связывания эталонного антитела или связывающего белка с антигеном-мишенью, таким как мезотелин (например, связывающего белка, содержащего CDR и/или переменные домены, выбранные из идентифицированных в таблицах 1-3), на по меньшей мере приблизительно 50% в анализе перекрестного блокирования (например, на 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99%, 99,5% или больше, или на любой процент между ними) и/или наоборот. В некоторых вариантах осуществления конкурентное связывание может быть обусловлено общими или подобными (например, частично перекрывающимися) эпитопами или обусловлено стерическим несоответствием, при котором антитела или связывающие белки связываются на близкорасположенных эпитопах (см., например, Tzartos, *Methods in Molecular Biology* (Morris, ed. (1998) vol. 66, pp. 55-66)). В некоторых вариантах осуществления конкурентное связывание можно использовать для сортировки групп

связывающих белков, которые имеют аналогичные эпитопы. Например, связывающие белки, которые конкурируют за связывание, могут быть "отсортированы" как группа связывающих белков, которые имеют перекрывающиеся или близкорасположенные эпитопы, в то время как белки, которые не конкурируют, помещают в отдельную группу связывающих белков, которые не имеют перекрывающихся или близкорасположенных эпитопов.

[0089] Термин " k_{on} " или " k_a " означает константу скорости ассоциации в случае ассоциации антитела с антигеном с образованием комплекса антитело/антиген. Скорость может быть определена с применением стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия или ELISA-анализ.

[0090] Термин " k_{off} " или " k_d " означает константу скорости диссоциации в случае диссоциации антитела из комплекса антитело/антиген. Скорость может быть определена с применением стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия или ELISA-анализ.

[0091] Термин " K_D " означает равновесную константу диссоциации для конкретного взаимодействия антитело-антиген. K_D рассчитывают как k_d/k_a . Скорость может быть определена с применением стандартных анализов, таких как поверхностный плазмонный резонанс, биослойная интерферометрия или ELISA-анализ.

[0092] Термин " p ", или "нагрузка лекарственным средством", или "отношение лекарственное средство:антитело", или "соотношение лекарственного средства и антитела", или "DAR" относится к числу фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на фрагмент, представляющий собой антитело, т. е. нагрузке лекарственным средством, или количеству фрагментов, представляющих собой -L-D, на антитело или антигенсвязывающий фрагмент (Ab) в ADC формулы (I). В ADC, содержащих фрагмент, представляющий собой лекарственное средство эрибулин, " p " относится к числу фрагментов, представляющих собой эрибулин, связанных с фрагментом, представляющим собой антитело. Например, если два фрагмента эрибулина связаны с фрагментом, представляющим собой антитело, то $p=2$. В композициях, содержащих множество копий ADC формулы (I), "среднее значение p " относится к среднему числу фрагментов, представляющих собой -L-D, на антитело или антигенсвязывающий фрагмент в популяции ADC, также называемому "средняя нагрузка лекарственным средством".

[0093] "Линкер" или "линкерный фрагмент" применяют в данном документе для обозначения любого химического фрагмента, который способен ковалентно соединить соединение, обычно фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, такое как эрибулин, с другим фрагментом, таким как фрагмент, представляющий собой антитело. Линкеры могут быть восприимчивыми или в значительной степени устойчивыми к индуцированному кислотой расщеплению, индуцированному пептидазой расщеплению, расщеплению на основе света, индуцированному эстеразой расщеплению и/или расщеплению дисульфидной связи в условиях, при которых соединение или антитело остается активным.

[0094] Термин "средство" применяют в данном документе для обозначения химического соединения, смеси химических соединений, биологической макромолекулы или экстракта, полученного из биологических материалов. Термин "терапевтическое средство" или "лекарственное средство" относится к средству, которое способно модулировать биологический процесс и/или обладает биологической активностью. Мономер эрибулина, описанный в данном документе, представляет собой иллюстративное терапевтическое средство.

[0095] Термин "химиотерапевтическое средство" или "противораковое средство" применяют в данном документе для обозначения средств, которые являются эффективными в лечении рака, независимо от механизма действия. Ингибирование метастазирования или ангиогенеза зачастую является характерной особенностью химиотерапевтического средства. Химиотерапевтические средства включают антитела, биологические молекулы и малые молекулы и охватывают эрибулин, описанный в данном документе. Химиотерапевтическое средство может быть цитотоксическим или цитостатическим средством. Термин "цитостатическое средство" относится к средству, которое ингибирует или подавляет клеточный рост и/или размножение клеток. Термин "цитотоксическое средство" относится к веществу, которое вызывает гибель клеток в первую очередь за счет вмешательства в активность экспрессии и/или функционирование клетки.

[0096] Термин "эрибулин" или "мономер эрибулина", используемый в данном документе, относится к синтетическому аналогу галихондрина В, макроциклического соединения, которое первоначально было выделено из морской губки *Halichondria okadae*. Эрибулин является ингибитором динамики микротрубочек, который, как считается, связывает тубулин и вызывает остановку клеточного цикла в фазе G2/M путем ингибирования сборки митотического веретена. Термин "эрибулина мезилат" относится к мезилатной соли эрибулина, которая поступает в продажу под торговым названием Halaven™. Иллюстративные аналоги эрибулина включают аналоги, показанные и описанные в патенте США № 6214865 и патенте США № 6653341, которые включены в данный документ посредством ссылки для раскрытых структур эрибулина и способов синтеза этих структур.

[0097] Термин "димер эрибулина", используемый в данном документе, относится к димерной форме эрибулина, в которой два мономера эрибулина связаны посредством ковалентной или нековалентной связи либо непосредственно, либо с помощью химического линкера (например, вторичного амина, вторичного амина дигидроксила). В некоторых вариантах осуществления димеры эрибулина могут состоять из двух мономеров эрибулина, ковалентно связанных в положении C-34 вторичным амином, или двух мономеров эрибулина, ковалентно связанных в положении C-35 вторичным амином дигидроксила. Димер эрибулина, состоящий из двух мономеров эрибулина, ковалентно связанных в положении C-34 вторичным амином, может быть обозначен в данном документе как "димер эрибулина desOH". Димер эрибулина, состоящий из двух мономеров эрибулина, ковалентно связанных в положении C-35 вторичным амином дигидроксила,

может быть обозначен в данном документе как "димер эрибулина diOH". Термин "фрагмент, представляющий собой лекарственное средство на основе димера эрибулина" относится к компоненту ADC или композиции, которая обеспечивает структуру димера эрибулина, например к компоненту димера эрибулина (D) в ADC формулы (I) или к композиции, содержащей -L-D. В некоторых вариантах осуществления димер эрибулина desOH и/или димер эрибулина diOH обеспечивает улучшенную конъюгируемость по сравнению с другими форматами димера эрибулина.

[0098] Термин "криптофицин", используемый в данном документе, относится к криптофицину-1, макролидному соединению, которое первоначально было выделено из цианобактерии *Nostoc*, или к любому его синтетическому аналогу, сохраняющему противотубулиновую активность. Иллюстративные аналоги криптофицина включают аналоги, показанные и описанные в международной публикации № WO 2017/136769, которая включена в данный документ посредством ссылки для всех раскрытых в ней структур криптофицина и способов синтеза этих структур. Термин "фрагмент, представляющий собой лекарственное средство на основе криптофицина" относится к компоненту ADC или композиции, которая имеет структуру криптофицина.

[0099] Термин "гомолог" относится к молекуле, которая проявляет гомологию с другой молекулой, например имеет последовательности химических остатков, которые являются такими же или аналогичными в соответствующих положениях.

[00100] Применяемый в данном документе термин "ингибировать" или "ингибирование" означает снижение измеряемого количества и может включать, но это не обязательное требуется, полное предотвращение или ингибирование.

[00101] Термин "неспецифическое уничтожение" или "неспецифический эффект" относится к уничтожению отрицательных в отношении мишени клеток в присутствии положительных в отношении мишени клеток, где уничтожение отрицательных в отношении мишени клеток не наблюдается в отсутствие положительных в отношении мишени клеток. Межклеточный контакт или по меньшей мере близость между положительными в отношении мишени и отрицательными в отношении мишени клетками делает возможным неспецифическое уничтожение. Данный тип уничтожения отличим от "нецелевого уничтожения", которое относится к неизбирательному уничтожению отрицательных в отношении мишени клеток. "Нецелевое уничтожение" может наблюдаться в отсутствие положительных в отношении мишени клеток.

[00102] Термин "рак" относится к физиологическому состоянию у млекопитающих, при котором популяция клеток характеризуется нерегулируемым клеточным ростом. Примеры рака включают без ограничения карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Конкретные примеры таких видов рака включают виды рака, при которых экспрессируется мезотелин, такие как мезотелиома, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого), рак яичника (например, серозный, светлоклеточный или эпителиальный рак яичника), рак поджелудочной железы, рак

предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, рак уротелия, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

[00103] Термины "опухоль" и "неоплазма" относятся к любой массе ткани, которая образуется в результате избыточного роста или пролиферации клеток, либо доброкачественной, либо злокачественной, включая предраковые очаги.

[00104] Термины "опухолевая клетка" относятся к отдельным клеткам или к общей популяции клеток, полученной из опухоли, включая как неканцерогенные клетки, так и раковые стволовые клетки. Применяемый в данном документе термин "опухолевая клетка" будет модифицирован с помощью термина "неканцерогенная", когда он относится исключительно к тем опухолевым клеткам, у которых отсутствует способность обновляться и дифференцироваться, чтобы отличать эти опухолевые клетки от раковых стволовых клеток.

[00105] Термины "субъект" и "пациент" используются взаимозаменяемо в данном документе для обозначения любого животного, такого как любое млекопитающее, включая без ограничения человека, отличных от человека приматов, грызунов и т. п. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является мышью. В некоторых вариантах осуществления млекопитающее является человеком.

[00106] "Фармацевтическая композиция" относится к препарату, который находится в такой форме, которая допускает введение и впоследствии обеспечивает предусмотренную биологическую активность активного (активных) ингредиента (ингредиентов) и/или достижение терапевтического эффекта и которая не содержит дополнительных компонентов, являющихся недопустимо токсичными для субъекта, которому состав будет вводиться. Фармацевтическая композиция может быть стерильной.

[00107] "Фармацевтическое вспомогательное вещество" предусматривает материал, такой как адъювант, носитель, pH-регулирующие и буферные средства, регулирующие тоничность средства, смачивающие средства, консервант и т. п.

[00108] "Фармацевтически приемлемый" означает одобренный или тот, который может быть одобрен, органом регулирования Федерального правительства или правительства штата, или перечисленный в фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и более конкретно у человека.

[00109] "Эффективное количество", например, антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC, которые раскрыты в данном документе, представляет собой количество, достаточное для выполнения конкретно заявленной цели, например для получения терапевтического эффекта после введения, такого как снижение скорости роста опухоли или объема опухоли, уменьшение степени проявления симптома рака или некоторые другие показатели эффективности лечения. Эффективное количество можно определять традиционным образом с учетом поставленной цели. Термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC, эффективному для лечения заболевания или нарушения у субъекта. В случае рака терапевтически эффективное количество антитела, антигенсвязывающего

фрагмента и/или ADC может снижать количество раковых клеток, уменьшать размер опухоли, подавлять (например, замедлять или останавливать) метастазирование опухоли, ингибировать (например, замедлять или останавливать) рост опухоли и/или облегчать один или несколько симптомов. "Профилактически эффективное количество" означает количество, при необходимых дозах и в течение необходимых периодов времени эффективное в достижении требуемого профилактического результата. Как правило, поскольку профилактическую дозу используют у субъектов до проявления заболевания или на более ранней стадии заболевания, профилактически эффективное количество будет меньшим терапевтически эффективного количества.

[00110] Используемые в данном документе "лечить" или "терапевтический" и грамматически родственные термины означают любое улучшение любого последствия заболевания, такое как продление выживания, меньшая заболеваемость и/или уменьшение побочных эффектов, которые являются побочными продуктами альтернативного терапевтического способа воздействия. Из уровня техники легко понять, что полное устранение заболевания охватывается лечебным действием, но не требуется для него. Используемые в данном документе термины "лечение" или "лечить" относятся к введению описанного антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC субъекту, например пациенту. Лечение может представлять собой излечение, заживление, смягчение, ослабление, изменение, устранение, облегчение, временное ослабление, улучшение или воздействие на нарушение, симптомы нарушения или предрасположенность к нарушению, например раку. В некоторых вариантах осуществления в дополнение к лечению субъекта, у которого имеется состояние, композицию, раскрытую в данном документе, также можно давать профилактически для предотвращения или снижения вероятности развития данного состояния.

[00111] В некоторых вариантах осуществления используют меченое антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC. Подходящие "метки" включают радионуклиды, ферменты, субстраты, кофакторы, ингибиторы, флуоресцентные фрагменты, хемилюминесцентные фрагменты, магнитные частицы и т. п.

[00112] Под применяемым в данном документе "белком" подразумевают по меньшей мере две ковалентно связанные аминокислоты. Термин охватывает полипептиды, олигопептиды и пептиды. В некоторых вариантах осуществления две или более ковалентно связанные аминокислоты связаны посредством пептидной связи. Белок может быть составлен из встречающихся в природе аминокислот и пептидных связей, например, когда белок получают рекомбинантным образом с применением систем экспрессии и клеток-хозяев. В качестве альтернативы белок может включать синтетические аминокислоты (например, гомофенилаланин, цитруллин, орнитин и норлейцин). "Рекомбинантный белок" представляет собой белок, полученный с применением рекомбинантных методик с применением любых методик и способов, известных из уровня техники, т. е. вследствие экспрессии рекомбинантной нуклеиновой кислоты. Способы и методики получения рекомбинантных белков широко известны из уровня техники.

[00113] В случае аминокислотных последовательностей идентичность и/или сходство последовательности могут быть определены с применением стандартных методик, известных из уровня техники, включая без ограничения алгоритм локальной идентичности последовательностей из Smith and Waterman (1981) *Adv. Appl. Math.* 2:482, алгоритм выравнивания идентичности последовательностей из Needleman and Wunsch (1970) *J. Mol. Biol.* 48:443, способ поиска подобия из Pearson and Lipman (1988) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85:2444, компьютеризированные реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в программном пакете Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Медисон, штат Висконсин, США), программу Best Fit sequence, описанную Devereux et al. (1984) *Nucl. Acid Res.* 12:387-95, например, с использованием настроек по умолчанию или путем проверки. В некоторых вариантах осуществления процент идентичности рассчитывают с помощью FastDB на основе следующих параметров: штраф за несовпадение - 1; штраф за гэп - 1; штраф за удлинение гэпа - 0,33 и штраф за соединение - 30 ("Current Methods in Sequence Comparison and Analysis", *Macromolecule Sequencing and Synthesis, Selected Methods and Applications*, pp. 127-149 (1988), Alan R. Liss, Inc).

[00114] Обычно гомология аминокислот, сходство или идентичность между белками, раскрытыми в данном документе, и их вариантами, включая варианты антигенов-мишеней (таких как мезотелин), варианты последовательностей тубулина и варианты переменных доменов антител (включая отдельные варианты CDR), составляет по меньшей мере 80% с последовательностями, изображенными в данном документе, например показатели гомологии или идентичности составляют по меньшей мере 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, почти 100% или 100%.

[00115] Аналогичным образом, "процент (%) идентичности последовательности нуклеиновой кислоты" в отношении последовательности нуклеиновой кислоты антител и других белков, идентифицированных в данном документе, определяется как процент нуклеотидных остатков в кандидатной последовательности, которые идентичны нуклеотидным остаткам в кодирующей последовательности антигенсвязывающего белка. В специфическом способе используется модуль BLASTN из WU-BLAST-2, установленный на параметры по умолчанию, при этом длина перекрытия и доля перекрытия установлены на 1 и 0,125 соответственно.

[00116] Поскольку сайт или область введения вариации аминокислотной последовательности предварительно определены, то мутацию саму по себе не нужно предварительно определять. Например, чтобы оптимизировать свойства мутации в заданном сайте, в кодоне- или области-мишени можно выполнять случайный мутагенез, а экспрессированные варианты CDR антигенсвязывающих белков подвергать скринингу в отношении оптимальной комбинации требуемой активности. Широко известны методики получения мутаций, представляющих собой замены в предварительно определенных сайтах в ДНК с известной последовательностью, например мутагенез с праймером МПЗ и ПЦР-мутагенез.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты к мезотелину

[00117] Настоящее изобретение в различных вариантах осуществления относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, способным связывать и/или уничтожать опухолевые клетки (например, опухолевые клетки, экспрессирующие мезотелин), а также к их применению в конъюгатах и терапевтических композициях.

[00118] В некоторых вариантах осуществления антитела можно использовать отдельно, вводить как часть фармацевтических композиций или комбинированных видов лечения и/или в виде фрагмента, представляющего собой антитело, в ADC. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты к мезотелину, раскрытые в данном документе, применимы сами по себе (т. е. в неконъюгированной форме) и в качестве фрагмента, представляющего собой антитело, в ADC. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты к мезотелину являются гуманизированными. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты к мезотелину содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и сохраняют реактивность антитела, не являющегося человеческим (например, кроличьего), будучи менее иммуногенными для человека. В некоторых вариантах осуществления антитела и антигенсвязывающие фрагменты к мезотелину, раскрытые в данном документе, обеспечивают одно или несколько из улучшенной стабильности, возможности получения составов, агрегации, аффинности связывания, терапевтической эффективности, нецелевой токсичности и/или метаболического профиля по сравнению с одним или несколькими антителами к мезотелину, известными специалистами в данной области.

[00119] В различных вариантах осуществления антитела или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, специфически связываются с мезотелином, например, экспрессированным на раковой клетке. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент может связываться с антигеном-мишенью с константой диссоциации (K_D), составляющей ≤ 1 мМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ или любое значение между ними, измеренной, например, с помощью анализа BIAcore®. В определенных вариантах осуществления K_D составляет от 1 пМ до 500 пМ. В некоторых вариантах осуществления K_D составляет от 500 пМ до 1 мкМ, от 1 мкМ до 100 нМ или от 100 мМ до 10 нМ.

[00120] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, представляет собой четырехцепочечное антитело (также называемое иммуноглобулином), содержащее две тяжелые цепи и две легкие цепи. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, представляет собой двухцепочечное полуантитело (одна легкая цепь и одна тяжелая цепь) или антигенсвязывающий фрагмент иммуноглобулина.

[00121] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, представляет собой интернализирующееся антитело или его интернализирующийся

антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления интернализирующееся антитело или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент связываются с раковым антигеном-мишенью, экспрессированным на поверхности клетки, и попадают в клетку после связывания. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство эрибулин, в ADC высвобождается от фрагмента, представляющего собой антитело, ADC после того, как ADC попадет и будет находиться в клетке, экспрессирующей раковый антиген-мишень (т. е. после того, как ADC подвергся интернализации).

[00122] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, могут содержать парный набор переменных доменов тяжелой и легкой цепей, взятых из доменов, перечисленных в таблицах 3-5, или набор из шести последовательностей CDR из парного набора тяжелой и легкой цепей, например набор CDR, перечисленных в таблицах 1-2. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат каркасы тяжелой и легкой цепей человека (необязательно с одной или несколькими обратными мутациями для улучшения аффинности связывания) и/или константные домены тяжелой и легкой цепей человека или их фрагменты. Например, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать константный домен тяжелой цепи IgG человека (такого как IgG1) и константный домен легких каппа- или лямбда-цепей человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи иммуноглобулина G подтипа 1 (IgG1) человека и константный домен легкой каппа-цепи Ig человека.

[00123] Аминокислотные последовательности и последовательности нуклеиновых кислот иллюстративных антител по настоящему изобретению представлены в таблицах 1-10.

Таблица 1. Аминокислотные последовательности CDR по Kabat для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
345A12-HC15-LC4	HC CDR1	1	SYAMS
	HC CDR2	2	VIDISGNRFYADWVKG
	HC CDR3	3	VDSRAWGPFNL
	LC CDR1	4	QASQSIFSILA
	LC CDR2	5	DASDLAS
	LC CDR3	6	QQGYTRSDVDNA

Таблица 2. Аминокислотные последовательности CDR по IMGT для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
345A12-HC15-	HC CDR1	7	GIDLSSYA

LC4	HC CDR2	8	IDISGNR
	HC CDR3	9	ARVDSRAWGPFNL
	LC CDR1	10	QSIFSY
	LC CDR2	11	DAS
	LC CDR3	12	QQGYTRSDVDNA

Таблица 3. Аминокислотные последовательности переменных областей для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
345A12- HC15-LC4	Тяжелая цепь	13	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGIDLS SYAMSWVRQAPGKGLEWIGVIDISGNRFYA DWVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLRAEDT AVYYCARVDSRAWGPFNLWGQGTLVTVSS
	Легкая цепь	14	DYQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASQSIFS YLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQCEDAATYYCQQGY TRSDVDNAFGGGTKVEIK

Таблица 4. Аминокислотные последовательности константных областей для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	Константная область	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
345A12- HC15-LC4	Тяжелая цепь	IgG1 человека	15	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHK PSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь	Каппа- цепь Ig	16	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE

		человека		QDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
--	--	----------	--	--

Таблица 5. Аминокислотные последовательности цепей полноразмерного антитела Ig для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Аминокислотная последовательность
345A12-HC15-LC4	Тяжелая цепь	17	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGIDL SSYAMSWVRQAPGKGLEWIGVIDISGNRF YADWVKGRFTISRDN SKNTLYLQMSSLR AEDTAVYYCARVDSRAWGPFNLWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK
	Легкая цепь	18	DYQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQSI SYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASDLASGV PSRFSGSGSGTDFTLTISLQCEDAATYYC QQGYTRSDVDNAFGGGTKVEIKRTVAAP SVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC

Таблица 6. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CDR по Kabat для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Последовательность нуклеиновой кислоты
345A12-HC15-	HC CDR1	19	TCCTACGCCATGTCC

LC4	HC CDR2	20	GTGATCGACATCTCCGGCAACCGGTTCT ACGCCGACTGGGTGAAGGGC
	HC CDR3	21	GTGGACTCTAGAGCCTGGGGCCCCTTCA ACCTG
	LC CDR1	22	CAGGCCTCCCAGTCCATCTTCTCCTACCT GGCC
	LC CDR2	23	GACGCCTCTGATCTGGCCTCC
	LC CDR3	24	CAGCAGGGCTACACCAGATCCGACGTG GACAACGCC

Таблица 7. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие CDR по IMGT для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Последовательность нуклеиновой кислоты
345A12-HC15-LC4	CDR1 HC	25	GGAATCGACCTGTCCTCCTACGCC
	CDR2 HC	26	ATCGACATCTCCGGCAACCGG
	CDR3 HC	27	GCCAGAGTGGACTCTAGAGCCTGGGGC CCCTTCAACCTG
	CDR1 LC	28	CAGTCCATCTTCTCCTAC
	CDR2 LC	29	GACGCCTCT
	CDR3 LC	30	CAGCAGGGCTACACCAGATCCGACGTG GACAACGCC

Таблица 8. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие переменные области для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Последовательность нуклеиновой кислоты
345A12-HC15-LC4	Тяжелая цепь	31	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGTGGCGG AGTGGTGCAGCCTGGCAGATCCCTGAGAC TGTCTTGTGCCGCTCCGGAATCGACCTG TCCTCCTACGCCATGTCCTGGGTGCGACA GGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAATGGATCG GCGTGATCGACATCTCCGGCAACCGGTTT TACGCCGACTGGGTGAAGGGCCGGTTTAC CATCTCCAGAGACAACTCCAAGAACACCC TGTACCTCCAGATGTCCTCCCTGCGGGCC GAGGATACCGCCGTGTACTACTGCGCCAG AGTGGACTCTAGAGCCTGGGGCCCCTTCA

			ACCTGTGGGGCCAGGGAACACTCGTGACC GTGTCCTCT
	Легкая цепь	32	GATTACCAGATGACCCAGTCCCCCTCCAG CCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGTGA CCATCACCTGTCAGGCCTCCCAGTCCATC TTCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAA GCCCCGGAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCT ACGACGCCTCTGATCTGGCCTCCGGCGTG CCCTCTAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGC ACCGACTTTACCCTGACCATCAGCTCCCT CCAGTGCGAGGATGCCGCCACCTACTACT GCCAGCAGGGCTACACCAGATCCGACGTG GACAACGCCTTTGGCGGAGGCACCAAGGT GGAAATCAAA

Таблица 9. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие константные области для антитела к мезотелину

mAb	Цепь IgG	Констан тная область	SEQ ID	Последовательность нуклеиновой кислоты
345A12- HC15-LC4	Тяжелая цепь	IgG1 человека	33	GCATCCACCAAGGGCCCATCGGTCTT CCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCA CCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCG AACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCTC AGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGAC ACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTC AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGG TGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGC ACCCAGACCTACATCTGCAACGTGA ATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGT GGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCT TGTGACAAAACCTCACACATGCCAC CGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGG GGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCC CAAAACCCAAGGACACCCTCATGAT

				CTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCG TGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGA CCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGC CAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGAC TGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGT GCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCC AGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCC AAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCC CGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGG TCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGC TTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGA GTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAG AACAACTACAAGACCACGCCTCCCG TGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTC TTATATTCAAAGCTCACCGTGGACAA GAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTC TTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGC TCTGCACAACCACTACACGCAGAAG AGCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAATG A
	Легкая цепь	Каппа- цепь Ig человека	34	CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTT CATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGT TGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTG TGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAG AGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTG GATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGAC AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGC AGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCC

				TGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTC AACAGGGGAGAGTGTTGA
--	--	--	--	--

Таблица 10. Последовательности нуклеиновых кислот, кодирующие цепи полноразмерного антитела Ig для антитела к мезотелину⁺

mAb	Цепь IgG	SEQ ID	Последовательность нуклеиновой кислоты
345A12-HC15-LC4	Тяжелая цепь	35	CAGGTGCAGCTGGTGGGAATCTGGTGGCG GAGTGGTGCAGCCTGGCAGATCCCTGAG ACTGTCTTGTGCCGCCTCCGGAATCGAC CTGTCTCCTACGCCATGTCCTGGGTGC GACAGGCTCCTGGCAAGGGCCTGGAAT GGATCGGCGTGATCGACATCTCCGGCAA CCGGTTCTACGCCGACTGGGTGAAGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAACCTCCA AGAACACCCTGTACCTCCAGATGTCCTC CCTGCGGGCCGAGGATACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGAGTGGACTCTAGAGCCT GGGGCCCCTTCAACCTGTGGGGCCAGGG AACACTCGTGACCGTGTCCTCTGCATCC ACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGG CACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGG CACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAG GACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCG GCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACA GTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAA TCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGA CAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACCTACACATGCCACCGTGCCCAG CACCTGAACCTCCTGGGGGGACCGTCAGT CTTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGAC ACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGG TCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCA

			CGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGG TACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAG TACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCG TCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCT GAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGT CTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATC GAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGG CAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGT CAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCC GTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCG GAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTT ATATTCAAAGCTCACCGTGGACAAGAGC AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCAT GCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAA CCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTG TCTCCCGGGAAATGA
	Легкая цепь	36	GATTACCAGATGACCCAGTCCCCCTCCA GCCTGTCCGCTTCTGTGGGCGACAGAGT GACCATCACCTGTCAGGCCTCCCAGTCC ATCTTCTCCTACCTGGCCTGGTATCAGC AGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGC TGATCTACGACGCCTCTGATCTGGCCTC CGGCGTGCCCTCTAGATTCTCCGGCTCT GGCTCTGGCACCGACTTTACCCTGACCA TCAGCTCCCTCCAGTGCGAGGATGCCGC CACCTACTACTGCCAGCAGGGCTACACC AGATCCGACGTGGACAACGCCTTTGGCG GAGGCACCAAGGTGGAAATCAAACGAA CTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTC CCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAA

			TAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTA CAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAAT CGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAG AGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACA GCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTA CGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTG AGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACA GGGGAGAGTGTTGA
--	--	--	--

⁺ Перечисленные последовательности нуклеиновых кислот не включают лидерные последовательности.

[00124] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, связываются с мезотелином человека и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest).

[00125] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в данном документе, связываются с мезотелином человека и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT.

[00126] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержит три CDR тяжелой цепи и три CDR легкой цепи, где CDR предусматривают не более одного, двух, трех, четырех, пяти или шести аминокислотных добавлений, делеций или замен в HCDR1 (SEQ ID NO: 1 в соответствии с Kabat или SEQ ID NO: 7 в соответствии с IMGT), HCDR2 (SEQ ID NO: 2 в соответствии с Kabat или SEQ ID NO: 8 в соответствии с IMGT), HCDR3 (SEQ ID NO: 3 в соответствии с Kabat или SEQ ID NO: 9 в соответствии с IMGT) и LCDR1 (SEQ ID NO: 4 в соответствии с Kabat или SEQ ID NO: 10 в соответствии с IMGT), LCDR2 (SEQ ID NO: 5 в соответствии с Kabat или SEQ ID NO: 11 в соответствии с IMGT) и LCDR3 (SEQ ID NO: 6 в соответствии с Kabat или SEQ ID NO: 12 в соответствии с IMGT).

[00127] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину являются гуманизированными. В некоторых вариантах

осуществления антитело и антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат минимальные последовательности, полученные из иммуноглобулина, не являющегося человеческим, и сохраняют реактивность антитела, не являющегося человеческим (например, кроличьего), будучи менее иммуногенными для человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину обеспечивают одно или более из следующего: улучшенную стабильность, возможность получения составов, аффинность связывания, терапевтическую эффективность и/или пониженные уровни агрегации по сравнению с одним или несколькими альтернативными антителами к мезотелину.

[00128] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 13, и/или вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 14. В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 15, и/или константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 16.

[00129] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат аминокислотную последовательность тяжелой цепи с SEQ ID NO: 17 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 17, и/или аминокислотную последовательность легкой цепи с SEQ ID NO: 18 или последовательность, которая на по меньшей мере 90% идентична SEQ ID NO: 18.

[00130] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой каппа-цепи Ig человека.

[00131] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 19 (HCDR1), SEQ ID NO: 20 (HCDR2) и SEQ ID NO: 21 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 22 (LCDR1), SEQ ID NO: 23 (LCDR2) и SEQ ID NO: 24 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 25 (HCDR1), SEQ ID NO: 26 (HCDR2) и SEQ ID NO:

27 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности, кодируемые последовательностями нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 28 (LCDR1), SEQ ID NO: 29 (LCDR2) и SEQ ID NO: 30 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT.

[00132] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 32.

[00133] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 33, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 34.

[00134] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 35, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность, кодируемую последовательностью нуклеиновой кислоты с SEQ ID NO: 36.

[00135] В различных вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину представляют собой 345A12-HC15-LC4.

[00136] Антигенсвязывающие домены к мезотелину, описанные в данном документе, могут быть полезны сами по себе (например, в виде антитела или антигенсвязывающего фрагмента), связанные с одним или несколькими дополнительными средствами (например, в виде ADC) или как часть более крупной макромолекулы (например, биспецифического антитела или мультиспецифического антитела).

[00137] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой эрибулин. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство представляет собой димер эрибулина.

[00138] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий домен в пределах биспецифического или мультиспецифического антитела и/или является их частью. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое или мультиспецифическое антитело содержит антигенсвязывающий домен, который способен связываться с мезотелином и содержит три HCDR, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность

области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT. В некоторых вариантах осуществления мультиспецифическое антитело содержит один или несколько дополнительных антигенсвязывающих доменов, например, для того же антигена (т. е. мезотелина) или для других антигенов.

[00139] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий домен и/или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv) или Fab-фрагмент.

[00140] В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие домены (например, антигенсвязывающие домены к мезотелину), раскрытые в данном документе, для применения отдельно или в виде части более крупной макромолекулы, могут предусматривать дополнительные модификации (например, одну или несколько аминокислотных замен, делеций и/или вставок) при сохранении мезотелин-связывающей функции.

Конъюгаты антитела и лекарственного средства

[00141] Кроме того, в различных вариантах осуществления в данном документе предусмотрены соединения конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC), содержащие линкер, который соединяет фрагмент, представляющий собой химиотерапевтическое лекарственное средство, например эрибулин, с раскрытым в данном документе антителом к мезотелину. Соединения конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC) могут быть представлены формулой I:



где Ab представляет собой интернализирующееся антитело к мезотелину, раскрытое в данном документе, или его интернализирующийся антигенсвязывающий фрагмент;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, который ковалентно присоединяет Ab к D; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

[00142] Соединения ADC по настоящему изобретению включают фрагмент, представляющий собой антитело (включая его антигенсвязывающий фрагмент), конъюгированный (например, ковалентно присоединенный с помощью линкера) с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство (например, эрибулин), где фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, когда он не конъюгирован с

фрагментом, представляющим собой антитело, характеризуется цитотоксическим или цитостатическим эффектом. В различных вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, проявляет сниженную цитотоксичность или не проявляет цитотоксичности при связывании в конъюгате, но восстанавливает цитотоксичность после отщепления от линкера и фрагмента, представляющего собой антитело. В различных вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, проявляет пониженное неспецифическое уничтожение или полное его отсутствие при связывании в конъюгате, но проявляет повышенное неспецифическое уничтожение после отщепления от конъюгата.

[00143] В некоторых вариантах осуществления раскрытые в данном документе соединения, представляющие собой ADC, могут избирательно доставлять эффективную дозу фрагмента, представляющего собой лекарственное средство (например, эрибулин), в раковые клетки или в опухолевые ткани, которые экспрессируют антиген, на который нацелен фрагмент, представляющий собой антитело, ADC (например, мезотелин). В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения, представляющие собой ADC, специфически нацелены на рак путем доставки эрибулина в клетки или ткани, которые экспрессируют мезотелин, при этом щадя нормальные клетки или ткани, которые либо не экспрессируют мезотелин, либо экспрессируют мезотелин на гораздо более низких уровнях. В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения, представляющие собой ADC, обладают улучшенным целевым уничтожением и/или сниженным нецелевым уничтожением по сравнению с ADC, содержащим альтернативное антитело, линкер и/или фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, например BAY 94-9343. В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения, представляющие собой ADC, обладают улучшенным сохранением ADCC-активности за счет ADC по сравнению с ADC, содержащим альтернативное антитело, линкер и/или фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, например BAY 94-9343. В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения, представляющие собой ADC, обладают улучшенной стабильностью (например, стабильностью в плазме крови) по сравнению с ADC, содержащим альтернативное антитело, линкер и/или фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, например BAY 94-9343. В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения, представляющие собой ADC, обладают улучшенной противоопухолевой эффективностью по сравнению с ADC, содержащим альтернативное антитело, линкер и/или фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, например BAY 94-9343.

[00144] В некоторых вариантах осуществления соединения, представляющие собой ADC, раскрытые в данном документе, могут обеспечивать благоприятную противоопухолевую эффективность при более низкой дозе эрибулина по сравнению с дозой эрибулина при оценке в качестве отдельного лекарственного средства (т. е. не конъюгированного с фрагментом, представляющим собой антитело). В некоторых вариантах осуществления опухолеспецифическое целенаправленное воздействие

соединений, представляющих собой ADC, раскрытых в данном документе, повышает противоопухолевую активность и/или снижает нецелевую цитотоксичность ADC по сравнению с эрибулином при оценке в качестве отдельного лекарственного средства. Например, в некоторых вариантах осуществления соединения, представляющие собой ADC, раскрытые в данном документе, проявляют благоприятную противоопухолевую активность при дозе эрибулина, которая в по меньшей мере 10 раз ниже, в по меньшей мере 15 раз ниже, в по меньшей мере 20 раз ниже или в по меньшей мере 30 раз ниже, чем доза эрибулина при оценке в качестве отдельного лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления раскрытые соединения, представляющие собой ADC, демонстрируют противоопухолевую активность, которая сравнима с активностью эрибулина или превосходит ее при оценке в качестве отдельного лекарственного средства, при этом обеспечивая улучшенный токсикологический профиль или профиль безопасности по сравнению с профилями эрибулина самого по себе.

[00145] В некоторых вариантах осуществления линкер является стабильным за пределами клетки, вследствие чего ADC остается интактным, когда находится во внеклеточных условиях, но способен подвергаться расщеплению после интернализации в клетку, например раковую клетку. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство эрибулин, отщепляется от фрагмента, представляющего собой антитело, к мезотелину, когда ADC проникает в клетку, экспрессирующую мезотелин, и при расщеплении высвобождается немодифицированная форма эрибулина.

[00146] В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает расщепляемый фрагмент, который расположен таким образом, что ни одна из частей линкера или фрагмента, представляющего собой антитело, не остается связанной с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство эрибулин, после расщепления. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент в линкере представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ADC, который предусматривает расщепляемый пептидный фрагмент, демонстрирует более низкие уровни агрегации, улучшенное соотношение антитело:лекарственное средство, повышенное целевое уничтожение раковых клеток, пониженное нецелевое уничтожение нераковых клеток и/или более высокую нагрузку лекарственным средством (*p*) по сравнению с ADC, который содержит альтернативный линкерный фрагмент. В некоторых вариантах осуществления повышенная эффективность и/или цитотоксичность обеспечивается при раке, при котором экспрессируются умеренные уровни мезотелина. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептидный фрагмент расщепляется ферментом, а линкер представляет собой расщепляемый ферментом линкер. В некоторых вариантах осуществления фермент представляет собой катепсин В, а линкер представляет собой расщепляемый катепсином линкер. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый ферментом линкер (например, расщепляемый катепсином линкер) проявляет одно или несколько улучшенных свойств, упомянутых

выше, по сравнению с альтернативным механизмом расщепления.

[00147] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый пептидный фрагмент в линкере предусматривает аминокислотное звено. В некоторых вариантах осуществления аминокислотное звено предусматривает валин-цитруллин (Val-Cit). В некоторых вариантах осуществления ADC, который содержит Val-Cit, демонстрирует повышенную стабильность, снижение нецелевого цитолиза, усиление целевого цитолиза, более низкие уровни агрегации и/или более высокую нагрузку лекарственным средством по сравнению с ADC, который содержит альтернативное аминокислотное звено или альтернативный расщепляемый фрагмент.

[00148] В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает по меньшей мере одно спейсерное звено, соединяющее фрагмент, представляющий собой антитело, с расщепляемым фрагментом. В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено в линкере может предусматривать по меньшей мере один фрагмент, представляющий собой полиэтиленгликоль (PEG). PEG-фрагмент может, например, предусматривать $-(\text{PEG})_m-$, где m представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено в линкере предусматривает $(\text{PEG})_2$. В некоторых вариантах осуществления ADC, который содержит более короткое спейсерное звено (например, $(\text{PEG})_2$), демонстрирует более низкие уровни агрегации и/или более высокую нагрузку лекарственным средством по сравнению с ADC, который содержит более длинное спейсерное звено (например, $(\text{PEG})_8$), несмотря на более короткую длину линкера.

[00149] В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено в линкере присоединяется к фрагменту, представляющему собой антитело, ADC с помощью малеимидного фрагмента (Mal). В некоторых вариантах осуществления ADC, который содержит линкер, присоединенный к фрагменту, представляющему собой антитело, с помощью Mal, демонстрирует более высокую нагрузку лекарственным средством по сравнению с ADC, который содержит линкер, присоединенный к фрагменту, представляющему собой антитело, с помощью альтернативного фрагмента. В некоторых вариантах осуществления Mal в линкере соединен с фрагментом, представляющим собой антитело, с помощью остатка цистеина (например, LCcys80). В некоторых вариантах осуществления Mal в линкере присоединен к остатку цистеина (например, LCcys80) вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой 2, и два фрагмента, представляющих собой -L-D, присоединены к антителу или антигенсвязывающему фрагменту. В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент, представляющий собой -L-D, присоединен к остатку цистеина (например, LCcys80) вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина представляет собой LCcys80. В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено предусматривает PEG-фрагмент. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает $\text{Mal}-(\text{PEG})_m$, например $\text{Mal}-(\text{PEG})_2$. В некоторых вариантах осуществления Mal-спейсерное звено присоединяет фрагмент,

представляющий собой антитело, к расщепляемому фрагменту в линкере. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент в линкере представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент, например аминокислотное звено. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

[00150] В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент в линкере напрямую соединен с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство эрибулин, в ADC, и расщепляемый фрагмент либо непосредственно связан с фрагментом, представляющим собой антитело, либо связан через спейсерное звено. В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено также присоединяет расщепляемый фрагмент в линкере к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин. В некоторых вариантах осуществления спейсерное звено, которое присоединяет расщепляемый фрагмент в линкере к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин, является саморасщепляемым. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляемый спейсер способен высвобождать немодифицированный эрибулин в клетке-мишени. В некоторых вариантах осуществления саморасщепляемое спейсерное звено содержит *n*-аминобензиловый спирт, например *n*-аминобензилоксикарбонил (pAB). В некоторых вариантах осуществления pAB в линкере присоединяет расщепляемый фрагмент к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин. В некоторых вариантах осуществления расщепляемый фрагмент представляет собой расщепляемый пептидный фрагмент, например аминокислотное звено. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Val-Cit-pAB. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Val-Cit-pAB и PEG-спейсерное звено, присоединяющее линкер к фрагменту, представляющему собой антитело, с помощью Mal.

[00151] В некоторых вариантах осуществления *p* представляет собой целое число от 1 до 8 или от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления *p* равняется 2 или 6. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB, и *p* равняется 2. В некоторых вариантах осуществления линкер предусматривает Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB, и *p* равняется 6.

[00152] В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, конъюгирован с фрагментом, представляющим собой лекарственное средство эрибулин, с помощью линкера, содержащего Mal-фрагмент, PEG-фрагмент, Val-Cit и pAB. В этих вариантах осуществления малеимидный фрагмент ковалентно связывает фрагмент, представляющий собой линкер-лекарственное средство, с фрагментом, представляющим собой антитело, а pAB действует как саморасщепляемое спейсерное звено. Такой линкер может называться линкером "Mal-VC-pAB", "Mal-VCP", "малеимид-VCP" или линкером "VCP", линкером "Mal-(PEG)₂-VCP" или линкером "Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB". В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство эрибулин, представляет собой эрибулин, ковалентно связанный в положении C-35. В некоторых вариантах осуществления pAB линкера Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB присоединен к

амину C-35 на фрагменте, представляющем собой лекарственное средство эрибулин.

[00153] 345A12-HC15-LC4 представляет собой иллюстративное антитело к мезотелину, содержащее или кодируемое последовательностями, показанными выше в таблицах 1-10, например, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, раскрытых в данном документе ADC содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, раскрытых в данном документе ADC представляет собой 345A12-HC15-LC4.

[00154] В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе ADC предусматривает 345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулин. В этих вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой антитело, содержащий 345A12-HC15-LC4, присоединен к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство эрибулин, с помощью линкера, предусматривающего Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB. Такой ADC может называться "MORAb-109." В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе ADC представляет собой MORAb-109.

[00155] В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе ADC представляет собой MORAb-109 и имеет p , равное 2. В некоторых вариантах осуществления, когда p равняется 2, ADC может называться "MORAb-109 (DAR2)." В других вариантах осуществления раскрытый в данном документе ADC представляет собой MORAb-109 и имеет p , равное 6. В некоторых вариантах осуществления, когда p равняется 6, ADC может называться "MORAb-109 (DAR6)."

[00156] В различных вариантах осуществления линкер предназначен для облегчения неспецифического уничтожения (уничтожения соседних клеток, например, тех, которые не экспрессируют мезотелин) посредством расщепления после интернализации в клетку и диффузии фрагмента, представляющего собой линкер-лекарственное средство, и/или фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, самого по себе в соседние клетки. В некоторых вариантах осуществления линкер способствует интернализации в клетку. В некоторых вариантах осуществления разработан линкер для минимизации расщепления во внеклеточной среде и, таким образом, снижения токсичности в отношении нецелевой ткани (например, ткани, не являющейся раковой), при этом сохраняющий способность к связыванию ADC с тканью-мишенью и к неспецифическому уничтожению раковой ткани, которая не экспрессирует антиген, на который целенаправленно воздействует фрагмент, представляющий собой антитело, ADC, но которая окружает раковую ткань-мишень, экспрессирующую данный антиген. В некоторых вариантах осуществления линкер, предусматривающий фрагмент, представляющий собой малеимид (Mal), фрагмент, представляющий собой полиэтиленгликоль (PEG), валин-цитруллин (Val-

Cit или "VC") и pAB, обеспечивает эти функциональные свойства. В некоторых вариантах осуществления линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB, особенно эффективен в обеспечении этих функциональных свойств при соединении фрагмента, представляющего собой антитело, и фрагмента, представляющего собой лекарственное средство эрибулин. В некоторых вариантах осуществления линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB, эффективен в обеспечении некоторых или всех из этих функциональных свойств при соединении фрагмента, представляющего собой антитело к мезотелину, такое как 345A12-NC15-LC4, и фрагмента, представляющего собой лекарственное средство эрибулин.

[00157] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину содержит последовательности, раскрытые в данном документе (например, предусматривающие шесть CDR и/или переменные домены тяжелой и легкой цепей, раскрытые в таблицах 1-3). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой полноразмерное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой моноспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент, биспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент или мультиспецифическое антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляют собой одноцепочечный переменный фрагмент (scFv) или Fab-фрагмент.

[00158] В некоторых вариантах осуществления ADC, предусматривающий фрагмент, представляющий собой антитело (Ab) к мезотелину, и расщепляемый пептидный фрагмент, демонстрирует более низкие уровни агрегации, улучшенное соотношение антитело:лекарственное средство, повышенное целевое уничтожение раковых клеток, пониженное нецелевое уничтожение нераковых клеток, более высокую нагрузку лекарственным средством (*p*), повышенную цитотоксичность и/или эффективность по сравнению с ADC, содержащим альтернативные антитело или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления ADC представляет собой ADC формулы (I):



где Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность

области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой химиотерапевтическое средство (например, эрибулин);

L представляет собой расщепляемый линкер, который ковалентно присоединяет Ab к D; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

[00159] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой каппа-цепи Ig человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[00160] В некоторых вариантах осуществления ADC имеет формулу (I):

$$\text{Ab}-(\text{L-D})_p (\text{I}),$$

где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и/или клетками, экспрессирующими мезотелин, и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, который ковалентно присоединяет Ab к D; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

[00161] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые нацелены на мезотелин или клетки, экспрессирующие мезотелин, содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой каппа-цепи Ig человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[00162] В некоторых вариантах осуществления ADC имеет формулу (I):

$\text{Ab}-(\text{L-D})_p$ (I),

где

Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые нацелены на мезотелин и/или клетки, экспрессирующие мезотелин, и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

[00163] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент, которые нацелены на мезотелин или клетки, экспрессирующие мезотелин, содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах

осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константный домен тяжелой цепи IgG1 человека и константный домен легкой каппа-цепи Ig человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой каппа-цепи Ig, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[00164] В некоторых вариантах осуществления ADC имеет формулу (I):

$Ab-(L-D)_p(I)$,

где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

[00165] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой каппа-цепи Ig человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

[00166] В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент ADC представляет собой 345A12-HC15-LC4. В некоторых вариантах осуществления *p* составляет от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления *p* равняется 2 или 6. В некоторых вариантах осуществления *p* равняется 2.

[00167] В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе ADC (например, предусматривающий антитело к мезотелину и линкер, раскрытые в данном документе) с более низким уровнем нагрузки лекарственным средством, представляющим собой эрибулин (например, *p* равно 2), может доставлять такие же или аналогичные уровни эрибулина в раковую клетку или в опухолевую ткань, как ADC с более высоким уровнем нагрузки лекарственным средством (например, *p* равно 6). В некоторых вариантах

осуществления ADC с более низким уровнем нагрузки лекарственным средством (например, p равное 2) может обеспечить ингибирование роста опухоли и/или эффективность противоракового лечения *in vivo*, примерно сравнимые или превосходящие эффективность ADC с более высоким уровнем нагрузки лекарственным средством (например, p равное 6).

[00168] В некоторых вариантах осуществления каждый фрагмент, представляющий собой эрибулин, соединен расщепляемым линкером с целенаправленно воздействующим на мезотелин антителом или антигенсвязывающим фрагментом с помощью остатка цистеина на антителе или фрагменте (например, LCcys80). В некоторых вариантах осуществления в общей сложности два фрагмента, представляющих собой линкер-эрибулин, присоединены к антителу или антигенсвязывающему фрагменту, целенаправленно воздействующим на мезотелин, например с помощью двух остатков цистеина на антителе или антигенсвязывающем фрагменте (т. е. таким образом, что ADC содержит DAR2). В некоторых вариантах осуществления остаток(-тки) цистеина представляет(-ют) собой LCcys80.

[00169] Разработка и получение ADC для применения в качестве терапевтического средства для человека, например в качестве средства для онкотерапии, могут потребовать больше, чем идентификация антитела, способного к связыванию с требуемой мишенью или мишенями и присоединению к лекарственному средству, применяемому как таковое для лечения рака. Связывание антитела с лекарственным средством может оказывать значительные и непредсказуемые эффекты в отношении активности одного или обоих из антитела и лекарственного средства, при этом эффекты будут варьироваться в зависимости от выбранного антитела, и/или типа линкера, и/или лекарственного средства. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления компоненты ADC выбирают так, чтобы (i) сохранить одно или несколько терапевтических свойств, проявляемых фрагментами, представляющими собой антитело и лекарственное средство, отдельно, (ii) поддерживать свойства специфического связывания фрагмента, представляющего собой антитело; (iii) оптимизировать нагрузку лекарственным средством и соотношения лекарственного средства и антитела; (iv) обеспечить доставку, например внутриклеточную доставку, фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, за счет стабильного прикрепления к фрагменту, представляющему собой антитело; (v) сохранить стабильность ADC в качестве интактного конъюгата до момента транспортировки или доставки в сайт-мишень; (vi) свести к минимуму агрегацию ADC до или после введения; (vii) обеспечить терапевтический эффект, например цитотоксический эффект, фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, после отщепления в клеточной среде; (viii) обеспечить проявление эффективности противоракового лечения *in vivo*, сравнимой или превосходящей эффективность фрагментов, представляющих собой антитело и лекарственное средство, отдельно; (ix) свести к минимуму нецелевое уничтожение под действием фрагмента, представляющего собой лекарственное средство, и/или (x) обеспечить проявление требуемых фармакокинетических и фармакодинамических свойств,

возможности получения составов и токсикологического/иммунологического профилей. Скрининг каждого из этих свойств может потребоваться для выявления улучшенного ADC для терапевтического применения (Ab et al. (2015) Mol. Cancer Ther. 14:1605-13).

[00170] В некоторых вариантах осуществления раскрытый в данном документе ADC, предусматривающий антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину, соединенные с химиотерапевтическим средством, например эрибулином, демонстрирует конкретную комбинацию необходимых свойств. Эти свойства включают без ограничения эффективные уровни нагрузки лекарственным средством, низкие уровни агрегации, стабильность при условиях хранения и/или при нахождении в кровотоке в организме (например, стабильность в сыворотке крови и матриксе), сохранение аффинности в отношении клеток, экспрессирующих мишень, сравнимой с аффинностью неконъюгированного антитела, сильную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих мишень, высокие уровни неспецифического уничтожения и/или эффективную противораковую активность *in vivo*, все из них по сравнению с ADC, в которых применяются другие конструкции фрагмента, представляющего собой антитело. В некоторых вариантах осуществления высокая противораковая активность этих конъюгатов наблюдается даже при тестировании на клеточных линиях с умеренной экспрессией антигена, демонстрируя сильную чувствительность к полезной нагрузке токсина, доставляемой ADC. В некоторых вариантах осуществления ADC, предусматривающий антитело или антигенсвязывающий фрагмент к мезотелину, раскрытые в данном документе, проявляет особенно благоприятную противоопухолевую цитотоксичность и/или активность, а также улучшенные профили нецелевой токсичности, метаболизма и фармакокинетики лекарственного средства (DMPK) по сравнению с ADC, содержащим альтернативный фрагмент, представляющий собой антитело. В некоторых вариантах осуществления ADC, предусматривающий гуманизированное антитело к мезотелину, раскрытое в данном документе, и эрибулин, обеспечивает неожиданно благоприятные фармакологические и токсикологические свойства по сравнению с ADC, содержащим фрагмент, представляющий собой альтернативное антитело, и/или конъюгат.

[00171] Соединения ADC по настоящему изобретению могут селективно доставлять эффективную дозу цитотоксического или цитостатического средства к раковым клеткам или к опухолевой ткани. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая и/или цитостатическая активность ADC зависит от уровня экспрессии антигена-мишени в клетке. В некоторых вариантах осуществления раскрытые ADC особенно эффективны при уничтожении раковых клеток, экспрессирующих высокий уровень антигена-мишени, по сравнению с раковыми клетками, экспрессирующими тот же антиген на низком уровне. В некоторых вариантах осуществления раскрытые ADC особенно эффективны при уничтожении раковых клеток, экспрессирующих антиген-мишень на умеренном уровне, по сравнению с раковыми клетками, экспрессирующими тот же антиген на низком уровне.

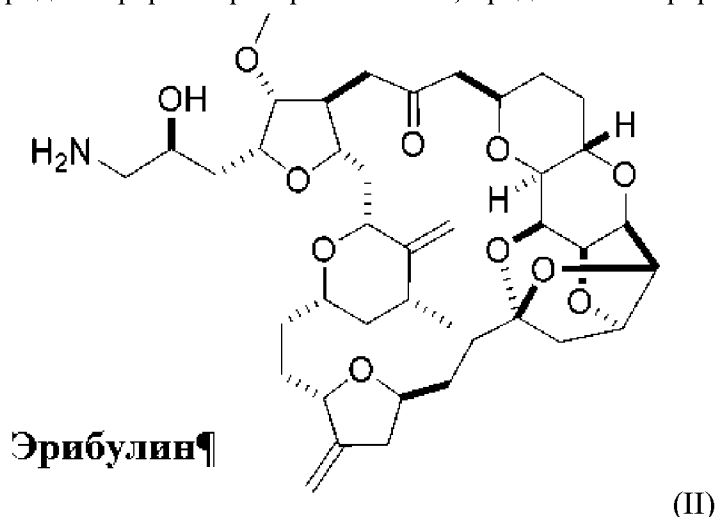
[00172] Иллюстративные виды рака, при которых экспрессия мезотелина происходит на высоком уровне, включают без ограничения рак яичника (например,

серозный рак яичника, светлоклеточный рак яичника), рак поджелудочной железы, мезотелиому, рак эндометрия, немелкоклеточный рак легкого (например, аденокарциному) и колоректальный рак. Иллюстративные виды рака, при которых экспрессия мезотелина происходит на умеренном уровне, включают без ограничения рак желудка, карциному тимуса и холангиоцеллюлярную карциному. Иллюстративные виды рака, при которых экспрессия мезотелина происходит на низком уровне, включают без ограничения меланому и лимфому. В некоторых вариантах осуществления виды рака, при которых экспрессируется мезотелин, могут включать рак, предусматривающий мутации и/или устойчивость к лекарственным средствам, например рак легкого с мутациями KRAS/STK11 (немелкоклеточная аденокарцинома легкого), например рак легкого с мутациями, который проявляет устойчивость к лечению при помощи блокады контрольных точек PD-1.

Фрагменты, представляющие собой лекарственное средство

[00173] Фрагмент, представляющий собой лекарственное средство (D), из ADC, описанных в данном документе, может представлять собой любое химиотерапевтическое средство. Применимые классы химиотерапевтических средств включают, например, средства, направленные против тубулина. В определенных вариантах осуществления фрагмент, представляющий собой лекарственное средство, представляет собой средство, направленное против тубулина. Одним иллюстративным фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, для применения в описанных ADC и композициях является эрибулин. Другим иллюстративным фрагментом, представляющим собой лекарственное средство, для применения в описанных ADC и композициях является димер эрибулина.

[00174] В различных вариантах осуществления структура эрибулина, используемого в его природной форме в раскрытых ADC, представлена формулой (II):



[00175] В различных других вариантах осуществления структура эрибулина, используемого в раскрытых ADC, представляет собой ту, которая представлена в публикации № US 20180193478, которая включена в данный документ посредством ссылки для всех структур эрибулина и способов синтеза этих структур.

Нагрузка лекарственным средством

[00176] Нагрузка лекарственным средством может быть выражена в виде p , и в

данном документе она также упоминается как соотношение лекарственного средства и антитела (DAR). Нагрузка лекарственным средством может находиться в диапазоне, например, от 1 до 10 фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на фрагмент, представляющий собой антитело. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 1 до 10. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4 или от 2 до 3. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 1 до 8. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 1 до 6. В некоторых вариантах осуществления p представляет собой целое число от 2 до 6. В некоторых вариантах осуществления p равняется 2. В некоторых вариантах осуществления p равняется 6.

[00177] В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством может быть ограничена количеством сайтов присоединения на фрагменте, представляющем собой антитело. В некоторых вариантах осуществления линкерный фрагмент (L) ADC присоединяется к фрагменту, представляющему собой антитело, через химически активную группу на одном или нескольких аминокислотных остатках фрагмента, представляющего собой антитело. Например, линкер может быть присоединен к фрагменту, представляющему собой антитело, с помощью свободной амина-, имино-группы, гидроксильной, тиольной или карбоксильной группы (например, к N- или C-концу, к эpsilon-аминогруппе одного или нескольких остатков лизина, к свободной группе карбоновой кислоты одного или нескольких остатков глутаминовой кислоты или аспарагиновой кислоты или к сульфгидрильной группе одного или нескольких остатков цистеина). Сайт, к которому присоединен линкер, может представлять собой природный остаток в аминокислотной последовательности фрагмента, представляющего собой антитело, или его можно встраивать в фрагмент, представляющий собой антитело, например с помощью технологии рекомбинантных ДНК (например, посредством введения остатка цистеина в аминокислотную последовательность) или посредством изменения биохимических свойств белка (например, посредством восстановления, корректировки pH или гидролиза).

[00178] В некоторых вариантах осуществления количество фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, которые могут быть конъюгированы с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, ограничено количеством свободных остатков цистеина. Например, в том случае, если прикрепление осуществляется за счет тиольной группы цистеинового остатка, антитело может содержать лишь одну или несколько тиольных групп цистеиновых остатков или может содержать одну или несколько в достаточной степени реакционно-способных тиольных групп, посредством которых может быть прикреплен линкер. Обычно антитела не содержат много свободных и реакционно-способных тиольных групп цистеиновых остатков, которые могут быть

связаны с фрагментом-лекарственным средством. В действительности, большинство тиольных групп цистеиновых остатков в антителе вовлечены в образование или межцепочечной, или внутрицепочечной дисульфидных связей. Следовательно, в некоторых вариантах осуществления при конъюгации с цистеинами может потребоваться по меньшей мере частичное восстановление антитела. Избыточное прикрепление линкера-токсина к антителу может дестабилизировать антитело за счет восстановления доступных остатков цистеина с образованием дисульфидных связей. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления оптимальное соотношение лекарственного средства и антитела должно повышать активность ADC (за счет увеличения количества присоединенных фрагментов, представляющих собой лекарственное средство, на антитело) без дестабилизации фрагмента, представляющего собой антитело. В некоторых вариантах осуществления оптимальное соотношение может составлять 2 или 6. В некоторых вариантах осуществления оптимальное соотношение составляет 2.

[00179] В некоторых вариантах осуществления используют одну или несколько технологий сайт-специфической конъюгации для получения гомогенного продукта ADC с определенной нагрузкой лекарственным средством, т. е. определенным соотношением лекарственного средства и антитела (DAR). В некоторых вариантах осуществления свободные остатки цистеина могут быть получены в легкой цепи или тяжелой цепи антител для сайт-специфической конъюгации с помощью технологии Residue-SPECific Conjugation Technology (RESPECT). Иллюстративные протоколы получения антител в формате RESPECT описаны в Albane et al. (2017) *Cancer Biol. Ther.* 18(5):347-57 и в международных публикациях №№ WO/2016205618 и WO/2017106643, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки для способов выполнения сайт-специфической конъюгации. В некоторых вариантах осуществления ADC получают с использованием сайт-специфической конъюгации для ковалентного присоединения фрагмента, представляющего собой антитело, к фрагменту, представляющему собой лекарственное средство, с помощью линкера (например, линкера Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB). В некоторых вариантах осуществления сайт-специфическую конъюгацию используют для нацеливания DAR приблизительно по 2 для ADC или композиций, содержащих фрагмент, представляющий собой лекарственное средство эрибулин.

[00180] Кроличьи моноклональные антитела, химеризированные или гуманизированные с константными областями человека, могут продуцировать неспаренные цистеины в легкой цепи, оставляя эти остатки доступными для конъюгации (Albane et al. (2017) *Cancer Biol. Ther.* 18(5):347-57; международная публикация № WO/2016205618). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела, используемый для сайт-специфической конъюгации, представляет собой антитело в формате RESPECT-L. Иллюстративные антитела в формате RESPECT-L с неспаренным цистеином в положении 80 легкой цепи (LCcys80) описаны в данном документе. Используемый в данном документе термин "LCcys80" или "Cys80" относится к остатку цистеина в аминокислотном положении 80 вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента в

соответствии с системой нумерации Kabat. Например, в некоторых вариантах осуществления в переменных областях легкой цепи, раскрытых в данном документе, LCys80 находится в аминокислотном положении 80. Антитела, полученные согласно RESPECT-L, могут давать ADC с DAR, равным приблизительно 2. В некоторых вариантах осуществления нагрузка лекарственным средством и/или средняя нагрузка лекарственным средством, равная приблизительно 2, достигается, например, с помощью сайт-специфической конъюгации.

Фармацевтические композиции

[00181] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или несколько антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов и/или ADC, раскрытых в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции, описанные в данном документе, содержат по меньшей мере одно дополнительное средство.

[00182] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие множество копий антитела, антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата и/или ADC, раскрытых в данном документе. В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении дополнительно предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие множество копий ADC, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления среднее значение p ADC в композиции составляет от приблизительно 1 до приблизительно 8. В некоторых вариантах осуществления среднее значение p ADC в композиции составляет приблизительно 2 или приблизительно 6. В некоторых вариантах осуществления среднее значение p ADC в композиции составляет приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2 или приблизительно 2,3. В некоторых вариантах осуществления среднее значение p ADC в композиции составляет приблизительно 5,5, 5,6, 5,7, 5,8, 5,9, 6,0, 6,1, 6,2, 6,3, 6,4 или 6,5.

[00183] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может дополнительно предусматривать одно или несколько дополнительных терапевтических средств, например одно или несколько средств, способных лечить рак, при котором экспрессируется мезотелин, стероид и т. п.

Пути терапевтического применения и способы лечения

[00184] В данном документе раскрыты способы применения раскрытых антител, антигенсвязывающих фрагментов, конъюгатов, ADC и/или фармацевтических композиций для лечения нарушения у субъекта, например онкологического нарушения. Антитела, антигенсвязывающие фрагменты, конъюгаты и/или ADC можно вводить по отдельности или в комбинации со вторым терапевтическим средством, и можно вводить в любом фармацевтически приемлемом составе, с любой дозой и схемой введения. Эффективность лечения с применением антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC можно

оценивать в отношении токсичности, а также показателей эффективности и корректировать соответствующим образом. Показатели эффективности включают без ограничения цитостатический и/или цитотоксический эффект, наблюдаемые *in vitro* или *in vivo*, уменьшение объема опухоли, торможение роста опухоли и/или длительное выживание.

[00185] Известны способы определения того, оказывает ли антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC цитостатический и/или цитотоксический эффект на клетку. Например, цитотоксическую или цитостатическую активность антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC можно измерять путем воздействия антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC на клетки млекопитающих, экспрессирующие белок-мишень, в среде для культивирования клеток; культивирования клеток в течение периода времени от приблизительно 6 часов до приблизительно 5 дней и измерения жизнеспособности клеток. Клеточные анализы *in vitro* также можно применять для измерения жизнеспособности (пролиферации), цитотоксичности и индукции апоптоза (активации каспаз) с помощью ADC.

[00186] Для определения того, оказывает ли антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC цитостатический эффект, можно применять анализ со встраиванием тимидина. Например, раковые клетки, экспрессирующие целевой антиген при плотности 5000 клеток/лунка в 96-луночной планшете, можно культивировать в течение 72-часового периода и подвергать воздействию 0,5 мКи 3H-тимидина в течение последних 8 часов 72-часового периода. Встраивание 3H-тимидина в клетки культуры измеряют в присутствии и при отсутствии антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC.

[00187] Для определения цитотоксичности можно измерять некроз или апоптоз (программируемую гибель клеток). Некроз обычно сопровождается повышением проницаемости плазматической мембраны; набуханием клетки и разрывом плазматической мембраны. Апоптоз обычно характеризуется пузырением мембраны, конденсацией цитоплазмы и активацией эндогенных эндонуклеаз. Определение любого из данных эффектов в отношении раковых клеток указывает на то, что ADC применим в лечении рака.

[00188] Жизнеспособность клеток может быть измерена, например, путем определения поглощения клетками красителя, такого как нейтральный красный, трипановый синий, кристаллический фиолетовый или синий ALAMAR™ (см., например, Page et al. (1993) *Intl. J. Oncology* 3:473-6). В таком анализе клетки инкубируют в средах, содержащих краситель, клетки промывают, а оставшийся краситель, отражающий поглощение красителя клетками, измеряют спектрофотометрически. В определенных вариантах осуществления активность и/или цитотоксичность полученных ADC *in vitro* оценивают с использованием анализа с кристаллическим фиолетовым. Кристаллический фиолетовый представляет собой триарилметановый краситель, который накапливается в ядре жизнеспособных клеток. В этом анализе клетки подвергают воздействию ADC или контрольных средств в течение определенного периода времени, после чего клетки окрашивают кристаллическим фиолетовым, обильно промывают водой, затем растворяют в 1% SDS и анализируют спектрофотометрически. Белок-связывающий краситель

сульфородамин В (SRB) также можно использовать для измерения цитотоксичности (Skehan et al. (1990) J. Natl. Cancer Inst. 82:1107-12).

[00189] Апоптоз можно определить количественно, например, посредством измерения фрагментации ДНК. Доступны коммерческие фотометрические способы для количественного определения фрагментации ДНК *in vitro*. Примеры таких анализов, включая TUNEL (который определяет встраивание меченых нуклеотидов во фрагментированную ДНК) и анализы на основе ELISA, описаны в Biochemica (1999) No. 2, pp. 34-37 (Roche Molecular Biochemicals).

[00190] Апоптоз также можно определить путем измерения морфологических изменений в клетке. Например, как и в случае некроза, нарушение целостности плазматической мембраны можно определять посредством измерения поглощения определенных красителей (например, флуоресцентного красителя, такого как, например, акридиновый оранжевый или бромид этидия). Способ измерения количества апоптотических клеток был описан Duke and Cohen, Current Protocols in Immunology (Coligan et al., Eds. (1992) pp. 3.17.1-3.17.16). Клетки также можно помечать ДНК-красителем (например, акридиновым оранжевым, бромидом этидия или йодидом пропидия), и клетки визуально анализируют в отношении конденсации хроматина и окаймления вдоль внутренней ядерной мембраны. Другие морфологические изменения, которые можно измерить для определения апоптоза, включают, например, конденсацию цитоплазмы, усиление пузырения мембраны и сморщивание клеток.

[00191] Раскрытые ADC также можно оценивать в отношении активности неспецифического уничтожения. Активность неспецифического уничтожения можно определять, например, с помощью анализа с применением двух линий клеток, одна из которых является положительной в отношении антигена-мишени, а другая является отрицательной в отношении антигена-мишени. Клеточные линии могут быть помечены для их дифференциации. Например, положительные в отношении мишени клетки, помеченные Nuclight™ Green (NLG), и отрицательные в отношении мишени клетки, помеченные Nuclight™ Red (NLR), можно совместно культивировать, обрабатывать с помощью ADC с последующим контролем цитотоксичности. Уничтожение отрицательных в отношении мишени клеток при смешивании с положительными в отношении мишени клетками указывает на уничтожение нецелевых клеток, тогда как уничтожение отрицательных в отношении мишени клеток в отсутствие положительных в отношении мишени клеток указывает на нецелевое уничтожение.

[00192] В некоторых вариантах осуществления в настоящем изобретении представлен способ уничтожения, ингибирования или модуляции роста или вмешательства в метаболизм раковой клетки или ткани посредством нарушения тубулина. Способ можно применять в отношении любого субъекта, у которого нарушение тубулина обеспечивает терапевтический эффект. Субъекты, которые могут получить пользу от разрушения тубулина, включают без ограничения тех, кто страдает или имеет риск развития рака желудка, рака яичника (например, эпителиального рака яичника), рака легкого (например,

немелкоклеточного рака легкого), рака молочной железы, рака эндометрия (например, серозной карциномы эндометрия), остеосаркомы, саркомы Капоши, герминогенного рака яичек, рака головы и шеи, рака печени, рака почки, уротелиального рака, рака матки, рака желчных протоков, лейкоза (например, острого миелоидного лейкоза), лимфомы (например, болезни Ходжкина, неходжкинской лимфомы), миеломы, рака головы и шеи, рака пищевода, рака поджелудочной железы, рака предстательной железы, рака головного мозга (например, глиобластомы), рака щитовидной железы, колоректального рака и/или рака кожи (например, меланомы) или любых их метастаз (Dumontet and Jordan (2010) *Nat. Rev. Drug Discov.* 9:790-803).

[00193] В различных вариантах осуществления раскрытые антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC можно вводить в любую клетку или ткань, которая экспрессирует мезотелин, в такую как раковая клетка или ткань, экспрессирующая мезотелин. Иллюстративный вариант осуществления включает способ ингибирования передачи сигналов в клетке, опосредованной мезотелином, или способ уничтожения клетки. Способ может быть применен в отношении любой клетки или ткани, экспрессирующих мезотелин, такой как раковая клетка или метастатический очаг. Неограничивающие примеры видов рака, при которых экспрессируется мезотелин, включают мезотелиому, рак поджелудочной железы (например, аденокарциному поджелудочной железы), рак яичника (например, серозный рак яичника, светлоклеточный рак яичника, эпителиальный рак яичника) и рак легкого (например, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого) (Wang et al. (2012) *PLoS ONE* 7:e33214). Другие иллюстративные связанные с мезотелином виды рака включают рак эндометрия, колоректальный рак, рак желудка, лейкоз, рак молочной железы, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак печени, рак предстательной железы, рак почки, рак щитовидной железы, рак уротелия, рак матки и рак желчных протоков. Неограничивающие примеры клеток, экспрессирующих мезотелин, включают клетки карциномы яичника человека OVCAR3, эндометриоидные клетки человека HEC-251, клетки плоскоклеточной мезотелиомы легких человека H226 и клетки, содержащие рекомбинантную нуклеиновую кислоту, кодирующую мезотелин или его часть.

[00194] Иллюстративные способы включают стадии приведения клетки в контакт с антителом, антигенсвязывающим фрагментом и/или ADC, описанным в данном документе, в эффективном количестве, т. е. количестве, достаточном для уничтожения клетки. Способ можно применять по отношению к клеткам в культуре, например *in vitro*, *in vivo*, *ex vivo* или *in situ*. Например, клетки, которые экспрессируют мезотелин (например, клетки, собранные посредством биопсии опухоли или метастатического очага, клетки из развившейся линии раковых клеток или рекомбинантные клетки), можно культивировать *in vitro* в культуральной среде и при этом на стадию приведения в контакт можно оказывать влияние с помощью добавления антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC в культуральную среду. Данный способ приведет к уничтожению клеток, экспрессирующих мезотелин, в том числе, в частности, опухолевых клеток, экспрессирующих мезотелин. В

качестве альтернативы, антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC можно вводить субъекту посредством любого подходящего пути введения (например, внутривенного, подкожного или непосредственного контакта с опухолевой тканью) для оказания эффекта *in vivo*. Этот подход также можно применять для антител и ADC, целенаправленно воздействующих на другие антигены клеточной поверхности.

[00195] Эффект раскрытой терапевтической композиции на основе антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC *in vivo* можно оценивать на подходящей животной модели. Например, можно применять ксеногенные модели рака, где эксплантаты злокачественных опухолей или пассированные ткани ксенотрансплантата вводят животным с ослабленным иммунитетом, таким как "голые" мыши или мыши SCID (Klein et al. (1997) *Nature Med.* 3:402-8). Эффективность можно прогнозировать, с применением анализов, при которых измеряют степень ингибирования образования опухоли, регрессии опухоли или образования метастазов и т. п.

[00196] Также можно применять анализы *in vivo*, при которых оценивают стимуляцию гибели опухоли посредством таких механизмов, как апоптоз. В некоторых вариантах осуществления ксенотрансплантаты от мышей, несущих опухоль, обработанных терапевтической композицией, можно оценивать в отношении присутствия апоптотических очагов и сравнивать с необработанными контрольными мышами, несущими ксенотрансплантат. Степень, при которой апоптотические очаги обнаруживают в опухолях обработанных мышей, является показателем терапевтической эффективности композиции.

[00197] Кроме того, в данном документе представлены способы лечения рака. Описанные в данном документе антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC можно вводить субъекту-млекопитающему, отличному от человека, или субъекту-человеку с терапевтическими целями. Терапевтические способы предусматривают введение млекопитающему, имеющему опухоль, биологически эффективного количества антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC, содержащих эрибулин, связанный с целенаправленно воздействующим антителом, которое связывается с антигеном, экспрессированным, доступным для связывания или локализованным на поверхности раковой клетки

[00198] Иллюстративный вариант осуществления представляет собой способ доставки эрибулина в клетку, экспрессирующую мезотелин, предусматривающий обеспечение конъюгации эрибулина с антителом, которое иммуноспецифически связывается с эпитопом мезотелина и подвергает клетку воздействию антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC. Иллюстративные опухолевые клетки, экспрессирующие мезотелин, для которых указаны антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC по настоящему изобретению, включают клетки карциномы яичника, эндометриоидные клетки и клетки плоскоклеточной мезотелиомы легкого.

[00199] Другой иллюстративный вариант осуществления представляет собой способ уменьшения или ингибирования роста опухоли, экспрессирующей антиген-мишень (например, опухоли, экспрессирующей мезотелин), предусматривающий введение

терапевтически эффективного количества антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC. В некоторых вариантах осуществления лечения достаточно для снижения или ингибирования роста опухоли у пациента, уменьшения количества или размера метастатических очагов, уменьшения опухолевой нагрузки, уменьшения первичной опухолевой нагрузки, снижения инвазивности, продления времени выживания и/или поддержания или улучшения качества жизни. В некоторых вариантах осуществления опухоль является устойчивой или рефрактерной к лечению посредством антитела или антигенсвязывающего фрагмента ADC при отдельном введении, и/или опухоль устойчива или рефрактерна к лечению посредством эрибулина при отдельном введении.

[00200] Более того, антитела по настоящему изобретению можно вводить млекопитающему, отличному от человека, у которого экспрессируется мезотелин, для ветеринарных целей или для применения в качестве животной модели заболевания человека. Что касается последнего, то такие животные модели можно применять для оценки терапевтической эффективности раскрытых антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC (например, тестирования доз и сроков введения).

[00201] Кроме того, в данном документе предусмотрены пути терапевтического применения раскрытых антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC. Также раскрыт иллюстративный вариант осуществления в отношении применения антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC при лечении рака, при котором экспрессируется антиген-мишень (например, рака, при котором экспрессируется мезотелин). Способы идентификации субъектов с видами рака, при которых экспрессируется антиген-мишень (например, мезотелин), известны в уровне техники, и их можно применять для идентификации пациентов, подходящих для лечения раскрытыми антителом, антигенсвязывающим фрагментом и/или ADC.

[00202] Другой иллюстративный вариант осуществления представляет собой применение антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC в способе изготовления лекарственного препарата для лечения рака, при котором экспрессируется антиген-мишень (например, рака, при котором экспрессируется мезотелин).

[00203] Терапевтические композиции, применяемые для реализации вышеупомянутых способов на практике, можно составлять в виде фармацевтических композиций, содержащих фармацевтически приемлемый носитель, подходящий для требуемого способа доставки. В иллюстративном варианте осуществления представлена фармацевтическая композиция, содержащая антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие носители включают любой материал, который в сочетании с терапевтической композицией сохраняет противоопухолевую функцию терапевтической композиции и, как правило, не взаимодействует с иммунной системой пациента.

[00204] Фармацевтически приемлемые носители включают любые и все растворители, диспергирующие среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие абсорбцию, и им подобные,

которые являются физиологически совместимыми. Примеры фармацевтически приемлемых носителей включают одно или несколько из воды, солевого раствора, фосфатно-солевого буферного раствора, декстрозы, глицерина, этанола, мезилатной соли и т. п., а также их комбинации. Во многих случаях в композицию включают изотонические средства, например сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать небольшие количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность ADC.

[00205] Терапевтические составы можно солюбилизовать и вводить посредством любого пути, обеспечивающего доставку терапевтической композиции к месту локализации опухоли. Потенциально эффективные пути введения включают без ограничения внутривенный, парентеральный, внутрибрюшинный, внутримышечный, внутриопухолевый, внутрикожный, внутрь органа, ортотопический и т. п. Терапевтические препараты на основе белков можно лиофилизировать и хранить в виде стерильных порошков, например, под вакуумом, а затем восстановить в бактериостатической воде (содержащей, например, консервант бензиловый спирт) или в стерильной воде перед инъекцией. Терапевтические составы могут содержать антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC или их фармацевтически приемлемую соль, например мезилатную соль.

[00206] Антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC, раскрытые в данном документе, можно вводить пациенту, нуждающемуся в этом, в дозе в диапазоне от приблизительно 0,2 мг/кг до приблизительно 10 мг/кг. В некоторых вариантах осуществления антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC вводят пациенту ежедневно, один раз в два месяца или в любой промежуточный период времени. Дозы и протоколы введения для лечения рака с использованием вышеупомянутых способов будут варьироваться в зависимости от способа и целевого рака и, как правило, будут зависеть от ряда других факторов, учитываемых в уровне техники.

[00207] Известны различные системы доставки, и их можно применять для введения одного или нескольких антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC по настоящему изобретению. Способы введения антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC включают без ограничения парентеральное введение (например, внутрикожное, внутримышечное, внутрибрюшинное, внутривенное и подкожное), эпидуральное введение, внутриопухолевое введение и чресслизистое введение (например, интраназальный и пероральный пути). Кроме того, может использоваться легочное введение, например, с использованием ингалятора или небулайзера, а также состава с аэрозольным средством. См., например, композиции и способы легочного введения, описанные в патентах США №№ 6019968, 5985320, 5985309, 5934272, 5874064, 5855913, 5290540 и 4880078 и междунар. публ. №№ WO 1992/019244, WO 1997/032572, WO 1997/044013, WO 1998/031346 и WO 1999/066903. ADC можно вводить любым удобным путем, например,

путем инфузии или болюсной инъекции, или путем абсорбции через эпителиальные или слизисто-кожные оболочки (например, слизистую оболочку полости рта, слизистую оболочку прямой кишки и слизистую оболочку кишечника и т.д.). Введение может быть системным или местным.

[00208] Раскрытые в данном документе терапевтические композиции могут быть стерильными и стабильными в условиях изготовления и хранения. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC или фармацевтических композиций поставляются в виде сухого стерилизованного лиофилизированного порошка или безводного концентрата в герметически закрытом контейнере и они могут быть восстановлены (например, водой или физиологическим солевым раствором) до концентрации, подходящей для введения субъекту. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько профилактических или терапевтических средств или одна или несколько фармацевтических композиций поставляют в виде сухого стерильного лиофилизированного порошка в герметично закрытом контейнере в однократной дозе, составляющей по меньшей мере 5 мг, по меньшей мере 10 мг, по меньшей мере 15 мг, по меньшей мере 25 мг, по меньшей мере 35 мг, по меньшей мере 45 мг, по меньшей мере 50 мг, по меньшей мере 75 мг или по меньшей мере 100 мг или любое промежуточное количество. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированные антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC или фармацевтические композиции хранят при температуре от 2°C до 8°C в оригинальном контейнере. В некоторых вариантах осуществления одно или несколько из антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC или фармацевтических композиций, описанных в данном документе, поставляют в жидкой форме в герметично закрытом контейнере, например контейнере с указанием количества и концентрации средства. В некоторых вариантах осуществления жидкую форму вводимой композиции поставляют в герметично закрытом контейнере, содержащем по меньшей мере 0,25 мг/мл, по меньшей мере 0,5 мг/мл, по меньшей мере 1 мг/мл, по меньшей мере 2,5 мг/мл, по меньшей мере 5 мг/мл, по меньшей мере 8 мг/мл, по меньшей мере 10 мг/мл, по меньшей мере 15 мг/мл, по меньшей мере 25 мг/мл, по меньшей мере 50 мг/мл, по меньшей мере 75 мг/мл или по меньшей мере 100 мг/мл ADC. Жидкая форма может храниться при температуре от 2°C до 8°C в оригинальном контейнере.

[00209] В некоторых вариантах осуществления раскрытые антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC могут быть включены в фармацевтическую композицию, подходящую для парентерального введения. Инъекционный раствор может состоять либо из жидкой, либо из лиофилизированной дозированной лекарственной формы в бесцветных или янтарно-желтых флаконе, ампуле или предварительно заполненном шприце или другом известном устройстве для доставки или хранения.

[00210] Описанные в данном документе композиции могут быть в различных формах. К ним относятся, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, таблетки, пилюли, порошки, липосомы и суппозитории. Форма

зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения.

[00211] В различных вариантах осуществления лечение включает однократное болюсное или повторное введение препарата на основе антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC посредством приемлемого пути введения.

[00212] Пациенты могут быть оценены в отношении уровней антигена-мишени в данном образце (например, уровней клеток, экспрессирующих антиген-мишень) для того, чтобы способствовать определению наиболее эффективной схемы введения и т. д. Иллюстративный вариант осуществления представляет собой способ определения того, будет ли пациент отвечать на лечение с помощью антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC по настоящему изобретению, включающий получение биологического образца от пациента и приведение биологического образца в контакт с антителом, антигенсвязывающим фрагментом и/или ADC. Иллюстративные биологические образцы включают ткань или биологическую жидкость, такую как воспалительный экссудат, кровь, сыворотку крови, кишечную жидкость, образец кала или биоптат опухоли (например, биоптат опухоли, полученный от пациента, страдающего от рака, при котором экспрессируется антиген-мишень, например рака, при котором экспрессируется мезотелин, или подверженного риску его развития). В некоторых вариантах осуществления образец (например, ткань и/или биологическая жидкость) может быть получен от субъекта, и подходящий иммунологический способ может быть использован для выявления и/или измерения экспрессии белка антигена-мишени (например, мезотелина). Такие оценки также используются с целью контроля на протяжении всей терапии и полезны для оценки терапевтического успеха в сочетании с оценкой других параметров.

[00213] В некоторых вариантах осуществления эффективность антитела, антигенсвязывающего фрагмента и/или ADC может быть оценена путем приведения в контакт образца опухоли от субъекта с антителом, антигенсвязывающим фрагментом и/или ADC и оценки скорости роста или объема опухоли. В некоторых вариантах осуществления, если антитело, антигенсвязывающий фрагмент и/или ADC были определены как эффективные, их можно вводить субъекту.

[00214] Вышеупомянутые терапевтические подходы можно комбинировать с любым из множества дополнительных режимов хирургического вмешательства, химиотерапии или лучевой терапии. В некоторых вариантах осуществления антитела, антигенсвязывающие фрагменты и/или ADC или композиции, раскрытые в данном документе, составляют и/или вводят совместно с одним или несколькими дополнительными терапевтическими средствами, например одним или несколькими химиотерапевтическими средствами. Неограничивающие примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, например азотистые иприты, соединения на основе этиленимина и алкилсульфонаты; антиметаболиты, например антагонисты фолиевой кислоты, пурина или пиримидина; антимитотические средства, например ингибиторы полимеризации тубулина, такие как эрибулин или мезилат эрибулина (HalavenTM), алкалоиды барвинка и ауристатины; цитотоксические антибиотики;

соединения, которые повреждают ДНК или препятствуют экспрессии или репликации ДНК, например средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК; и антагонисты рецепторов факторов роста. В некоторых вариантах осуществления химиотерапевтическое средство может быть цитотоксическим или цитостатическим средством. Примеры цитотоксических средств включают без ограничения антимитотические средства, такие как эрибулин или эрибулина мезилат (Halaven™), ауристатины (например, монометилауристатин Е (ММАЕ), монометилауристатин F (ММАF)), майтанзиноиды (например, майтанзин), доластатины, дуостатины, криптофицины, алкалоиды барвинка (например, винкристин, винбластин), таксаны, таксолы и колхицины; антрациклины (например, даунорубицин, доксорубицин, дигидроксиантрациндион); цитотоксические антибиотики (например, митомицины, актиномицины, дуокармицины (например, СС-1065), ауромицины, дуомицины, калихеамицины, эндомицины, феномицины); алкилирующие средства (например, цисплатин); интеркалирующие средства (например, этидия бромид); ингибиторы топоизомераз (например, этопозид, тенопозид); радиоактивные изотопы, такие как At211, I131, I125, Y90, Re186, Re188, Sm153, Bi212 или 213, P32 и радиоактивные изотопы лютеция (например, Lu177); и токсины бактериального, грибного, растительного или животного происхождения (например, рицин (например, А-цепь рицина), дифтерийный токсин, экзотоксин А *Pseudomonas* (например, PE40), эндотоксин, митогеллин, комбрестатин, рестриктоцин, гелонин, альфа-сарцин, абрин (например, А-цепь абрина), модекцин (например, А-цепь модекцина), курицин, кротин, ингибитор из *Saponaia officinalis*, глюкокортикоид).

[00215] В данном документе также раскрыты пути применения одного или нескольких раскрытых антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC для изготовления лекарственного препарата для лечения рака, например в соответствии со способами, описанными выше. В некоторых вариантах осуществления ADC, раскрытые в данном документе, применяют для лечения рака, например в соответствии со способами, описанными выше.

[00216] В различных вариантах осуществления наборы для исследовательских и терапевтических применений, описанных в данном документе, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Такие наборы могут содержать носитель, упаковку или контейнер, которые разделены на отсеки, чтобы вмещать один или нескольких контейнеров, таких как флаконы, пробирки и им подобные, при этом каждый из контейнеров содержит один из отдельных элементов для использования в способе, раскрытом в данном документе, вместе с этикеткой или листовкой-вкладышем, содержащими инструкции по применению, например по применению, описанному в данном документе. Наборы могут содержать контейнер, содержащий фрагмент, представляющий собой лекарственное средство. В настоящем изобретении также представлены одно или несколько антител, антигенсвязывающих фрагментов и/или ADC или фармацевтических композиций на их основе, упакованных в герметично закрытый контейнер, такой как ампула или саше, с указанием количества средства.

[00217] Наборы могут содержать контейнер, описанный выше, и один или несколько других контейнеров, связанных с ним, которые содержат материалы, необходимые с коммерческой и пользовательской точки зрения, включая буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы, носитель, упаковку, контейнер, флакон и/или тубик с указанием на этикетке содержимого и/или инструкции по применению, а также листовки-вкладыши с инструкциями по применению.

[00218] Этикетка может присутствовать на контейнере или вместе с ним для указания, что композиция используется для конкретного терапевтического применения или применения, отличного от терапевтического, для такого как прогностическое, профилактическое, диагностическое или лабораторное применение. На этикетке также может быть приведено предписание для применения *in vivo* или *in vitro*, как, например, описано в данном документе. Предписания и другая информация также могут быть включены в листовку-вкладыш (листовки-вкладыши) или в этикетку (этикетки), которые включены в состав комплекта или наклеены на него. Этикетка может быть на контейнере или быть связана с ним. Этикетка может быть на самом контейнере, если буквы, числа или другие символы, образующие этикетку, выпрессованы или выгравированы на самом контейнере. Этикетка может быть связана с контейнером, если он присутствует в емкости или носителе, которые также удерживают контейнер, например, в виде листовки-вкладыша. На этикетке может указываться, что композиция применяется для диагностики или лечения состояния, такого как рак, описанного в данном документе.

[00219] Для специалистов в данной области будет очевидно, что другие подходящие модификации и адаптации описанных в данном документе способов по настоящему изобретению очевидны и могут быть выполнены с использованием подходящих эквивалентов, не выходя за рамки объема настоящего изобретения или раскрытых в данном документе вариантов осуществления. После подробного описания настоящего изобретения то же самое будет более понятно со ссылкой на следующие примеры, которые включены только в целях иллюстрации и не предназначены для ограничения.

ПРИМЕРЫ

[0003] ПРИМЕР 1. Получение химерного антитела к мезотелину человека

[00220] Химерные антитела, содержащие последовательности кроличьего и человеческого иммуноглобулинов, получили в соответствии с процедурами, описанными ниже. Антитела анализировали в отношении связывания с мезотелином человека и связывания эпитопа. Цитотоксичность исходных ADC рекомбинантных химерных антител к мезотелину оценивали на линиях клеток человека, экспрессирующих различные уровни мезотелина. Ведущие антитела для гуманизации и разработки ADC описаны в примерах 2-3.

1.1 Реагенты и материалы

[1000] 1.1.1 Антитела

[00221] Антитела, использованные в следующих исследованиях, представляют собой кроличье-человеческую химерную (-xi) форму антител к мезотелину человека и

содержат неспаренный цистеин в положении 80 легкой цепи (LCcys80). Антитела очищали и децистеинилировали, как описано ниже в разделе 1.5. Окончательное содержание белка оценивали с помощью анализа BCA и SDS-PAGE.

[1001] 1.1.2 Конъюгируемые цитотоксины и ADC LCcys80

[00222] Соединения линкер-цитотоксин, использованные в следующих исследованиях, включают Mal-PEG₂-ауристатин F. Антитела конъюгировали с Mal-PEG₂-ауристатином F в молярном соотношении 1:5 (mAb:полезная нагрузка). Конъюгированные антитела LCcys80 очищали с помощью обессоливающей хроматографии с обессоливающими колонками HiTrap объемом 2×5 мл (GE Healthcare) на АКТА FPLC с использованием 1-кратного DPBS в качестве рабочего буфера. Окончательное содержание белка определяли с помощью анализа BCA.

[1002] 1.1.3 Линии опухолевых клеток

[00223] Линии опухолевых клеток человека, использованные в анализе кроличье-человеческих химерных ADC, включали A431-K5 (клетки меланомы человека A431, стабильно трансфицированные мезотелином человека, MSLN^{hi}), A431 (MSLN^{lo}) и OVCAR3 (карцинома яичника человека, MSLN^{hi}). Клетки A431-K5 были получены из Национального института рака. Используемые клеточные линии были получены непосредственно из Американской коллекции типовых культур (ATCC).

[1003] 1.1.4 Другие реагенты

[00224] Все использованные реагенты были получены от коммерческих поставщиков исследовательской чистоты или выше, если не указано иное.

1.2 Выработка антител у кроликов к мезотелину человека

[00225] cDNA мезотелина человека из вектора p0301 клонировали в вектор экспрессии Aldevron (pB8-Mesothelin-hum). Затем двух кроликов иммунизировали вектором иммунизации pB8-мезотелин человека. После четырех генетических применений иммунную сыворотку брали на 52-й день протокола иммунизации. Иммунную сыворотку кролика разбавляли 1:1000 или 1:5000 в PBS, содержащем 1% BSA, и тестировали с помощью проточной цитометрии с использованием клеток млекопитающих, предварительно временно трансфицированных cDNA мезотелина человека, клонированной в вектор экспрессии Aldevron (pB1-мезотелин человека), и клеток млекопитающих, временно трансфицированных нерелевантной cDNA, клонированной в тот же вектор. Затем антитела из иммунных сывороток определяли с помощью 10 мкг/мл козьего антитела к кроличьему IgG с R-фикоэритрином (Southern Biotech, кат. № 4030-09). Иммунизацию, проточную цитометрию и криоконсервацию клеток проводили при помощи Aldevron (Драйбург, Германия).

1.3 Высокопроизводительный скрининг культур, продуцирующих антитела к мезотелину

[1004] 1.3.1 Культура клеток

[00226] Криоконсервированные клетки лимфатических узлов кролика ($2,0 \times 10^7$ клеток) оттаивали, затем активировали с помощью 2,5 мкг/мл лектина из *Phytolacca*

americana и восстанавливали ДНКазой I в течение одного часа при 37°C с 5% CO₂. Клетки высевали по 5 клеток на лунку на 384-луночный планшет с фидерными клетками (CHO, экспрессирующие CD154 кролика) и культивировали в полной IMDM (IMDM с добавлением 10% FBS, 2 mM L-глутамина, 1-кратной MEM NEAA, 1 mM пирувата натрия, 50 ед./мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина, 55 мкМ 2-Me), которая содержала цитокины, 10,5 нг/мл человеческого IL2 и 10,5 нг/мл человеческого IL21 (PeproTech).

[1005] 1.3.2 Выделение IgG кролика и поликлональных антител к мезотелину человека

[00227] На 2-й неделе лунки, продуцирующие кроличьи антитела IgG, идентифицировали с помощью FRET IgG с использованием криптата европия. Лунки, продуцирующие IgG, проверяли на присутствие кроличьего антитела Fcγ IgG с помощью ELISA против планшетов, покрытых 1 мкг/мл мезотелина CHO-MT40. Культуры, продуцирующие специфичные к мезотелину кроличьи IgG, подтверждали скринингом на основе ELISA против 1 мкг/мл мезотелина и встречным скринингом против 1 мкг/мл CD73-his. FRET и ELISA проводили на роботизированной системе Biomek® FX (Beckman).

[1006] 1.3.3 "Спасение гена" mRNA кроличьих антител к мезотелину человека

[00228] Общую РНК выделяли из лунок, продуцирующих кроличьи антитела IgG к мезотелину, с использованием набора для выделения общей РНК RNAqueous™-96 Total RNA (Ambion). Синтезировали cDNA и вариабельные области легкой и тяжелой цепей амплифицировали с помощью ПЦР с использованием набора Platinum Taq one step RT-PCR (Invitrogen) с использованием собственных праймеров (таблица 11). Вариабельные области легкой и тяжелой цепей амплифицировали с вложенными праймерами (таблица 12) с использованием набора Platinum Taq Amplification Kit и термоциклера (40 циклов, 1 мин 94°C, 1 мин 54°C, 1,5 мин 68°C). Матрицу амплифицированной ДНК визуализировали с помощью гель-электрофореза, очищали с помощью набора QIAquick 96 PCR Purification (Qiagen), а последовательность ДНК определяли с помощью GeneWiz (Саут-Плейнфилд, штат Нью-Джерси, США) с использованием собственных праймеров (таблица 13). Последовательности ДНК анализировали относительно кроличьих семейств V-генов и J-генов (IMGT/V-QUEST) и с использованием внутренней базы данных праймеров In-Fusion (Blastn). Были либо идентифицированы, либо сконструированы праймеры In-Fusion (таблица 14), содержащие линкер Fc человека, добавленный к 5'-концу для праймера V- и J-генов. Праймеры синтезировали в IDT (Коралвилл, штат Айова, США).

Таблица 11. Последовательности праймеров, используемые для одностадийной RT-PCR

Ген	5'-праймер	3'-праймер
Тяжелая	TYCTCCTGGTCRCTSYGCTC (SEQ ID NO: 37)	TTGGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 38)
Легкая	GGGCCCCCACTCAGCTGCTG (SEQ ID NO: 39)	GTTBTACTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 40)

Таблица 12. Последовательности праймеров, используемые для ПЦР

Ген	5'-праймер	3'-праймер
Тяжелая	TYCTCCTGGTCRCTSYGCTC (SEQ ID NO: 41)	TTGGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 42)
Легкая	ACTCAGCTGCTGGGGCTCCT (SEQ ID NO: 43)	GTTBTA CTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 44)

Таблица 13. Последовательности праймеров, используемые для секвенирования матрицы ДНК

Ген	3'-праймер
Тяжелая	TTGGTGTTGGTGGCTGGGTG (SEQ ID NO: 45)
Легкая	GTTBTA CTGKTMTYGATGCC (SEQ ID NO: 46)

Таблица 14. Последовательности праймеров, использованные для ПЦР In-Fusion для образца 345A12

Ген	5'-праймер	3'-праймер
Тяжелая	gccaccggcgtgcactccCAGTCGYTGGA GGAGTCCGGGGG (SEQ ID NO: 47)	gggcccttggtggatgcTGARGAGACRGT GACSAGGGTSCC (SEQ ID NO: 48)
Легкая	gccaccggcgtgcactccGCCTATGATATG ACCCAGACTCCA (SEQ ID NO: 49)	agccacagttcgTTTGACSACCACCTCG GTCCC (SEQ ID NO: 50)

[1007] 1.3.4 ПЦР-фрагменты

[00229] Амплифицированные с помощью ПЦР переменные домены включали 15 пар оснований на 5'- и 3'-концах, гомологичных сайту клонирования в векторе субклонирования. ПЦР-фрагменты субклонировали в плазмиду экспрессии, содержащую человеческую константную область гамма (p1974 pC+75IZ-ldr-InFusion-hugamma) или каппа (p1975 pC+75IB-ldr-InFusion-hukappa), используя набор для клонирования In-Fusion HD (Clontech) в соответствии с протоколом производителя. С помощью 1 мкл реакционной среды In-Fusion трансформировали компетентные клетки Stellar (Clontech) в соответствии с протоколом производителя. Трансформанты выращивали в 1 мл среды ТВ (Teknova) в течение ночи при 37°C на встряхивателе для микротитровальных планшетов. На следующий день культуры подвергали минипрепарации с помощью набора QIAprep 96 Turbo miniprep kit (Qiagen) с использованием eMotion 5075 в соответствии с протоколом производителя.

[1008] 1.3.5 Фрагменты синтеза генов

[00230] Гуманизированные переменные домены тяжелой и легкой цепей оптимизировали по кодонам для экспрессии в клетках яичника китайского хомячка (CHO) и синтезировали в компании GeneArt. Переменные домены синтезировали с последовательностью инициации трансляции Kozak и лидерной последовательностью секрети Ig, и они включали 15 пар оснований на 5'- и 3'-концах, гомологичных сайту

клонирования в векторе субклонирования. ПЦР-фрагменты, синтезированные в GeneArt, субклонировали в плазмиду экспрессии, содержащую человеческую константную область гамма (p1974 pC+75IZ-ldr-InFusion-hugamma) или каппа (p1975 pC+75IB-ldr-InFusion-hukappa), используя набор для клонирования In-Fusion HD (Clontech). Все клоны секвенировали для подтверждения наличия и точности вставок.

1.4 Временная продукция mAb

[1009] 1.4.1 Клетки НЕК

[00231] На каждый миллилитр 3×10^6 клеток, подлежащих трансфекции с ExpiFectamine (ThermoFisher), 333,3 нг плазмиды НС и 333,3 нг плазмиды ЛС инкубировали в течение 5-10 минут в 50 мкл Opti-MEM (ThermoFisher). Аналогично, 2,67 мкл ExpiFectamine инкубировали в 50 мкл Opti-MEM. К смеси ДНК добавляли раствор ExpiFectamine и инкубировали в течение 20-30 мин при комнатной температуре. Смесь ДНК:ExpiFectamine добавляли к клеткам при вращении и инкубировали при 37°C, 8% CO₂, встряхивая при 125 об/мин. На следующий день к трансфекции добавляли 5 мкл усилителя 1 и 50 мкл усилителя 2 на мл клеток с продолжением инкубации еще в течение 7-10 дней. Через 48-72 часа клетки подкармливали в конечной концентрации 10 г/л Yeastolate (BD Biosciences), 5 мМ валериановой кислоты (Sigma-Aldrich) и 1:100 липидного концентрата с заданным химическим составом (ThermoFisher).

[1010] 1.4.2 Клетки CHO

[00232] На каждый миллилитр 6×10^6 клеток, подлежащих трансфекции с помощью ExpiFectamine CHO (ThermoFisher), 500 нг плазмиды НС и 500 нг плазмиды ЛС смешивали в Opti-PRO (ThermoFisher) в общем объеме 40 мкл. Аналогично, 3,2 мкл ExpiFectamine CHO смешивали в 36,8 мкл Opti-PRO. К смеси ДНК добавляли раствор ExpiFectamine CHO и инкубировали в течение 1-5 мин при комнатной температуре. Смесь ДНК:ExpiFectamine CHO добавляли к клеткам при вращении и инкубировали при 37°C, 8% CO₂, встряхивая при 125 об/мин. На следующий день к трансфекции добавляли 6 мкл усилителя и 160 мкл подпитки на мл клеток и клетки переносили в 32°C, 5% CO₂. На 5-й день добавляли дополнительно 160 мкл подпитки на мл клеток. На 12-14 день собирали супернатанты.

1.5 Очистка и децистенилирование mAb

[1011] 1.5.1 Очистка антител

[00233] Смолю Prosep-vA High Capacity Protein A (Millipore) уравнивали с помощью DPBS и добавляли 50 мкл к 2 мл образца. После инкубации при комнатной температуре в течение 1 часа среду и смолу добавляли на фильтровальный планшет и дважды промывали с 1 мл DPBS. Образец элюировали из смолы добавлением 400 мкл 0,1 М глицина, pH 2,9, с последующим центрифугированием при 15000×g в течение 30 секунд. Образец нейтрализовали с помощью 20 мкл 1 М Трис, pH 8,0. Образцы концентрировали примерно до 100 мкл путем центрифугирования при 15000 x g в течение 5 минут с использованием 0,5 мл Amicon Ultra, фильтров с отсечением по размеру 10000 (Millipore), и подвергали буферному обмену на DPBS с использованием 0,5 мл обессоливающих колонок Zeba, 7K MWCO, в соответствии с протоколом производителя. Концентрацию mAb

определяли путем измерения AU280 и переводили в мг/мл с использованием коэффициента экстинкции mAb.

[1012] 1.5.2 Декэппирование цистеина

[00234] Очистку проводили с использованием платформы для очистки АКТА Xpress (GE Healthcare). До 1 л кондиционированной среды загружали на колонку 5 мл MabSelect (GE Healthcare), уравновешенную 20 mM фосфатом натрия, 150 mM NaCl, pH 7,0. После загрузки колонку тщательно промывали уравнивающим буфером до тех пор, пока не наблюдался стабильный базовый уровень. Связанный материал элюировали при помощи 100 mM глицина, pH 2,9. Элюированный материал немедленно вводили в обессоливающую колонку HiPrep 26/10 (GE Healthcare), уравновешенную 1-кратным фосфатно-солевым буфером (PBS), и элюировали тем же буфером. Пиковые фракции объединяли. Материал анализировали в отношении содержания белка с помощью анализа BCA (ThermoFisher) и электрофореза с помощью восстанавливающего и невосстанавливающего SDS-PAGE.

1.6 Первоначальный скрининг и характеристика рекомбинантных химерных антител к мезотелину для разработки ADC

[00235] Антитела к мезотелину временно экспрессировали и культивировали в 96-луночных планшетах с глубокими лунками с использованием среды Expi-293. Антитела из супернатанта очищали и децистенилировали, как описано выше. Антитела конъюгировали с использованием Mal-PEG₂-ауристатин F в качестве полезной нагрузки, используя молярное соотношение 1:5 (mAb:полезная нагрузка). Конъюгированные антитела обессоливали для удаления лишней свободной полезной нагрузки с использованием вращающихся планшетоов для обессоливания Thermo Zeba.

1.7 Определение характеристики связывания

[1013] 1.7.1 Эпитоп-специфическая сортировка антител к мезотелину с использованием Octet

[00236] Эпитоп, связывающий антитело с мезотелином, первоначально охарактеризовали с использованием Octet с зондом на основе стрептавидина, при помощи индивидуального анализа связывания. Связывание эпитопа для антител к мезотелину нормализовали по эпитопу, связанному известным антителом к мезотелину, MORAb-009 (аматуксимаб). Антитела группировали на основе их связывания с тем же эпитопом, с соседним или другим эпитопом, что и MORAb-009. Стадии повторяли до тех пор, пока все антитела не выравнивались в соответствии с различной эпитоп-специфической сортировкой. Аффинность связывания оценивали как высокую, среднюю и низкую на основании результатов Octet. Все стадии связывания проводили в буфере PBST, содержащем 0,2% BSA.

[1014] 1.7.2 Анализ связывания методом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore)

[00237] Аффинность связывания антител к мезотелину с мезотелином измеряли с помощью BIAcore (BIAcore T-100, GE Healthcare, кат. № 1426075) с использованием чипа CM5 серии S. Концентрации антител доводили до 1 мкг/мл, а мезотелина (50 мкг) до 100

нМ в 1-кратном буфере HBS-P+ (GE Healthcare). Чип для захвата антител человека получали в соответствии с протоколом производителя с использованием чипа CM5 с мастером иммобилизации. Конечные уровни захватывающих антител составляли 8000-9000 RU в HBS-P+. Чип подготовили для анализа с пятью циклами 300-секундной инъекции буфера с последующей 30-секундной регенерацией, все со скоростью 30 мкл/мин во всех четырех проточных ячейках. Антитела захватывали на проточных ячейках 2-4 путем последовательного введения растворов индивидуальных лигандов в течение 90 секунд со скоростью 10 мкл/мин. Введение аналита осуществляли по кинетике одного цикла путем последовательного введения растворов аналита от низкой до высокой концентрации в течение 240 секунд каждое со скоростью 30 мкл/мин. Выявление проводили 2-1, 3-1, 4-1. Двойное сравнение выполняли при помощи последовательности идентичных введений захвата лиганда, за которыми следовали 5 введений только буфера по 240 секунд каждое, диссоциация в течение 1800 секунд и регенерация, как описано выше. Все лиганды анализировали в отношении связывания с мезотелином в двух повторностях. Кинетический анализ выполняли при помощи программного обеспечения BIAEvaluation с использованием модели аппроксимации Ленгмюра 1:1. Константы ассоциации, диссоциации и аффинности усредняли исходя из повторных прогонов.

1.8 Анализ цитотоксичности *in vitro*

[00238] Клетки A431, A431-K5 и OVCAR3 субкультивировали и высевали по 5000 клеток/лунку в полную среду для роста в 96-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Реагенты для испытания последовательно разбавляли 1:3 в планшетах для разведения с глубокими лунками объемом 2 мл, начиная с 200 нМ (всего 10 разведений). Разбавленные образцы (100 мкл) добавляли в планшеты с клетками (начальная концентрация испытуемых образцов 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение еще 5 дней. Затем среду удаляли и планшеты однократно промывали с помощью 200 мкл DPBS, окрашивали с помощью 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе и растворяли кристаллический фиолетовый в 200 мкл 1% раствора SDS. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали с помощью GraphPad Prism 6.

1.9 Результаты

[1015] 1.9.1 Иммунизация кроликов

[00239] Двух кроликов ДНК-иммунизировали плазмидой pB8-мезотелин человека в течение четырех генетических применений. Иммунные сыворотки брали на 52-й день протокола иммунизации, разбавляли 1:1000 или 1:5000 в PBS, содержащем 1% BSA, и тестировали с помощью проточной цитометрии с использованием клеток, экспрессирующих мезотелин. Сыворотка крови обоих иммунизированных кроликов связывала клетки, экспрессирующие мезотелин, которые представляли собой клетки, трансфицированные pB1-мезотелин человека (фиг. 1, нижние кривые). И наоборот, сыворотка иммунизированных кроликов не связывала клетки, трансфицированные

нерелевантной cDNA (фиг. 1, верхние кривые).

[1016] 1.9.2 Высокопроизводительный скрининг культур, продуцирующих кроличьи поликлональные антитела к мезотелину человека

[00240] Клетки лимфатических узлов кролика собирали и криоконсервировали. Клетки (2×10^7 клеток) из размороженного лимфатического узла высевали по 5 клеток на лунку на 384-луночный планшет с фидерными клетками и культивировали в полной IMDM, содержащей цитокины, 10,5 нг/мл человеческого IL-2 и 10,5 нг/мл человеческого IL-21. Лунки, продуцирующие кроличьи антитела IgG, идентифицировали через две недели после посева с помощью FRET IgG с использованием криптата европия, и 18715 культур, продуцирующих IgG, подвергали скринингу с помощью ELISA на реактивность в отношении мезотелина человека. Восемьдесят пять культур, специфичных для мезотелина, повторно подтверждали в отношении реактивности к мезотелину и подвергали встречному скринингу на предмет реактивности в отношении человеческого CD73. Имелось 54 подтвержденных культуры, продуцирующих кроличьи Fcγ-антитела, которые связывали мезотелин с оптической плотностью выше 0,2 OD₄₅₀ без перекрестной реактивности с CD73 (фиг. 2). Первичные результаты ELISA показаны в крайнем справа наборе столбцов, вторичные результаты ELISA показаны в крайнем слева наборе столбцов, а связывание человеческого CD73 показано в среднем наборе столбцов.

[1017] 1.9.3 RT-PCR, секвенирование и клонирование вариабельных областей

[00241] Общую РНК выделяли из 54 подтвержденных культур, продуцирующих кроличьи антитела IgG к мезотелину, cDNA синтезировали с помощью RT-PCR, а вариабельные области легкой и тяжелой цепей подвергали ПЦР-амплификации. Пятьдесят две последовательности ДНК проанализировали с использованием кроличьих семейств V-генов и J-генов (IMGT/V-QUEST) и 51 амплифицировали с помощью ПЦР с праймерами, специфичными для клонирования In-Fusion, в векторы экспрессии константной области (фиг. 3). В общей сложности 48 антител клонировали в векторы экспрессии константной области человека и затем трансфицировали в клетки exрi293F. Антитело обнаружили в 45 из 51 трансфектанта (фиг. 4), вариабельные области кролика клонировали способом In-Fusion в векторы экспрессии константных областей человека.

[1018] 1.9.4 Первоначальный скрининг ADC против экспрессирующих мезотелин клеток

[00242] Химерные кроличьи антитела к мезотелину человека (rb-hu-xi к MSLN) очищали в соответствии со способом, описанным в разделе 1.5. Определяли концентрацию белка в очищенных антителах (фиг. 5). Чтобы завершить скрининг антител к мезотелину для разработки ADC, провели микроконъюгацию антитела к мезотелину с Mal-PEG₂-ауристин F, и ADC охарактеризовали в анализе эффективности на основе клеток *in vitro* с использованием клеточных линий OVCAR3, A431-K5 и A431, где OVCAR3 и A431-K5 экспрессировали высокий уровень мезотелина, а A431(MSLN⁻) использовали в качестве контрольной клеточной линии для оценки нецелевого уничтожения и специфичности ADC (фиг. 6).

[1019] 1.9.5 Связывание эпитопа у антител к мезотелину

[00243] Эпитоп связывания с мезотелином у 48 антител к мезотелину характеризовали с использованием Octet, как указано в разделе 1.7.1. Для антител идентифицировали шесть различных эпитопов, и для 102A6 не наблюдали связывания в текущем формате с помощью Octet (фиг. 7). Аффинность связывания антител с мезотелином измеряли с помощью BIAcore, как указано в разделе 1.7.2. Результаты аффинности связывания обобщены в таблице 15.

Таблица 15. Аффинность связывания антител к мезотелину с мезотелином

Эпитопная группа	Кривая	k_a (1/мс)	k_d (1/с)	K_D (М)	R_{max} (RU)	χ^2 (RU ²)
	M09-3	1,95E+06	2,92E-04	1,50E-10	40,19	0,646
	55B4-1	1,67E+06	8,32E-03	4,98E-09	42,33	1,72
	55B4-2	1,04E+06	5,52E-03	5,33E-09	42,6	0,586
MORAb-009	62B10-1	2,10E+06	8,57E-03	4,08E-09	47,6	3,54
	62B10-2	9,91E+05	6,71E-03	6,77E-09	46,58	0,398
	131F9-1	8,36E+05	7,23E-03	8,65E-09	48,89	0,458
	131F9-2	8,71E+05	6,79E-03	7,79E-09	48,71	0,639
	145D4-1	8,05E+05	6,83E-03	8,48E-09	50,61	0,489
	145D4-2	8,69E+05	6,90E-03	7,95E-09	51,21	0,681
	342P20-1	1,74E+06	2,27E-04	1,30E-10	29,15	0,498
	342P20-2	2,32E+06	2,51E-04	1,08E-10	27,51	0,447
	Xi-33O11	1,99E+06	6,68E-04	3,35E-10	35,89	0,169
	43F8-1	7,10E+05	6,37E-03	8,97E-09	35,29	0,48
№1	43F8-2	7,77E+05	5,82E-03	7,48E-09	36,43	0,78
	201C15-1	2,74E+05	1,29E-04	4,70E-10	63,95	0,75
	201C15-2	2,64E+06	3,45E-04	1,31E-10	58,09	0,568
	X-237N18	1,27E+06	4,28E-03	3,38E-09	41,45	0,295
	Xi-393L14	1,10E+06	2,57E-04	2,33E-10	46,47	0,627
№3	Xi-383I18(AuF)	1,01E+06	2,81E-04	2,80E-10	43,9	0,494
	346C6-1	6,82E+05	4,81E-04	7,06E-10	44,85	0,218
	346C6-2	1,15E+06	6,09E-04	5,29E-10	45,06	0,503
	345A12-1	2,89E+06	4,12E-04	1,43E-10	39	0,793
№5	345A12-2	2,85E+06	3,89E-04	1,36E-10	38,63	0,833

	120N18-1	6,26E+05	5,26E-04	8,41E-10	50,28	0,323
	120N18-2	6,57E+05	5,13E-04	7,80E-10	50,89	0,395
	82M2-1	7,18E+05	4,35E-04	6,06E-10	47,12	0,493
№6	82M2-2	8,98E+05	4,74E-04	5,28E-10	48,64	0,961
М09/№2	264E24-1	4,01E+05	5,81E-05	1,45E-10	48,8	0,347
гибрид	264E24-2	4,10E+05	5,47E-05	1,34E-10	49,33	0,423
М09/№3	238B22-1	2,60E+05	3,03E-03	1,17E-08	153,1	6,95
гибрид	238B22-2	4,31E+05	6,03E-03	1,40E-08	57,04	0,318

[00244] На основании приведенных выше результатов пятнадцать антител, которые охватывают все эпитопные группы, отобрали для конъюгации в увеличенном масштабе и характеристики, как указано в таблице 16. 102A6A также выбрали на основании благоприятной активности *in vitro* при конъюгации с ауристатином F.

Таблица 16. Пятнадцать выбранных антител к мезотелину и их эпитопные группы

Эпитопная группа	Ведущие антитела
Группа №1	33O11, 210C15
Группа №2	111B10, 324O5, 178F16, 264E24
Группа №3	237N18, 383I18, 393L14, 346C6
Группа №4	62B10, 55B4, MORAb009
Группа №5	120N18, 345A12
Связывание отсутствует	102A6A

[0004] ПРИМЕР 2. Гуманизация ADC к мезотелину

[00245] Гуманизированные антитела к мезотелину получали в соответствии с процедурами, описанными ниже. Антитела и ADC анализировали в отношении сохраняющейся активности связывания с мезотелином человека и способность уничтожать клетки по отношению к клеткам, экспрессирующим мезотелин. Антитела также биофизически характеризовали в отношении нагрузки лекарственным средством, агрегации, термостабильности и стабильности в сыворотке крови и матриксе. Ведущие гуманизированные антитела и ADC оценивали *in vivo*, как описано в примере 3.

1

2.1 Реагенты и материалы

[1020] 2.1.1 Антитела

[00246] Антитела, использованные в следующих исследованиях, содержат неспаренный цистеин в положении 80 легкой цепи (LCcys80) и включают как кроличье-человеческие химерные (-xi), так и гуманизированные (-zu) формы антител к мезотелину человека 33O11, 201C15, 111B10, 324O5, 178F16, 264E24, 237N18, 383I18, 393L14, 346C6,

62B10, 55B4, MORAb009, 120N18, 345A12 и 102A6A2. Антитела очищали партиями с использованием смолы Prosep-vA High Capacity Protein A и колонок для обессоливания Zeba. Кондиционированную среду очищали и децистенилировали, как описано в разделе 1.5 (пример 1). Окончательное содержание белка оценивали с помощью анализа BCA и SDS-PAGE.

[1021] 2.1.2 Конъюгируемые цитотоксины и ADC LCcys80

[00247] Соединения линкер-цитотоксин, использованные в следующих исследованиях, включают малеимид-VCP-эрибулин, малеимид-VCP-криптофицин и малеимид-VCP-димер эрибулина. Конъюгированные антитела очищали с помощью обессоливающей хроматографии с обессоливающими колонками HiTrap (GE Healthcare), уравновешенными в 1-кратном DPBS. Окончательное содержание белка определяли с помощью анализа BCA.

[1022] 2.1.3 Линии опухолевых клеток

[00248] Линии опухолевых клеток человека, использованные в анализе кроличье-человеческих химерных ADC, включали A431 (клетки меланомы человека, MSLN^{neg}), A3 (A431, стабильно трансфицированные мезотелином человека, MSLN^{hi}), OVCAR3 (клетки карциномы яичника человека, MSLN^{hi}), HEC-251 (эндометриоид человека, MSLN^{med}) и H226 (плоскоклеточная мезотелиома легкого человека, MSLN^{lo}). Все использованные клеточные линии получены непосредственно из Американской коллекции типовых культур (ATCC), за исключением A3, которая получена в Morphotek из родительской клеточной линии A431, и HEC-251, которая получена из JCRB.

[1023] 2.1.4 Другие реагенты

[00249] Все использованные реагенты были получены от коммерческих поставщиков исследовательской чистоты или выше, если не указано иное.

2.2 Биофизическая характеристика ADC

[1024] 2.2.1 Анализ агрегации способом SEC-HPLC

[00250] Анализ SEC-HPLC проводили с использованием системы HPLC Agilent 1200. Защитную колонку AdvanceBio SEC 300A (2,7 мкм, 7,8×50 мм, серийный номер 0006344424-13, номер партии 0006344424) соединяли с аналитической колонкой AdvanceBio SEC 300A (2,7 мкм, 7,8×300 мм, серийный номер 0006336837-4, номер партии 0006336837), уравновешенной в 0,1 М фосфате натрия, 0,15 М хлориде натрия, 5% IPA, pH 7,4, при скорости потока 0,5 мл/мин.

[00251] Агрегацию ADC LCcys80 анализировали с помощью эксклюзионной высокоэффективной жидкостной хроматографии (SEC-HPLC) с использованием HPLC Agilent 1200. Антитела и ADC готовили в концентрации 2 мг/мл в 1-кратном DPBS, вводили по 8 мкл (16 мкг) каждого образца и запускали в течение 36 мин. Все данные анализировали с использованием программного обеспечения Agilent ChemStation. Регистрировали процент агрегации, процент мономера и процент фрагментации.

[1025] 2.2.2 Анализ DAR способом хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC)

[00252] DAR анализировали с помощью хроматографии гидрофобного взаимодействия (HIC-HPLC) на системе HPLC Agilent 1260. Образцы вводили в колонку TSKgel Ethyl-5PW (TOSOH Bioscience, внутренний диаметр 7,5 мм x 7,5 см, 10 мкм, размер без пор) и элюировали с колонки с 3-минутным уравниванием в 100% подвижной фазе А, 15-минутным градиентом (0-100% В), 5-минутной выдержкой в 100% В, 1-минутной заменой на 100% А и 5-минутным повторным уравниванием в 100% подвижной фазе А со скоростью 0,7 мл/мин. Подвижная фаза А представляла собой 25 мМ фосфата натрия, 1,5 М сульфата аммония, pH 7,0. Подвижная фаза В представляла собой 25 мМ фосфата натрия, 25% изопропанола, pH 7,0. Детектирование проводили при 280 нм (эталон 320 нм). DAR определяли по формуле:

$$[AUC+1+2(AUC+2) + 3(AUC+3) + \dots n(AUC+n)]/\Sigma AUC_{tot}],$$

где AUC+1 представляет собой площадь под кривой для пика антитела, соответствующего ADC, конъюгированного с одним цитотоксином, а AUC+2 представляет собой площадь под кривой для пика антитела, соответствующего ADC, конъюгированного с двумя цитотоксинами. ΣAUC_{tot} представляет собой объединенную площадь под кривой для конъюгированного и неконъюгированного пиков (DAR=0, 1 и 2).

[1026] 2.2.3 Анализ DAR способом жидкостной хроматографии/масс-спектрометрии (LC-MS)

[00253] DAR также анализировали с использованием способа LC-MS с помощью HPLC Waters Alliance с детектированием SQD/PDA. Образцы вводили в колонку Proteomix RP-1000 (5 мкм, 1000 Å, 4,6 мм x 15 см, Sepax) при 65°C и элюировали с 3-минутным уравниванием в 25% В, 27-минутным линейным градиентом от 25% до 55% В, 5-минутной выдержкой при 55% В, 1-минутной выдержкой при 90% В, 5-минутной выдержкой при 90% В, 1-минутной заменой на 25% В и 5-минутным повторным уравниванием при 25% В. Подвижная фаза А представляла собой 0,1% TFA в воде, а подвижная фаза В представляла собой 0,1% TFA в ацетонитриле. Затем элюат разделяли в пропорции 10:1 на детекторы PDA и SQD. Детектор SQD был настроен как положительный ES, напряжение капилляра 3,5 кВ, напряжение конуса 50 В, экстрактор 5 В и ВЧ-линза 0,3 В, температура источника 150°C, температура десольватации 350°C. Данные массы получали при 200-2000 м/з в течение 40 мин в непрерывном режиме и при времени сканирования 1 с. Данные проанализировали и подвергли деконволюции в автономном режиме с использованием MassLynx и MaxEnt1. DAR рассчитывали по формуле:

$$2[[AUCLC+1+2(AUCLC+2) + 3(AUCLC+3) + \dots n (AUCLC+n)]/\Sigma ILCTot] + 2[[AUCHC+1+2(AUCHC+2) + 3(AUCHC+3) + \dots n (AUCHC+n)]/\Sigma AUHCtot],$$

где AUCLC+1 представляет собой площадь под кривой пика легкой цепи, конъюгированной с одним цитотоксином, AUCLC+2 представляет собой площадь под кривой пика легкой цепи, конъюгированной с двумя цитотоксинами, и т. д. AUHC представляет собой площадь под кривой соответствующих тяжелых цепей, а $\Sigma AUCLCTot$ и $\Sigma AUHCtot$ представляют собой объединенную площадь под кривой всех неконъюгированных и конъюгированных легких цепей и тяжелых цепей соответственно.

2.3 Определение характеристики связывания

[1027] 2.3.1 Эпитоп-специфическая сортировка антител к мезотелину с использованием Octet

[00254] Эпитоп, связывающий антитело с мезотелином, первоначально охарактеризовали с использованием Octet с зондом на основе стрептавидина, при помощи индивидуального анализа связывания. Связывание эпитопа для антител к мезотелину нормализовали по эпитопу, связанному известным антителом к мезотелину, MORAb-009. Антитела группировали на основе их связывания с тем же эпитопом, с соседним или другим эпитопом, что и MORAb-009. Стадии повторяли до тех пор, пока все антитела не выравнивались в соответствии с различной эпитоп-специфической сортировкой. Аффинность связывания оценивали как высокую, среднюю и низкую на основании результатов Octet. Все стадии связывания проводили в буфере PBST, содержащем 0,2% BSA.

[1028] 2.3.2 Анализ связывания способом поверхностного плазмонного резонанса (BIAcore)

[00255] Аффинность связывания антител к мезотелину с мезотелином измеряли с помощью BIAcore (BIAcore T-100, GE Healthcare, кат. № 1426075) с использованием чипа CM5 серии S. Концентрации антител доводили до 1 мкг/мл, а мезотелина (50 мкг) до 100 нМ в 1-кратном буфере HBS-P+ (GE Healthcare). Чип для захвата антител человека получали в соответствии с протоколом производителя с использованием чипа CM5 с мастером иммобилизации. Конечные уровни захватывающих антител составляли 8000-9000 RU в HBS-P+. Чип подготовили для анализа с пятью циклами 300-секундной инъекции буфера с последующей 30-секундной регенерацией, все со скоростью 30 мкл/мин во всех четырех проточных ячейках. Антитела захватывали на проточных ячейках 2-4 путем последовательного введения растворов индивидуальных лигандов в течение 90 секунд со скоростью 10 мкл/мин. Введение аналита осуществляли по кинетике одного цикла путем последовательного введения растворов аналита от низкой до высокой концентрации в течение 240 секунд каждое со скоростью 30 мкл/мин. Выявление проводили 2-1, 3-1, 4-1. Двойное сравнение выполняли при помощи последовательности идентичных введений захвата лиганда, за которыми следовали 5 введений только буфера по 240 секунд каждое, диссоциация в течение 1800 секунд и регенерация, как описано выше. Все лиганды анализировали в отношении связывания с мезотелином в двух повторностях. Кинетический анализ выполняли при помощи программного обеспечения BIAEvaluations с использованием модели аппроксимации Ленгмюра 1:1. Константы ассоциации, диссоциации и аффинности усредняли исходя из повторных прогонов.

2.4 Анализ термостабильности способом дифференциальной сканирующей калориметрии (DSC)

[00256] Для расшифровки и сравнения структуры более высокого порядка и термостабильности различных фрагментов F(ab')₂ и контролей использовали дифференциальный сканирующий калориметр с VP-капиллярной ячейкой (VP-CapDSC;

Microcal, VP-CapDSC, кат. № 12-07-149, с графическим отображением при помощи Origin-7 и программным обеспечением MicroCal VP-Capillary DSC Software v.2.0). Образцы готовили на 96-луночных планшетах для анализа (Microliter Analytical Supply) с использованием 20% раствора Contrad и анализировали в автоматическом пробоотборнике при 10°C.

2.5 Анализ способом капиллярной изоэлектрической фокусировки (cIEF)

[00257] Реагенты автоматического пробоотборника заполняли в соответствии с процедурами установки и запуска CFR. В качестве стандарта стабильности системы использовали гемоглобин. Использовали настройки по умолчанию для пакетного анализа данных. Период фокусировки № 1 проводили в течение 1 мин при 1500 В как для стандартов пригодности системы, так и для образцов. Период фокусировки № 2 проводили в течение 5 мин при 3000 В для стандартов пригодности системы и 11 минут при 3000 В для образцов TIGC и подходящих буферных контролей. В дублирующих образцах TIGC использовали период фокусировки № 2 продолжительностью 4,5 мин, и все образцы сопровождалась стандартом пригодности системы до и после прогона. Образцы автоматически интегрировали с использованием параметра ширины пика 0,1 и порога 5 и интегрировали в диапазоне pI 7,5-9,4.

[1029] 2.6 Получение DAR2 и DAR6 ADC MORAb-109

[00258] Линию клеток 345A12-HC15-LC4 CHOZN культивировали в одноразовом биореакторе фирмы WAVE Biotech (20 л) до жизнеспособности <30% и концентрировали до 2 л с использованием TFF. Антитело захватывали на смоле Amosphere A3, предварительно уравновешенной в 20 mM фосфате натрия, 10 mM EDTA, pH 7,2, промывали в том же буфере до достижения стабильного базового уровня (для удаления несвязанного материала), затем восстанавливали на колонке в течение 8 часов с использованием 20 mM фосфата натрия, 10 mM EDTA, 10 mM цистеина, pH 7,2 при низкой скорости потока, затем повторно окисляли на колонке в течение 60 часов с использованием 20 mM Трис, pH 7,5. Связанный материал элюировали 0,1 М глицином, pH 3,0, затем подвергали диафильтрации в 1-кратном PBS, 2 mM EDTA, pH 7,4 и концентрировали до > 10 мг/мл. Окончательное восстановление составило 100%.

[00259] Для DAR2 MORAb-109 добавляли малеимид-VCP-эрибулин (в DMSO) в молярном соотношении 1:2,5 (mAb:полезная нагрузка) на 1 час при комнатной температуре. После конъюгации материал разбавляли до 2 мг/мл, подвергали диафильтрации в 1-кратном PBS, 2 mM EDTA для удаления неконъюгированного линкера-полезной нагрузки и концентрировали до 5 мг/мл. Материал DAR2 очищали препаративной хроматографией на колонке Ether-5PW HIC. Конечный материал характеризовали с помощью SEC-HPLC, RP-HPLC и HIC-HPLC.

[00260] Для DAR6 MORAb-109 очищенное/децистеинилированное антитело разводили до 7,5 мг/мл в 1-кратном PBS, 2 mM EDTA и дополнительно разбавляли, добавляя равный объем 250 мкМ ТСЕР в том же буфере на 50 минут, затем добавляли равный общий объем 50% пропиленгликоля в 1-кратном DPBS/1 mM EDTA, затем, наконец, малеимид-

VCP-эрибулин в молярном соотношении 1:8 (mAb:полезная нагрузка), инкубировали при комнатной температуре в течение 1 часа. ADC очищали с помощью хроматографии G-25 для удаления неконъюгированной полезной нагрузки и составляли в 1-кратном PBS, 2 mM EDTA. Конечный материал характеризовали с помощью SEC-HPLC, RP-HPLC и HIC-HPLC.

2.7 Стабильность *in vitro* в сыворотке крови

[00261] ADC к мезотелину (малеимид-VCP-эрибулин в качестве полезной нагрузки) готовили в концентрации 0,5 мг/мл либо в PBS, либо в сыворотке крови человека. Образцы инкубировали при 37°C в течение 0, 24, 48, 72, 96 или 240 часов, затем переносили на хранение при -80°C. Все образцы оттаивали до температуры окружающей среды и использовали однократное разведение 1:2000 для испытания. Образцы испытывали на общее количество mAb, общее количество ADC и клеточную активность. Анализ общего количества mAb был разработан в виде пошагового сэндвич-формата на Gyrolab XP с захватом биотинилированного мезотелина и обнаружением с помощью Fc-Alexa Fluor 647 к IgG1. Количественные диапазоны для анализа общего количества mAb и интактного ADC составляли 6,25-800 нг/мл и 6,25-800 нг/мл соответственно. Стандартную кривую и QC получали с помощью MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулин).

2.8 DAR-чувствительная стабильность в матриксе *in vitro* ADC MORAb-109

[00262] MORAb-109 (345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулин) DAR 2 готовили в концентрации 0,1 мг/мл либо в PBS, либо в сыворотке крови человека, обезьяны, крысы или мыши в трех повторностях. Образцы инкубировали при 37°C в течение 0, 24, 48, 72, 96 или 240 часов. Образцы, взятые из каждой временной точки, переносили на хранение при температуре -80°C. Анализ проводили с использованием интерферометрического анализа биослоев без меток. Образцы матрикса разбавляли до 1:20 в 1-кратном PBS, содержащем 0,05% Tween-20 и 1% BSA (буфер для анализа). Контрольные образцы MORAb-109 DAR 0, DAR 1, DAR 2 и DAR 6 разводили до 0,1 мг/мл в соответствующем матриксе. Отрицательные контрольные образцы содержали только 5% матрикса. Биотинилированный мезотелин в концентрации 5 мкг/мл в буфере для анализа захватывали наконечниками биосенсора на основе SA-стрептавидина (300 с; Pall-ForteBio) с последующим захватом разбавленных образцов стабильности и контролей (300 с). Затем количественно определяли полезную нагрузку путем связывания кроличье-человеческого химерного антитела к эрибулину 5E4 в концентрации 100 мг/мл. Ассоциацию отслеживали в течение 300 с, после чего связывание достигало равновесия. Уровень связывания в конце фазы диссоциации (R_{eq}) определяли для каждого образца через 295 с ассоциации. Стабильность определяли путем построения графика процента R_{eq} относительно t_0 , где:

процент $R_{eq} = R_{eq}t_x / R_{eq}t_0 [100]$ и $t_x = 0-240$ часов.

2.9 Анализ цитотоксичности *in vitro*

[00263] Клетки A431, A3, OVCAR3, HEC-251 и H226 субкультивировали и высевали по 5000 клеток/лунку в полную среду для роста в 96-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Реагенты для

испытания последовательно разбавляли 1:3 в планшетах для разведения с глубокими лунками объемом 2 мл, начиная с 200 нМ (всего 10 разведений). Разбавленные образцы (100 мкл) добавляли в планшеты с клетками (начальная концентрация испытуемых образцов 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение еще 5 дней. Затем среду удаляли и планшеты однократно промывали с помощью 200 мкл DPBS, окрашивали с помощью 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе и растворяли кристаллический фиолетовый в 200 мкл 1% раствора SDS. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали с помощью GraphPad Prism 6.

2.10 Результаты

[1030] 2.10.1 Первоначальный скрининг гуманизированных ADC к мезотелину с эрибулином

[00264] Пятнадцать антител к мезотелину субклонировали, экспрессировали в увеличенном масштабе и очищали, а затем конъюгировали с использованием малеимида-VCP-эрибулина в качестве полезной нагрузки в положении Cys80. Все ADC очищали и характеризовали с использованием SEC-HPLC для анализа агрегации, HIC-HPLC для анализа DAR и клеточного анализа с использованием клеточных линий A431-A3 (MSLN^{hi}), A431 (MSLN^{lo}) и OVCAR3 (MSLN^{hi}). Клетки обрабатывали с помощью ADC в течение 6 часов, затем отмывали или обрабатывали в течение 48 часов (клетки A431-A3 и A431) или 72 часов (клетки OVCAR3) для сравнения активности. Данные характеристики приведены в таблице 17. На основании данных характеристики, приведенных ниже, шесть антител (выделены жирным шрифтом) выбрали для гуманизации.

Таблица 17. Характеристика пятнадцати ADC к мезотелину с эрибулином

№	Наименование образца	Конц. (мг/мл)	Серия	DAR	SEC-HPLC	SEC-HPLC-15% IPA	Клеточный анализ цитотоксичности, EC50 (нМ)					
					% мономер mAb	% мономер ADC	A3-6 ч	A3-48 ч	A431-6 ч	A431-48 ч	OVCAR3-6 ч	OVCAR3-72 ч
1	33O11-VCP-эрибулин	0,46	02750-83G	2,00	95,4	97,58	0,90	0,50	>100	>100	2,74	4,59
2	111B10-VCP-эрибулин	0,98	02750-83H	2,00	89,9	93,69	0,30	0,14	>100	>100	3,11	3,15

3	324O5- VCP- эрибулин	0,97	02750- 83I	2,00	83,5	85,92	1,15	0,72	>100	>100	3,33	2,40
4	178F16- VCP- эрибулин	0,99	02750- 83J	2,00	81,4	84,54	0,65	0,38	>100	>100	1,36	0,08
5	237N18- VCP- эрибулин	0,83	02750- 83K	2,00	92,8	95,84	0,51	0,24	>100	>100	14,65	4,41
6	383I18- VCP- эрибулин	0,71	02750- 84I	1,83	93,5	95,80	1,06	0,83	>100	>100	16,25	2,16
7	393L14- VCP- эрибулин				93,0	93,88	1,70	1,18	>100	>100	13,37	4,04
8	62B10-VCP- эрибулин	0,48	02750- 84J	2,00	98,7	46,84	0,64	0,33	>100	>100	11,70	1,84
9	55B4-VCP- эрибулин	0,42	02750- 84K	2,00	98,4	73,44	0,55	0,27	>100	>100	32,17	1,33
10	120N18- VCP- эрибулин	0,3	02750- 83G	2,00	97,4	61,42	1,67	0,98	>100	>100	2,16	0,20
11	201C15- VCP- эрибулин	0,61	02750- 83H	2,00	94,3	95,84	0,71	0,54	>100	>100	2,83	0,05
12	346C6- VCP- эрибулин	0,9	02750- 83I	2,00	91,4	92,28	0,95	0,29	>100	>100	8,20	0,49
13	264E24- VCP- эрибулин	0,66	02750- 83J	1,63	46,2?	73,67	1,04	0,74	>100	>100	1,71	0,14
14	345A12- VCP- эрибулин	0,4	02750- 83K	2,00	95,7	98,53	0,95	0,80	>100	>100	0,66	0,09

15	102A6A-VCP-эрибулин	0,19	02750-83D	2,00	98,1	67,87	0,38	0,21	>100	>100	1,92	0,12
16	102A6B-VCP-эрибулин	0,31	02750-83L	2,00	97,9	19,02	0,84	0,53	>100	>100	1,85	0,14
17	1552-VCP-эрибулин	0,63	02750-83F	1,89	97,1	97,20	>100	58,78	>100	>100	>100	10,60
18	Эрибулин	6mM					4,08	1,09	2,86	0,00	2,81	0,25

[1031] 2.10.2 Гуманизация HC1-LC1 и цитотоксичность ADC in vitro

[00265] Последовательности Fv-областей кролика 102A6A2, 11B10, 201C15, 345A12 и 346C6 подвергали анализу BLAST на предмет наибольшей гомологии с последовательностями белка варибельного домена зародышевой линии человека с использованием инструментов IGBLAST (National Center for Biotechnology Information (NCBI)) и IMGT/DomainGapAlign (International ImMunoGeneTics Information System (IMGT®)). Каркасные последовательности кролика заменяли наиболее близкими гомологичными последовательностями зародышевой линии человека для получения гуманизированных вариантов с привитыми CDR (HC1 и LC1). Последние два остатка FWRH2, определенного по Kabat, сохраняли как кроличьи остатки. Последний остаток FWRH3, определенного по Kabat, сохранили для 11B10. Мотив RESPECT-L Cys80 и Ala83 в области V_κ сохранили для всех клонов. После создания гуманизированных антител как химерные, так и гуманизированные антитела конъюгировали с тремя различными полезными нагрузками (малеимид-VCP-эрибулин, малеимид-VCP-криптофицин и малеимид-VCP-димер эрибулина), варьируя гидрофобность. Аффинность связывания с мезотелином измеряли с помощью BIAcore для всех антител, а ADC характеризовали по проценту (%) агрегации, DAR и активности in vitro, как показано в таблице 18. Активность полезных нагрузок гуманизированных ADC к мезотелину также измерили и обобщили в таблице 19. ADC характеризовались низкими наномолярными значениями EC50 для уничтожения клеток во всех пяти испытанных клеточных линиях.

Таблица 18. Краткое описание характеристик ведущих химерных и гуманизированных ADC к мезотелину

		Исходное mAb				ADC								
		Эпитопная группа	Аффинность			Полезная нагрузка	НПС-этил	SEC-HPLC		Клеточный анализ цитотоксичности, EC50 (нМ)				
			k_a ($10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$)	k_d (10^{-3} c^{-1})	K_D (10^{-9} M)			Лекарственное средство-линкер	DAR	% агрегата	% мономера	A431	OVCA R3	HEC-251
33011	xi	1				VCP-эрибулин	1,92	8,97	91,03	40,67	0,008	3,950	>100	0,14
						VCP-криптофицин	1,87	12,74	87,26	6,79	0,010	0,110	0,06	0,03
						VCP-димер эрибулина	1,17	32,70	67,30	1,40	0,030	0,33	0,93	0,05
	zu		2,2	0,65	3,4	VCP-эрибулин	1,69	1,42	98,58	~100	0,064	26,500	>100	0,28
						VCP-криптофицин	1,33	0,90	99,10	22,50	0,066	5,35	5,81	0,04
						VCP-димер эрибулина	1,63	1,08	98,92	2,01	0,025	0,31	0,22	0,04
111B10	xi	2	6,5	3,9	6,3	VCP-эрибулин	1,90	4,25	95,75	38,10	0,004	13,960	~100	0,05
						VCP-криптофицин	1,86	8,83	91,17	10,93	0,011	1,600	2,66	0,016
						VCP-димер эрибулина	1,85	9,25	90,75	0,96	0,007	0,06	0,71	0,011
	zu		5,1	3	6,5	VCP-эрибулин	1,81	3,64	96,36	68,92	0,014	27,42	>100	0,12
						VCP-криптофицин	1,76	1,80	98,20	4,30	0,011	0,820	1,36	0,015
						VCP-димер эрибулина	1,78	4,47	95,53	1,68	0,007	0,13	1,15	0,025

201C1 5	xi	1	2,4	0,26	1,1	VCP-эрибулин	1,85	1,62	98,38	48,50	0,004	14,82	~100	0,27
						VCP-криптофицин	1,75	2,10	97,90	8,08	0,012	0,540	1,02	0,12
						VCP-димер эрибулина	0,96	0,00	100,00	0,63	<0,003	0,10	0,64	0,065
	zu		3,1	1,1	4,2	VCP-эрибулин	1,80	5,84	94,16	68,88	0,290	20,42	>100	0,41
						VCP-криптофицин	1,74	11,51	88,49	2,55	0,120	0,600	1,73	0,037
						VCP-димер эрибулина	1,75	9,94	90,06	1,12	0,063	0,28	1,26	0,082
346C6	xi	3	3,8	0,49	1,4	VCP-эрибулин	1,56	5,28	94,72	34,49	0,087	5,73	~100	0,11
						VCP-криптофицин	1,52	8,28	91,72	4,18	0,042	0,190	1,21	0,043
						VCP-димер эрибулина	1,60	10,43	89,57	1,32	0,026	0,09	0,99	0,035
	zu		133	93	8,9	VCP-эрибулин	1,63	4,48	95,52	72,86	1,180	32,54	≥100	0,55
						VCP-криптофицин	1,65	13,70	86,30	2,30	0,380	0,800	2,21	0,13
						VCP-димер эрибулина	1,68	4,86	95,14	1,36	0,140	0,34	1,86	0,13
345A1 2	xi	5	26	0,42	0,12	VCP-эрибулин	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данны х	Нет данных	Нет данны ых	Нет данных	Нет данных
						VCP-криптофицин	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данны х	Нет данных	Нет данны ых	Нет данных	Нет данных
						VCP-димер эрибулина	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данны х	Нет данных	Нет данны ых	Нет данных	Нет данных
	zu		35	2,1	0,2	VCP-эрибулин	1,72	4,24	95,76	63,49	0,004	20,70	≥100	0,091

						VCP-криптофицин	1,60	6,17	93,83	3,03	<0,003	0,350	0,69	0,01
						VCP-димер эрибулина	1,59	5,05	94,95	1,04	<0,003	0,06	0,79	0,016
102A6 A2	xi	7	n.b.	n.b	n.b	VCP-эрибулин	Нет данных	89,50	10,50	36,18	0,024	2	>100	0,12
						VCP-криптофицин	Нет данных	100,00	0,00	9,52	0,110	0,280	0,21	0,11
						VCP-димер эрибулина	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данны х	Нет данных	Нет данн ых	Нет данных	Нет данных
	zu		n.b.	n.b	n.b	VCP-эрибулин	1,87	3,60	96,40	57,44	0,046	8,67	>100	3,02
						VCP-криптофицин	1,87	3,64	96,36	3,54	0,021	0,054	0,08	0,0092
						VCP-димер эрибулина	1,68	1,74	98,26	1,40	0,047	0,05	0,50	0,018
155D5	xi					VCP-димер эрибулина	1,62	14,42	81,63	1,20	0,210	0,47	1,50	1,41
						Эрибулин	Нет данных	Нет данных	Нет данных	0,47	0,11	0,2	5,3	1,03
						Криптофицин	Нет данных	Нет данных	Нет данных	0,8	0,24	0,43	1,94	1,01
						VCP-димер эрибулина DiOH	Нет данных	Нет данных	Нет данных	0,03	<0,003	0,003	0,32	0,08

Таблица 19. Клеточная активность полезных нагрузок *in vitro*

	Клеточный анализ цитотоксичности, EC50 (нМ)				
	A431	OVCAR3	HEC-251	H226	A3
Эрибулин	0,47	0,11	0,2	5,3	1,03
Криптофицин	0,8	0,24	0,43	1,94	1,01
VCP-димер эрибулина DiOH	0,03	<0,003	0,003	0,32	0,08

[1032] 2.10.3 Оптимизация гуманизации

[00266] Из-за потери связывания мезотелина для клонов 201C15, 345A12 и 346C6 потребовались последующие мутации для сохранения связывания с мезотелином. Последовательности Fv кролика и с привитыми CDR использовали для создания *in silico* моделей переменных доменов. Теоретическую структуру кроличьей и гуманизированной моделей сопоставили наложением, и остатки в непосредственной близости от CDR проанализировали на предмет потенциального структурного влияния на общую структуру петель CDR. Идентифицировали остатки, различающиеся между кроличьей и гуманизированной последовательностями. Большинство различающихся остатков не располагались на поверхности димера или были удалены от CDR. Было обнаружено, что несколько остатков в областях VH и Vκ находятся в непосредственной близости (в пределах 5 Å) от CDR, и их дополнительно проанализировали.

[00267] Две гуманизированные области в области VH идентифицировали как потенциально препятствующие связыванию антигена в клонах 201C15, 345A12 и 346C6. N-конец для всех клонов был на одну аминокислоту длиннее в HC1, чем в последовательности кролика. Кроме того, каждый имел делецию из 2 аминокислот в FWRH3 (остатки 72-73). Для каждого из этих клонов первые пять аминокислот и шесть аминокислот, окружающих делецию FWRH3 (остатки 71-76) в HC1, возвратили к последовательностям кролика. Остаток 93 в 345A12 также возвратили к кроличьему в HC5. Что касается LC1, N-концы 201C15, 345A12 и 346C6 возвратили к последовательности кролика. Один остаток в FWRL3 из 201C5 (остаток 67) и 345A12 (остаток 70) идентифицировали как потенциально взаимодействующий с CDR, и аналогичным образом идентифицировали один остаток в FWRL2 из 346C6 (остаток 36).

[1033] 2.10.4 Супергуманизированный 345A12

[00268] С идентификацией дополнительных кроличьих остатков в Vκ как критически важных для связывания антигена были созданы дополнительные мутанты 345A12 для введения большего количества человеческих остатков во все области VH и Vκ. При анализе модели *in silico* идентифицировали остатки 35, 48, 49, 57, 58, 61, 62, 63 и 64 в VH и остатки 1, 3, 24, 55 и 70 в Vκ.

[1034] 2.10.5 Биофизическая характеристика "супергуманизированных" антител 345A12

[00269] Супергуманизированные антитела 345A12 очищали из 350 мл клеточной

культуры в увеличенном масштабе и готовили в 1-кратном DPBS. Антитела концентрировали для оценки физико-химических свойств. Как показано в таблице 20, комбинация HC10-LC7 и HC15-LC7 осаждается на стадии концентрирования, возможно, из-за относительно низкого pI или плохой растворимости. Очищенные антитела анализировали с помощью BIAcore на аффинность связывания мезотелина, и данные обобщены в таблице 21 ниже.

Таблица 20. Краткое описание очищенных гуманизированных антител 345A12

mAb	Супернатант Объем (мл)	Выход очистки	mAb-VCP- димер эрибулина DiOH, выход	mAb-VCP- эрибулин, выход	Концентрирова ние до 5 мг/мл
345A12 -HC10- LC4	350 мл	77,5 мг при 5,1 мг/мл	3,9 мг при 1,3 мг/мл, 78%	11 мг при 5,0 мг/мл, 73%	Да
345A12 -HC10- LC7	350 мл	78 мг при 5,2 мг/мл	4,5 мг при 1,6 мг/мл, 90%	8,1 мг при 2,7 мг/мл, 54%	нет, осаждение
345A12 -HC15- LC4	350 мл	191 мг при 8,3 мг/мл	4,2 мг при 1,4 мг/мл, 84%	11 мг при 4,85 мг/мл, 73%	Да
345A12 -HC15- LC7	350 мл	87,2 мг при 4,0 мг/мл	3,3 мг при 1,1 мг/мл, 66%	4,6 мг при 1,54 мг/мл, 31%	нет, осаждение

Таблица 21. Аффинность связывания с мезотелином для гуманизированного 345A12

	Агрегация	Конъюгация	Аффинность											
			Прогон 1			Прогон 2			Прогон 3			Прогон 4		
	% мономера	% конъюгации	k _a	k _d	K _D	k _a	k _d	K _D	k _a	k _d	K _D	k _a	k _d	K _D
Химерное			2,63E- +06	4,64E- 04	1,76E- 10									
HC1-LC2	88,85	1,6	2,59E- +06	4,32E- 04	1,67E- 10	2,47E+0 6	3,04E- 04	1,13E- 10						
HC1-LC4	82,96	1,33				2,35E+0 6	2,57E- 04	1,18E- 10	1,96E+0 6	1,30E- 04	6,61E- 11	1,35E+0 6	1,61E- 04	1,19E- 10
HC1-LC7	87,23	1,29							1,83E+0 6	1,40E- 04	7,66E- 11	1,38E+0 6	1,79E- 04	1,29E- 10
HC10-LC4	80,73	1,32							1,80E+0 6	1,52E- 04	8,47E- 11	1,21E+0 6	1,80E- 04	1,49E- 10
HC10-LC7	82,75	1,21										1,26E+0 6	1,89E- 04	1,50E- 10
HC15-LC4	86,56	1,3										1,44E+0 6	1,12E- 04	7,79E- 11
HC15-LC7	92,7	1,42										1,49E+0 6	1,16E- 04	7,82E- 11

[1035] 2.10.6 Анализы DSC и cIEF

[00270] Кривые термического плавления F(ab')₂-фрагментов анализировали способом DSC. Профили HC15-LC4 F(ab')₂ и HC10-LC4 F(ab')₂ показаны на фиг. 8.

[00271] Значение pI mAb 345A12-HC10-LC4 и 345A12-HC15-LC4 анализировали с помощью cIEF. Значение pI варьировалось в пределах 0,06 единиц pH между каждым mAb, 8,19 для 345A12-HC10-LC4 и 8,25 для 345A12-HC15-LC4 (таблица 22).

Таблица 22. Анализ cIEF

Наименование образца	pI	% кислотных пиков	% нейтральных пиков	% основных пиков
345A12-HC10-LC4	8,19	24,412	57,171	18,417
345A12-HC15-LC4	8,25	34,787	50,790	14,424

[1036] 2.10.7 Стабильность в сыворотке крови

[00272] Оценку стабильности ADC 345A12-HC10-LC4 и 345A12-HC15-LC4 в PBS/сыворотке крови человека проводили в течение 10 дней, как описано в разделе 2.7. Данные обобщены в таблице 23 ниже.

Таблица 23. Стабильность in vitro в PBS/сыворотке крови человека для ADC zu345A12-VCP-эрибулин, HC15-LC4 против HC10-LC4

Образец №	Описание образца	Разведение	Общее количество Ab				Интактный ADC			
			Средняя концентрация (нг/мл)	%CV	Скорректированный результат (мкг/мл)	%отличия от T=0	Средняя концентрация (нг/мл)	%CV	Скорректированный результат (мкг/мл)	%отличия от T=0
1	Zu345A12-HC10LC4-VCP-эрибулин T=0, в сыворотке крови человека	1:2,000	231	2,14	462	Нет данных	258	1,42	516	Нет данных
2	Zu345A12-HC10LC4-VCP-эрибулин T=24, в сыворотке крови человека	1:2,000	221	4,59	442	-4,3	190	1,70	380	-26,4
3	Zu345A12-HC10LC4-VCP-эрибулин T=48, в сыворотке крови человека	1:2,000	208	0,840	416	-10,0	154	3,19	308	-40,3
4	Zu345A12-HC10LC4-VCP-эрибулин T=72, в сыворотке крови человека	1:2,000	213	1,46	426	-7,8	142	1,66	284	-45,0

5	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=96, в сыворотке крови человека	1:2,000	210	2,55	420	-9,1	105	21,5	210	-59,3
6	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=240, в сыворотке крови человека	1:2,000	207	4,27	414	-10,4	97,0	6,31	194	-62,4
7	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=0, в сыворотке крови человека	1:2,000	284	0,38 7	568	Нет данны х	278	4,84	556	Нет данных
8	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=24, в сыворотке крови человека	1:2,000	282	4,19	564	-0,7	229	2,71	458	-17,6
9	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=48, в сыворотке крови человека	1:2,000	273	0,10 3	546	-3,9	180	1,87	360	-35,3
10	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=72, в сыворотке	1:2,000	258	0,74 4	516	-9,2	144	0,436	288	-48,2

	крови человека									
11	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=96, в сыворотке крови человека	1:2,000	270	0,66 9	540	-4,9	135	3,13	270	-51,4
12	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=240, в сыворотке крови человека	1:2,000	270	1,48	540	-4,9	111	0,669	222	-60,1
13	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=0, в PBS	1:2,000	180	1,03	360	Нет данны х	229	1,40	458	Нет данных
14	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=24, в PBS	1:2,000	184	0,58 3	368	2,2	187	2,07	374	-18,3
15	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=48, в PBS	1:2,000	166	3,12	332	-7,8	177	1,64	354	-22,7
16	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=72, в PBS	1:2,000	180	0,82 9	360	0,0	177	2,00	354	-22,7

17	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=96, в PBS	1:2,000	179	1,73	358	-0,6	174	3,87	348	-24,0
18	Zu345A12-HC10LC4- VCP-эрибулин T=240, в PBS	1:2,000	171	0,91 5	342	-5,0	131	6,24	262	-42,8
19	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=0, в PBS	1:2,000	225	1,14	450	Нет данны х	233	0,325	466	Нет данных
20	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=24, в PBS	1:2,000	226	1,45	452	0,4	209	3,53	418	-10,3
21	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=48, в PBS	1:2,000	233	0,75 4	466	3,6	210	0,942	420	-9,9
22	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=72, в PBS	1:2,000	210	4,03	420	-6,7	186	2,11	372	-20,2
23	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин T=96, в PBS	1:2,000	247	10,4	494	9,8	182	0,058 5	364	-21,9
24	Zu345A12-HC15LC4- VCP-эрибулин	1:2,000	226	0,51 4	452	0,4	145	6,91	290	-37,8

	T=240, В PBS								
--	--------------	--	--	--	--	--	--	--	--

[1037] 2.10.8 Определение стабильности в матриксе 345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулина с использованием DAR-чувствительного анализа Octet в различных матриксах

[00273] 345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулин (DAR2) анализировали в отношении стабильности *in vitro* в плазме и сыворотке крови мыши, крысы, яванского макака, а также человека. ADC инкубировали в матриксе при концентрации 0,1 мг/мл в течение 1 недели, а временные точки извлекали через 1, 2, 3, 4 и 10 дней. Анализ выполняли с использованием DAR-чувствительного анализа Octet на основе инферометрии биослоя, как описано в разделе 2.3.1. Результаты представлены на фиг. 9. 345A12-HC15-LC4-VCP-эрибулин (DAR2) продемонстрировал зависящее от времени высвобождение полезной нагрузки со средним высвобождением 20% после 10-дневной инкубации при 37°C.

[1038] 2.10.9 Культуры, продуцирующие кроличьи IgG и поликлональные антитела к мезотелину человека

[00274] На 2-й неделе лунки, продуцирующие кроличьи антитела IgG, идентифицировали с помощью FRET IgG с использованием криптата европия. Лунки, продуцирующие IgG, проверяли на присутствие кроличьего антитела Fcγ IgG с помощью ELISA против планшетов, покрытых 1 мкг/мл мезотелина CHO-MT40. Культуры, продуцирующие специфичные к мезотелину кроличьи IgG, подтверждали скринингом на основе ELISA против 1 мкг/мл мезотелина и встречным скринингом против 1 мкг/мл CD73-his. FRET и ELISA проводили на роботизированной системе Biomek® FX (Beckman).

[0005] ПРИМЕР 3. Исследования *in vivo*

[00275] ADC, содержащие ведущие гуманизированные антитела к мезотелину и конъюгаты эрибулина, оценивали на мышах с использованием моделей ксенотрансплантатов рака легкого и рака желудка человека и модели ксенотрансплантата, полученного от пациента с мезотелиомой человека (PDX), в соответствии с протоколом, описанным ниже. Оценивали противораковую активность и нецелевую токсичность различных видов DAR ADC.

2

3.1 Реагенты и материалы

[1039] 3.1.1 Антитела

[00276] Антитела, использованные в следующих исследованиях, содержат неспаренный цистеин в положении 80 легкой цепи (LCcys80) и включают как кроличье-человеческие химерные (-xi), так и гуманизированные (-zu) формы антител к мезотелину человека xi345A12-HC1-LC2, xi102A6A2-HC1-LC2, zu345A12-HC1-LC2, zu345A12-HC10-LC4 и zu345A12-HC15-LC4.

[1040] 3.1.2 Конъюгируемые цитотоксины и ADC LCcys80

[00277] Соединения линкер-цитотоксин, использованные в следующих исследованиях, включают малеимид-VCP-эрибулин и малеимид-VCP-димер эрибулина diOH.

[1041] 3.1.3 Линии опухолевых клеток

[00278] В следующих исследованиях использовали клеточную линию NSCLC

человека NCI-H2110, клеточную линию рака желудка человека NCI-N87 и клеточную линию мезотелиомы человека HAY. Все используемые клеточные линии получены непосредственно из Американской коллекции типовых культур (ATCC), за исключением клеток HAY, которые получены из NCI.

[1042] 3.1.4 Другие реагенты

[00279] Все использованные реагенты были получены от коммерческих поставщиков исследовательской чистоты или выше, если не указано иное.

3.2 Скрининг *in vivo* и исследования эффективности на моделях ксенотрансплантатов рака человека

[1043] 3.2.1 Исследования на животных

[00280] Самок мышей CD-1 IGS (Charles River, возраст 7-9 недель) использовали для исследования максимально переносимой дозы (MTD), самок мышей NOD.CB17-SCID (Jackson Laboratory) использовали для исследований ксенотрансплантатов NCI-H2110 и HAY, и самок голых мышей NCr (Taconic, возраст 5 недель) использовали для исследований ксенотрансплантата NCI-N87. По прибытии животных акклиматизировали в течение 5-7 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[1044] 3.2.2 Культура клеток

[00281] Криоконсервированные клетки NCI-H2110, NCI-N87 или HAY из низкотемпературного хранения культивировали в среде, содержащей необходимые добавки. Клетки субкультивировали в полной среде в течение 2 пассажей перед использованием для инокуляции *in vivo*.

[1045] 3.2.3 Имплантация опухоли, процесс регистрации и обработка

[00282] Клетки суспендировали в PBS, смешанном с ледяным Matrigel в соотношении 1:1 (об.:об.) до конечной концентрации $1,0 \times 10^8$ клеток/мл или $5,0 \times 10^7$ клеток/мл для клеток NCI-H2110 и HAY. Мышам подкожно вводили 100 мкл/мышь клеточной смеси и следили за массой тела и ростом опухоли. Измерения проводили цифровым штангенциркулем 3 раза в неделю, начиная с 3-го дня после имплантации.

[1046] 3.2.4 Измерение и обработка опухоли

[00283] Объем опухоли рассчитывали по формуле: $W \text{ (мм)} \times L \text{ (мм)} \times D \text{ (мм)} \times \pi/6$. Мышей случайным образом делили по пять мышей в группе, как только опухолевые имплантаты достигали среднего объема 100 мм³. Обработку проводили внутривенно в объеме 200 мкл. Конечную массу тела измеряли и регистрировали в конце каждого исследования.

[1047] 3.2.5 Статистический анализ

[00284] Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Сравнение роста опухоли в каждой экспериментальной группе также проводили с использованием того же статистического

анализа.

3.3 Исследования эффективности *in vivo* на модели PDX мезотелиомы человека

[1048] 3.3.1 Исследования на животных

[00285] Самок мышей NMRI nu/nu (Janvier Labs, 5-6 недель) акклиматизировали в течение по меньшей мере 4 дней по прибытии до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[1049] 3.3.2 Ксенотрансплантация

[00286] В день 0 исследования опухоли Meso 7212 удаляли у пяти мышей-доноров в стерильных условиях. Опухолевую ткань донора разрезали на фрагменты размером 2 x 2 мм и помещали в стерильную чашку Петри, покрытую 0,9% физиологическим раствором. Параллельно животным-реципиентам подкожно вводили анальгетик Metacam® (2 мг/кг), а затем анестезировали однократной внутривенной инъекцией (0,15 мл/мышь) Etomidat-Lipuro® (12 мг/кг). Выполняли поверхностный вертикальный разрез кожи 5-8 мм на левом боку. Кончик хирургических ножниц вводили в разрез непосредственно над боком и использовали для формирования кармана в подкожном пространстве. Один фрагмент опухоли на мышь имплантировали в карман с помощью хирургического пинцета. Разрез закрывали металлической скобой и животных помещали обратно в чистую клетку.

[1050] 3.3.3 Экспериментальная процедура

[00287] Во время роста опухоли диаметр опухоли измеряли с помощью цифрового штангенциркуля (Mitutoyo). Животных случайным образом распределяли в экспериментальные группы в зависимости от объема опухоли (критерий включения по объему опухоли 0,1-0,3 см³). Два раза в неделю регистрировали объемы опухолей и массу тела.

[1051] 3.3.4 Обработка

[00288] Эрибулин вводили внутривенно в дозах 0,2, 0,3 и 3,2 мг/кг в день рандомизации. MORAb-109 (DAR 0, 2 и 6) вводили внутривенно в дозе 10,0 мг/кг в день рандомизации или в дозе 2,5 мг/кг в течение четырех дней подряд. Объем введения составлял 10 мл/кг для внутривенных инъекций во всех экспериментальных группах.

[1052] 3.3.5 Статистические анализы

[00289] Описательную статистику выполняли по данным об объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом также проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой группе.

3.4 Результаты - скрининг *in vivo* и исследования эффективности

[1053] 3.4.1 Исследование M109-004-2016: скрининг *in vivo* ADC на основе димеров эрибулина 345A12-NC1-LC2 и 102A6A2 NC1-LC2 на модели ксенотрансплантата NSCLC человека

[00290] Сравнительный скрининг *in vivo* двух клонов антител к мезотелину (345A12-NC1-LC2 и 102A6A2-NC1-LC2) проводили на модели ксенотрансплантата NCI-H2110 немелкоклеточного рака легкого человека (NSCLC). Мышей обрабатывали ADC на основе 345A12-NC1-LC2-димер эрибулина diOH в дозе 2,5 мг/кг или ADC на основе 102A6A2-NC1-LC2-димер эрибулина diOH в дозе 2,5 мг/кг. Противоопухолевая активность и изменения массы тела для обоих ADC показаны на фиг. 10А и фиг. 10В соответственно.

[1054] 3.4.2 Исследование M109-006-2017: предварительная оценка максимальной переносимой дозы (MTD) ADC на основе димеров эрибулина 345A12-NC1-LC2 и 345A12-NC15-LC4 у мышей CD-1

[00291] Изменения массы тела самок мышей CD-1 измеряли после введения 5, 10, 15 или 20 мг/кг ADC на основе 345A12-NC1-LC2-димер эрибулина diOH или 5, 10 или 20 мг/кг ADC на основе 345A12-NC15-LC4-димер эрибулина diOH. Изменения массы тела для каждого ADC показаны на фиг. 11А и фиг. 11В соответственно.

[1055] 3.4.3 Исследование M109-007-2017: скрининг *in vivo* ADC на основе димеров эрибулина 345A12-NC10-LC4 и 345A12-NC15-LC4 на модели ксенотрансплантата NSCLC человека

[00292] Сравнительный скрининг *in vivo* двух дополнительных клонов антител к мезотелину (345A12-NC10-LC4 и 345A12-NC15-LC4) проводили на модели ксенотрансплантата NSCLC человека NCI-H2110. Мышей обрабатывали ADC на основе 345A12-NC10-LC4-димер эрибулина diOH в дозе 2,5 мг/кг или ADC на основе 345A12-NC15-LC4-димер эрибулина diOH в дозе 2,5 мг/кг. Противоопухолевая активность и изменения массы тела для обоих ADC показаны на фиг. 12А и фиг. 12В соответственно.

[00293] Клон 345A12-NC15-LC4 выбран на основании его противоопухолевой активности и профиля токсичности в качестве клона-кандидата для антитела, используемого в ADC MORAb-109.

[1056] 3.4.4 Исследование M109-010-2018: противоопухолевый эффект видов DAR2 и DAR6 ADC на основе 345A12-NC15-LC4-VCP-эрибулина (MORAb-109) на модели ксенотрансплантата рака желудка человека

[00294] Два вида DAR (DAR2 и DAR6) ADC на основе 345A12-NC15-LC4-VCP-эрибулина (MORAb-109) сравнивали на модели ксенотрансплантата рака желудка человека NCI-N87 в дозе 10 мг/кг. Оба вида ADC DAR2 и DAR6 продемонстрировали стойкий и сходный противоопухолевый ответ (фиг. 13А), при этом после введения любого вида DAR практически не наблюдалось потери веса (фиг. 13В).

[1057] 3.4.5 Исследование M109-010-2018: противоопухолевый эффект видов DAR2 и DAR6 ADC на основе 345A12-NC15-LC4-VCP-эрибулина (MORAb-109) на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека

[00295] Два вида DAR (DAR2 и DAR6) ADC на основе 345A12-NC15-LC4-VCP-эрибулина (MORAb-109) сравнивали на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека HAY. Оба вида ADC DAR2 и DAR6 продемонстрировали устойчивые и сходные противоопухолевые ответы у мышей, получавших однократную дозу (5 мг/кг) MORAb-109,

в то время как эрибулин сам по себе (вводимый в MTD (3,2 мг/кг) или при эквивалентном молярном количестве эрибулина, находящемся в MORAb-109 (0,1 мг/кг)) показал ограниченный противоопухолевый эффект (фиг. 14A). Острая и временная потеря массы тела наблюдалась у мышей, получавших эрибулин в дозе MTD, в то время как у мышей, получавших любой из ADC, потери массы тела не наблюдалось (фиг. 14B).

[1058] 3.4.6 Противоопухолевый эффект MORAb-109 (DAR6) на модели PDX мезотелиомы человека

[00296] Противоопухолевый эффект ADC на основе 345A12-NC15-LC4-VCP-эрибулина (MORAb-109) (DAR6) исследовали на модели PDX мезотелиомы человека, Meso7212 (MV15369). Испытали две разные схемы лечения: однократное введение 10 мг/кг MORAb-109 или четыре последовательных ежедневных введения 2,5 мг/кг. Обе схемы лечения MORAb-109 продемонстрировали стойкий и сопоставимый противоопухолевый ответ, в то время как эквивалентное молярное количество эрибулина самого по себе (0,2 мг/кг) показало ограниченный противоопухолевый эффект (фиг. 15A). Оба вида лечения с ADC MORAb-109 продемонстрировали значительно повышенную противоопухолевую активность по сравнению с дозой MTD эрибулина самого по себе ($P < 0,05$). Изменения массы тела для всех видов лечения показаны на фиг. 15B.

[1059] 3.4.7 Противоопухолевый эффект MORAb-109 (DAR2 и DAR6) на модели PDX мезотелиомы человека

[00297] Противоопухолевый эффект двух видов DAR (DAR2 и DAR6) ADC на основе 345A12-NC15-LC4-VCP-эрибулина (MORAb-109) исследовали на модели PDX мезотелиомы человека, Meso7212 (MV16071), при однократном введении 10 мг/кг. Оба вида MORAb-109, DAR2 и DAR6, продемонстрировали стойкий и сопоставимый противоопухолевый ответ, в то время как эквивалентное молярное количество эрибулина самого по себе (0,3 мг/кг) и видов MORAb-109, не конъюгированных с эрибулином (DAR0), показали ограниченные противоопухолевые эффекты или полное их отсутствие (фиг. 16A). Ни в одной группе не наблюдалось потери массы тела (фиг. 16B). Не было статистической разницы в противоопухолевом эффекте между видами MORAb-109 DAR2 и DAR6.

[0006] ПРИМЕР 4. Экспрессия мезотелина (MSLN) и активность *in vitro*

4.1 Способы

[00298] Цитотоксичность. Клетки субкультивировали и высевали по 5000 клеток/лунку в полную среду для роста в 96-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Реагенты для испытания последовательно разбавляли 1:3 в планшетах для разведения с глубокими лунками объемом 2 мл, начиная с 200 нМ (всего 10 разведений). Разбавленные образцы (100 мкл) добавляли в планшеты с клетками (начальная концентрация испытуемых образцов 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение еще 5 дней. Затем среду удаляли и планшеты однократно промывали с помощью 200 мкл DPBS, окрашивали с помощью 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе и

растворяли кристаллический фиолетовый в 200 мкл 1% раствора SDS. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали для определения IC₅₀ с помощью GraphPad Prism 6. Корреляционный анализ проводили в GraphPad Prism с использованием непараметрического анализа Спирмена.

4.2 Результаты

[00299] Корреляция между активностью MORAb-109 (DAR6) и экспрессией мезотелина наблюдалась для всех клеточных линий (фиг. 17; таблицы 24 и 25).

[00300] Для MORAb-109 (DAR2), когда из анализа исключали клеточные линии с более низкой экспрессией мезотелина (окрашивание FACS со средней интенсивностью флуоресценции (MFI) <80), наблюдалась значительная корреляция между активностью и экспрессией мезотелина (фиг. 17; таблицы 24 и 25). Активность MORAb-109 (DAR2) коррелировала с экспрессией мезотелина при более высоких уровнях экспрессии мезотелина.

Таблица 24. Корреляционный анализ экспрессии мезотелина и активности (DAR2 и DAR6)

	MSLN (MFI) по сравнению с эрибулином	MSLN (MFI) по сравнению с MORAb109	MSLN (MFI) по сравнению с MORAb109 (DAR6)	MSLN (MFI) по сравнению с MORAb109_MS LN с высоким уровнем
Соотношение Спирмана				
г	-0,1113	-0,2906	-0,6773	-0,6267
95% доверительный интервал	от -0,3935 до 0,1902	от -0,5472 до 0,01591	от -0,8093 до - 0,4803	от -0,8502 до - 0,2118
Р-значение				
Р (двухсторонний)	0,4566	0,0557	< 0,0001	0,0054
Р-значение, резюме	не значащее	не значащее	****	**
Точное или приблизительное Р-значение	Приблизитель ное	Приблизительн ое	Приблизитель ное	Приблизительно е
Значащий?	Нет	Нет	Да	Да

(альфа=0,05)				
				18
Количество пар XY	47	44	48	

Таблица 25. Клеточные линии, используемые для корреляционного анализа экспрессии мезотелина и активности

Клеточные линии	MSLN (MFI)	Активность in vitro, IC50, нМ		
		Эрибули н	MORAb109 (DAR2)	MORAb109 (DAR6)
EGI-1	14,8	1,48	187,8	15,45
TFK1	132,81	1,27		5,65
SNU-245	23,9	78,24	355,8	
SNU-478	53,8	1,58	227,5	55,16
SNU-1196	40,2	1,14	128,4	6,49
T-47D	4,4	0,68	95,86	22,04
JMT-1	36,4	0,39	61,8	11,4
HCC1806	189,3	0,37	35,54	0,24
HEC-1-A	16,5	0,68	140,7	23,7
HEC-1-B	16,9	0,54	66,29	1,6
HEC-251	53,3	0,5	67,15	0,67
MFE-280	45,1	3,24	196,5	164,9
NCI-H292	108,6	0,58	147,3	6,37
NCI-H322	83,9	0,46	62,84	3,62
NCI-H1355	11,5	0,67	79,77	7,09
NCI-H1355- отсортированные	32,7	0,7	96,92	6,48
NCI-H1573	17,4		60,41	6,46
NCI-H1568/MSLN	4474	0,44	1,69	1,08
NCI-H1650	31,5	0,61	92,2	4,09
NCI-H1650/MSLN	1865,5	0,84	1	0,57
NCI-H2110	112,2	0,32	52,23	4,17
NCI-H2126	73,6	0,53	87,89	10,82
PC9	11,24	0,56	85,14	15,22
H226	725,3	0,66	7,46	0,13

NCI-H23	4,42	0,6	66,74	17,31
Lu65	13,13	0,56		15,85
NCI-H460	8,56	35,29		
MOR/CPR	120,79	3,69		5,68
A549	14,2	2,72	276	41,33
CNE2	147,7	0,49	69,55	1,64
HK1	39,2	0,89	197,5	5,88
HNE-1	110,8	0,87	239,2	2,03
HNE-1-T1	79,3	1,03	347	11,28
HONE1	108,6	0,89	197,5	5,88
SUNE1	212,4	0,56	77,8	0,27
CaOV-3	137,6	0,44	20,93	0,51
COV362	113,5	2,78	193	45,29
HAC-2	172,3	26,65	228	320
Kuramochi	211,2	0,89	897,8	0,1
OVCAR3 A1	220	0,15	0,005	0,005
AsPC1	33,47	1,62		3,13
BxPC3	15,59	0,66	86,2	5,88
Capan-2	36	1,21	138	1,99
A431	5,6	0,55	71,51	14,17
A431-K5	1430,3	1,5	0,45	0,35
NCI-N87	125,8	0,11	14,7	0,1
MKN1	22,06	0,96	20,14	2,89
MKN74	7,73	0,78	66,96	9,62
SNU216	94,91	1,78	73,42	0,29
MKN45	57,94	3,65	100	10,39
MKN7	18,48	0,58	86,53	10,39

[0007] ПРИМЕР 5. Доза-ответ MORAb-109 на модели ксенотрансплантата рака желудка человека (NCI-N87)

5.1 Способы

5.1.1 Эффективность in vivo

[00301] Животные. Самок голых мышей NCr (Taconic) в возрасте 5 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение 5-7 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным

маркировали уши и взвешивали.

[00302] Культивирование клеток. Криоконсервированные клетки NCI-N87 размораживали и выращивали в среде, содержащей необходимые добавки. Клетки субкультивировали в полной среде в течение 2 пассажей перед использованием для инокуляции *in vivo*.

[00303] Имплантация опухоли, процесс регистрации и обработка. Суспензию клеток в PBS смешивали с ледяным Matrigel в соотношении 1:1 (об.:об.) до конечной концентрации $1,0 \times 10^8$ клеток/мл. 100 мкл/мышь смеси вводили подкожно. Мышей контролировали в отношении клинического состояния с измерением массы тела и опухолей с помощью цифрового штангенциркуля 3 раза в неделю, начиная с 3-го дня после имплантации.

[00304] Измерение и обработка опухоли. Объем опухоли (TV) (мм^3) рассчитывали по формуле: $W (\text{мм}) \times L (\text{мм}) \times D (\text{мм}) \times \pi/6$. Когда опухоли достигали в среднем около 100 мм^3 , животных рандомизировали по 5 в группе. Обработку проводили внутривенно в объеме 200 мкл испытуемого препарата. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела.

[00305] Статистический анализ. Описательную статистику выполняли по данным об объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой группе.

5.1.2 Фармакокинетика (PK)

[00306] PK-анализ проводили с использованием как анализа интактных ADC, так и анализа общего количества антител. Общее количество антител относится к сумме всех видов, включая конъюгированные и неконъюгированные виды (т. е. $\text{DAR0} + \text{DAR1} + \text{DAR2} + \dots + \text{DARn}$), тогда как интактный ADC относится ко всем конъюгированным видам (т. е. $\text{DAR1} + \text{DAR2} + \dots + \text{DARn}$). В анализе общего количества антител для захвата использовали биотинилированный мезотелин. В анализе интактных ADC использовали биотинилированный 5E4 Fab-фрагмент к эрибулину для захвата и меченное AlexaFluor647 антитело к человеческому Fc для обнаружения. Анализ проб проводили на анализаторе Gygos. Анализ данных выполнили в WatsonLIMS 7.4.1 и графически отображали в Microsoft Excel.

5.2 Результаты

[00307] Дозозависимая эффективность наблюдалась для диапазонов доз MORAb-109 (DAR2) от 5 мг/кг до 25 мг/кг (фиг. 18A и 18B). Никакой потери массы тела не наблюдалось ни в одной группе дозы (фиг. 18C). У обработанных животных наблюдалось дозозависимое воздействие ADC, на что указывало дозозависимое увеличение AUC (фиг. 19 и таблица 26).

Таблица 26. Фармакокинетика (PK) MORAb-109 (титрование дозы) у мышей с опухолями NCI-N87

Доза (мг/кг)	Интактное ADC или общее Ab	T _{1/2} (ч)	V _{dss} (мл/кг)	CL (мл/кг/ч)	AUC (мкг*ч/кг)	C _{max} (мкг/мл)
5	Интактное	125,1	78,7	0,509	9512	62,9
	Общее	173,9	75,1	0,316	14375	73,2
10	Интактное	148,2	99,5	0,475	19559	105
	Общее	231,6	89,6	0,259	31631	123
15	Интактное	142,1	81,1	0,414	34557	169
	Общее	209,2	68,8	0,236	56134	205
20	Интактное	151,5	90,9	0,429	43852	214
	Общее	218,6	70,6	0,230	75719	270
25	Интактное	143,5	91,1	0,463	51253	271
	Общее	226,1	78,2	0,240	88099	322

[0008] ПРИМЕР 6. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 *in vivo* на модели ксенотрансплантата рака яичника человека (OVCAR-3-A1-T1)

6.1 Способы

[00308] Животные. Самок мышей NOD.CB17-SCID (Jackson Laboratory) в возрасте 5 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение 5-7 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[00309] Культивирование клеток. Криоконсервированные клетки OVCAR-3-A1-T1 размораживали и выращивали в среде, содержащей необходимые добавки. Клетки субкультивировали в полной среде в течение 2 пассажей перед использованием для инокуляции *in vivo*.

[00310] Имплантация опухоли, процесс регистрации и обработка. Суспензию клеток в PBS смешивали с ледяным Matrigel в соотношении 1:1 (об.:об.) до конечной концентрации $5,0 \times 10^7$ клеток/мл. 100 мкл/мышь смеси вводили подкожно. Мышей контролировали в отношении клинического состояния с измерением массы тела и опухолей с помощью цифрового штангенциркуля 3 раза в неделю, начиная с 3-го дня после имплантации.

[00311] Измерение и обработка опухоли. Объем опухоли (TV) (мм³) рассчитывали по формуле: W (мм) × L (мм) × D (мм) × $\pi/6$. Когда опухоли достигали в среднем около 100 мм³, животных рандомизировали по 5 в группе. Обработку проводили внутривенно в объеме 200 мкл испытуемого препарата. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела.

[00312] Статистический анализ. Описательную статистику выполняли по данным об объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными

измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой группе.

6.2 Результаты

[00313] MORAb-109 (DAR2) продемонстрировал задержку роста опухоли на модели ксенотрансплантата рака яичника человека OVCAR-3-A1-T1 (фиг. 20A и фиг. 20B).

[0009] ПРИМЕР 7. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 *in vivo* на модели PDX NSCLC человека (LC-F-25)

7.1 Способы

[00314] Животные. Беспородных бестимусных (nu/nu) самок мышей (HSD:Athymic Nude-Foxn1nu) в возрасте 5 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение по меньшей мере 4 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[00315] Ксенотрансплантация. LC-F-25 приживляют как растущую опухоль (P9.1.1/0) из первичной мелкоклеточной аденокарциномы легкого от пациента-человека. LC-F-25 характеризуется более низкой экспрессией MSLN с точки зрения процента положительных результатов и общей интенсивности на основе иммуногистохимического (ИHC) анализа по сравнению с другими типами опухолей (такими как, например, LXFA-737 (пример 8)).

[00316] Экспериментальная процедура. Тридцать одну (31) мышь с прижившейся растущей опухолью LC-F-25 (P9.1.1/0) объемом от 108 до 288 мм³ подвергали обработке, когда средний и медианный объемы опухоли достигали 153,5 и 126 мм³ соответственно.

[00317] Обработка. Эффективность оценивали в 4 группах по 7-8 мышей в каждой.

- В группе 1 среду-носитель вводили в дозе 5 мл/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группах 2 и 3 эрибулин вводили соответственно в дозе 0,1 мг/кг (5 мл/кг) и 3,2 мг/кг (6,4 мл/кг) внутривенно однократно в день 1.
- В группе 4 MORAb-109 вводили в дозе 10 мг/кг (5 мл/кг) внутривенно однократно в день 1.

[00318] Опухоли измеряли и мышей взвешивали два раза в неделю в течение экспериментального периода.

[00319] Статистический анализ. Статистический анализ проводили для каждого измерения с помощью непараметрического критерия сравнения Манна-Уитни. Каждую обработанную группу сравнивали с контрольной группой.

7.2 Результаты

[00320] MORAb-109 (DAR2), вводимый однократно в дозе 10 мг/кг внутривенным путем, хорошо переносился мышами с опухолью LC-F-25 без потери массы тела (фиг. 21B). MORAb-109 (DAR2) продемонстрировал задержку роста опухоли при 10 мг/кг на модели PDX NSCLC LC-F-25 (фиг. 21A).

[00321] Эрибулин, вводимый однократно в дозе 0,1 мг/кг (эквивалентное молярное количество полезной нагрузки в MORAb-109 при введении в дозе 10 мг/кг) внутривенным путем, хорошо переносился мышами с опухолью LC-F-25, но не вызывал статистически значимого подавления роста опухоли (фиг. 21A и фиг. 21B).

[00322] Эрибулин, вводимый однократно в дозе 3,2 мг/кг (мышинная доза MTD или в 32 раза выше, чем молярное количество эрибулина в MORAb-109 при введении в дозе 10 мг/кг) внутривенным путем, хорошо переносился мышами с опухолью LC-F-25, но вызывал небольшую и преходящую потерю массы тела от 3 до 10 дней после введения (фиг. 21B). В этой дозе эрибулин вызывал статистически значимое ингибирование роста опухоли с частичной регрессией опухоли у 6 из 8 мышей (фиг. 21A).

[0010] ПРИМЕР 8. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 in vivo на модели PDX NSCLC человека (LXFA-737)

8.1 Способы

[00323] Животные. Самки мышей NMRI nu/nu (Crl:NMRI-Foxn1nu) в возрасте от 4 до 6 недель.

[00324] Ксенотрансплантация. LXFA-737 приживляют как растущую опухоль (P14N4) из первичной немелкоклеточной аденокарциномы легкого от пациента-человека. LXFA-737 характеризуется умеренной экспрессией MSLN с точки зрения общей интенсивности и более высокого процента положительных результатов на основе анализа ИHC по сравнению с другими типами опухолей (такими как, например, LC-F-25 (пример 7)).

[00325] Экспериментальная процедура. За животными наблюдали до тех пор, пока опухолевые имплантаты не достигли критерия объема исследования 50-250 мм³ (например, 80-200 мм³) у достаточного количества животных. Мышей распределяли по группам, стремясь к сопоставимым медианному и среднему объему опухоли в группе. День рандомизации обозначили как день 0.

[00326] Обработка. Эффективность оценивали в 4 группах по 6-7 мышей в каждой:

- В группе 1 среду-носитель вводили в дозе 5 мл/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группах 2 и 3 эрибулин вводили соответственно в дозе 0,2 мг/кг и 3,2 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 4 MORAb-109 вводили в дозе 10 мг/кг внутривенно однократно в день 1.

[00327] Опухоли измеряли и мышей взвешивали два раза в неделю в течение экспериментального периода. Первым днем введения дозы был день 1, один день после рандомизации (день 0).

[00328] Статистический анализ. Ингибирование роста опухоли, значение испытание/контроль в % (мин. T/C). Значение испытания по сравнению с контролем (T/C в %) рассчитывали из соотношения значений медианного остаточного объема опухоли (RTV) испытуемой и контрольной групп в день X, умноженного на 100. Время удвоения и учетверения объема опухоли (Td, Tq) для испытуемой и контрольной групп определяли как интервал времени (в днях), необходимый группе для достижения медианного RTV 200%

или 400%.

8.2 Результаты

[00329] MORAb-109 (DAR2) продемонстрировал надежную противоопухолевую эффективность (минимальное Т/С составило 2,3% в день 41) в дозе 10 мг/кг на модели PDX NSCLC LXFA-737 (фиг. 22А), и Тq для него не была достигнута в ходе исследования. MORAb-109 при введении в однократной дозе также хорошо переносился мышами с опухолью LXFA-737 без потери массы тела (фиг. 22В).

[00330] Эрибулин, вводимый однократно в дозе 3,2 мг/кг (мышинная доза MTD или в 32 раза выше, чем молярное количество эрибулина в MORAb-109 при введении в дозе 10 мг/кг) внутривенным путем, хорошо переносился мышами с опухолью LXFA-737, продемонстрировал противоопухолевую эффективность (минимальное Т/С составило 4,2% в день 27), и Тq для него составило 80,1%. Однако эрибулин вызывал небольшую и преходящую потерю массы тела после введения (фиг. 22А и фиг. 22В). Однократная доза 0,2 мг/кг, вдвое превышающая молярное количество эрибулина в MORAb-109 при введении в дозе 10 мг/кг, показала ограниченную противоопухолевую эффективность (минимальное Т/С составило 51,1% в день 44).

[0011] ПРИМЕР 9. Доза-ответ MORAb-109 на модели ксенотрансплантата рака желудка человека (NCI-N87)

9.1 Способы

9.1.1 Эффективность in vivo

[00331] Животные. Самок голых мышей NCr (Taconic) в возрасте 5 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение 5-7 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[00332] Культивирование клеток. Криоконсервированные клетки NCI-N87 размораживали и выращивали в среде, содержащей необходимые добавки. Клетки субкультивировали в полной среде в течение 2 пассажей перед использованием для инокуляции in vivo.

[00333] Имплантация опухоли, процесс регистрации и обработка. Суспензию клеток в PBS смешивали с ледяным Matrigel в соотношении 1:1 (об.:об.) до конечной концентрации $1,0 \times 10^8$ клеток/мл. 100 мкл/мышь смеси вводили подкожно. Мышей контролировали в отношении клинического состояния с измерением массы тела и опухолей с помощью цифрового штангенциркуля 3 раза в неделю, начиная с 3-го дня после имплантации.

[00334] Измерение и обработка опухоли. Объем опухоли (TV) (мм³) рассчитывали по формуле: $W \text{ (мм)} \times L \text{ (мм)} \times D \text{ (мм)} \times \pi/6$. Когда опухоли достигали в среднем около 100 мм³, животных рандомизировали по 5 в группе. Обработку проводили внутривенно в объеме 200 мкл испытуемого препарата. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела.

[00335] Статистический анализ. Описательную статистику выполняли по данным об

объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой группе.

9.1.2 Фармакокинетика (ПК)

[00336] ПК-анализ проводили с использованием как анализа интактных ADC, так и анализа общего количества антител. Общее количество антител относится к сумме всех видов, включая конъюгированные и неконъюгированные виды (т. е. $DAR_0 + DAR_1 + DAR_2 + \dots + DAR_n$), тогда как интактный ADC относится ко всем конъюгированным видам (т. е. $DAR_1 + DAR_2 + \dots + DAR_n$). В анализе общего количества антител использовали биотинилированный мезотелин для захвата и меченное AlexaFluor647 антитело к человеческому Fc для обнаружения. В анализе интактных ADC использовали биотинилированный 5E4 к эрибулину для захвата и меченное AlexaFluor647 антитело к человеческому Fc для обнаружения. Анализ проб проводили на анализаторе Gyros. Анализ данных выполнили в WatsonLIMS 7.4.1 и графически отображали в Microsoft Excel. Эрибулин количественно определяли с помощью LC-MS в образцах плазмы крови, опухоли и костного мозга.

9.1.3 LC-MS

[00337] Для анализа использовали 20-50 мкл плазмы крови с MORAb-109 (DAR2) от отдельных мышей или 50 мкл в равных долях объединенной плазмы крови от мышей, которым вводили MORAb-109 (DAR6). Dynabeads M-280 со стрептавидином (100 мкл) инкубировали с 3 мкг избирательно захватывающего конъюгата IgG человека-Fc PK-биотин в течение 1 часа при комнатной температуре, затем промывали буфером HBS-EP. Затем образцы плазмы крови, разведенные в буфере HBS-EP, смешивали с комплексообразующими/промытыми гранулами для захвата комплексов MORAb-109, инкубировали в течение 1 часа при комнатной температуре, затем дважды промывали в буфере HBS-EP. Промытые гранулы, содержащие комплекс, дегликозилировали с помощью Rapid PNGaseF (1 мкл) в буфере PNGase в течение 1 часа при 37°C, затем один раз промывали в буфере HBS-EP. Элюирование захваченного/дегликозилированного MORAb-109 проводили 10% ацетонитрилом с 0,1% (об./об.) муравьиной кислотой (30 мкл). Образцы анализировали в отношении интактной или восстановленной массы с помощью анализа UPLC Synapt G2/M-класса.

9.2 Результаты

[00338] Противоопухолевый эффект и изменение массы тела на модели ксенотрансплантата рака желудка человека NCI-N87, обработанной однократно MORAb-109 (DAR2 или DAR6) в дозе 10 мг/кг, показаны на фиг. 23А и фиг. 23В соответственно.

[00339] ПК-анализ MORAb-109 (DAR2), MORAb-109 (DAR6) и неконъюгированного антитела показан в таблице 27. Общее количество антитела для неконъюгированного и MORAb-109 (DAR2) было одинаковым, в то время как для MORAb-

109 (DAR6) было ниже, указывая на то, что MORAb-109 (DAR2) стабилен в циркуляции.

[00340] Анализ DAR в ADC из образцов плазмы крови показал, что скорость высвобождения полезной нагрузки для видов DAR6 была выше и способствовала более высоким уровням эрибулина в плазме крови (таблицы 28 и 29).

Таблица 27. PK-профиль MORAb-109 (DAR2 и DAR6) у мышей с опухолью NCI-N87

DAR2						
Параметры	Единица измерения	ADC	Общее количество Ab	ERI в плазме крови	ERI в опухоли	ERI в костном мозге
CL _{tot}	мл/ч/кг	0,71	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
V _{dss}	мл/кг	121	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
AUC _{0-inf}	мг×ч/мл	14,2	20,9	44,0 (нг×ч/мл)	17,8 (мкг×ч/мл)	9,9 (мкг×ч/мл)
T _{max}	ч	Нет данных	0,17	0,17	24	1
C _{max}	мкг/мл	Нет данных	137	0,65 (нг/мл)	64 (нг/г)	121 (нг/г)
T _{1/2}	ч	134	191	59	162	151
DAR6						
CL _{tot}	мл/ч/кг	0,73	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
V _{dss}	мл/кг	100	Нет данных	Нет данных	Нет данных	Нет данных
AUC _{0-inf}	мг×ч/мл	13,7	14,4	121 (нг×ч/мл)	16,0 (мкг×ч/мл)	6,7 (мкг×ч/мл)
T _{max}	ч	Нет	0,17	1	24	3

		данны х				
C _{max}	МКГ/МЛ	Нет данны х	148	2,6 (нг/мл)	96 (нг/г)	94 (нг/г)
T _{1/2}	ч	103	129	33	98	76
"Голое" Ab						
CL _{tot}	мл/ч/кг		0,54			
V _{dss}	мл/кг		126			
AUC _{0-inf}	мг×ч/мл		18,5			
C _{max}	МКГ/МЛ		183			
T _{1/2}	ч		<u>164</u>			

Таблица 28. DAR из MORAb-109 (DAR2) в плазме крови

Часы	1	2	3	Среднее DAR
0,167	1,92	1,93	1,94	1,93
8	1,88	1,86	1,92	1,89
24	1,83	1,86	1,90	1,86
48	1,87	1,82	1,83	1,84
96	1,83	1,65	1,78	1,75
168	1,69	1,75	1,63	1,69
336	1,38	1,54	1,64	1,52
504	1,08	1,18	1,63	1,30

Таблица 29. DAR из MORAb-109 (DAR6) в плазме крови

Время (ч)	L-цепь	H-цепь	Среднее DAR
0,167	1,52	1,23	5,52
8	1,46	1,13	5,18
24	1,26	0,81	4,15
48	1,25	0,71	3,91
96	1,27	0,44	3,42
168	0,93	0,38	2,61
336	0,86	0,35	2,41
504	N.D.	N.D.	N.A.

[0012]

[0013] ПРИМЕР 10. Сравнение 345A12 HC15 LC4 с анетумабом - аффинность связывания

10.1 Способы

[00341] Антитела. 345A12 HC15 LC4 (антитело к мезотелину в MORAb-109) и анетумаб. Последовательности анетумаба, человеческого антитела к мезотелину, представлены в таблице 30.

[00342] Аффинность связывания. Измерения связывания проводили в буфере HBS-P+ на приборе BIAcore T-100. Антитела разводили до концентрации 1 мкг/мл в HBS-P+. Образцы центрифугировали при 14000 g в течение 5 минут при комнатной температуре, а затем супернатанты переносили в новую пробирку BIAcore объемом 1,5 мл и закрывали крышкой. Мезотелин (50 мкг) разбавляли до 100 нМ в 1-кратном буфере HBS-P+, затем последовательно разбавляли в 5 раз до 100, 20, 4, 0,8 и 0,16 нМ в пробирках BIAcore и закрывали крышками. Чип для захвата антител человека получали в соответствии с протоколом производителя с использованием чипа CM5 с мастером иммобилизации. Конечные уровни захватывающих антител составляли 8000-9000 RU в HBS-P+. Чип подготовили для анализа с пятью циклами 300-секундной инъекции буфера с последующей 30-секундной регенерацией, все со скоростью 30 мкл/мин во всех четырех проточных ячейках.

[00343] Антитела захватывали на проточных ячейках 2-4 путем последовательного введения растворов индивидуальных лигандов в течение 90 секунд со скоростью 10 мкл/мин. Введение анализата осуществляли по кинетике одного цикла путем последовательного введения растворов анализата от низкой до высокой концентрации в течение 240 секунд каждое со скоростью 30 мкл/мин. Выявление проводили 2-1, 3-1, 4-1. Двойное сравнение выполняли при помощи последовательности идентичных введений захвата лиганда, за которыми следовали 5 введений только буфера по 240 секунд каждое, диссоциация в течение 1800 секунд и регенерация, как описано выше. Все лиганды анализировали в отношении связывания с мезотелином в двух повторностях. Кинетический анализ выполняли при помощи программного обеспечения BIAEvaluations с использованием модели аппроксимации Ленгмюра 1:1. Константы ассоциации, диссоциации и аффинности усредняли исходя из повторных прогонов.

10.2 Результаты

[00344] 345A12 HC15 LC4 продемонстрировал в 40 раз более высокую аффинность, чем у анетумаба (таблица 31). 345A12 HC15 LC4 сохранял аффинность связывания с мезотелином яванского макака, в то время как анетумаб не связывал мезотелин яванского макака. Ни одно из антител не связывало мезотелин крысы.

Таблица 30. Последовательности анетумаба

Цепь IgG	НК/АК	SEQ ID	Последовательность
-------------	-------	--------	--------------------

Тяжелая цепь	Аминокислота	51	QVELVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSY WIGWVRQAPGKGLEWMGIIDPGDSRTRYSPS FQGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYY CARGQLYGGTYMDGWGQGTLLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPVLDSGDSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
	Нуклеиновая кислота	52	CAGGTTGAACTGGTTCAGTCTGGCGCCGAA GTGAAGAAGCCTGGCGAGAGCCTGAAGATC AGCTGCAAAGGCAGCGGCTACAGCTTCACC AGCTATTGGATCGGCTGGGTTCGACAGGCC CCTGGCAAAGGACTGGAATGGATGGGAATC ATCGACCCCGGCGACAGCAGAACCAGATAC AGCCCTAGCTTTCAGGGCCAAGTGACCATC AGCGCCGACAAGAGCATCAGCACAGCCTAC CTGCAGTGGTCTAGCCTGAAAGCCAGCGAC ACCGCCATGTACTATTGTGCCAGAGGCCAG CTGTACGGCGGCACCTATATGGATGGATGG GGCCAGGGCACACTGGTCACAGTGTCTAGC GCCTCTACAAAGGGCCCTAGCGTTTTCCAC TGGCTCCTAGCAGCAAGAGCACATCTGGTG GAACAGCCGCTCTGGGCTGCCTGGTCAAGG ATTACTTTCCTGAGCCTGTGACCGTGTCTG GAATAGCGGAGCACTGACAAGCGGCGTGCA CACATTTCCAGCTGTGCTGCAGAGCAGCGG CCTGTACTCTCTGTCTAGCGTCGTGACAGTG CCTAGCAGCTCTCTGGGCACCCAGACCTAC

			ATCTGCAACGTGAACCACAAGCCTAGCAAC ACCAAGGTGGACAAGAAGGTGGAACCCAA GAGCTGCGACAAGACCCACACCTGTCCTCC ATGTCCTGCTCCAGAACTGCTCGGCGGACCC TCCGTTTTCTGTTTCCACCTAAGCCTAAGG ACACCCTGATGATCAGCAGGACCCCTGAAG TGACCTGTGTGGTGGTGGATGTGTCCACGA GGACCCAGAAGTGAAGTTCAATTGGTACGT GGACGGCGTGGAAGTGCACAACGCCAAGAC CAAGCCTAGAGAGGAACAGTACAACAGCAC CTACAGAGTGGTGTCCGTGCTGACCGTGCTG CACCAGGATTGGCTGAACGGCAAAGAGTAC AAGTGCAAGGTGTCCAACAAGGCCCTGCCT GCTCCTATCGAGAAAACCATCAGCAAGGCC AAGGGCCAGCCAAGAGAACCCAGGTTTAC ACACTGCCTCCAAGCAGGGACGAGCTGACC AAGAATCAGGTGTCCCTGACCTGCCTCGTG AAGGGCTTCTACCCTTCCGATATCGCCGTGG AATGGGAGAGCAATGGCCAGCCTGAGAACA ACTACAAGACAACCCCTCCTGTGCTGGACA GCGACGGCTCATTCTTCCTGTACAGCAAGCT GACAGTGGACAAGTCCAGATGGCAGCAGGG CAACGTGTTTCAGCTGTTCTGTGATGCACGAG GCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAAAGC CTGTCTCTGAGCCCCGGCAA
Легкая цепь	Аминокислота	53	DIALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDIGGYNS VSWYQQHPGKAPKLMIYGVNNRPSGVSNRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYDIESA TPVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQ ANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDSSPVKA GVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHR SYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
	Нуклеиновая кислота	54	GATATTGCTCTGACACAGCCTGCCAGCGTGT CCGGATCTCCTGGCCAGAGCATCACAATCA GCTGTACCGGCACAAGCAGCGACATCGGCG

			GCTACAATAGCGTGTCTCTGGTATCAGCAGC ACCCCGGAAAGGCCCTAAGCTGATGATCT ACGGCGTGAACAACAGACCCAGCGGCGTGT CCAATAGATTTCAGCGGCAGCAAGAGCGGCA ATACCGCCTCTCTGACAATTAGCGGACTGCA GGCCGAGGACGAGGCCGATTACTACTGCAG CAGCTACGACATCGAGAGCGCCACACCTGT GTTTGGCGGCGGAACAAAACCTGACAGTGCT GGGCCAACCTAAGGCCGCTCCTAGCGTTAC ACTGTTCCACCTAGCAGCGAGGAACTGCA GGCTAACAAGGCCACACTCGTGTGCCTGAT CAGCGATTTTTACCCTGGCGCCGTGACAGTG GCCTGGAAAGGCGATAGTTCTCCTGTGAAG GCCGGCGTGGAACCACCACACCTAGCAAG CAGAGCAACAACAATAACGCCGCCAGCTCC TACCTGAGCCTGACACCTGAGCAGTGGAAG TCCCACAGATCCTACAGCTGCCAAGTGACC CACGAGGGCAGCACCGTGGAACAAAACAGTG GCCCCTACCGAGTGCAGC
--	--	--	---

Таблица 31. Связывание 345A12 HC15 LC4 и анетумаба с мезотелином человека, яванского макака и крысы

		k_a (M ⁻¹ c ⁻¹)	k_d (c ⁻¹)	K_D (M)
Человек	345A12 HC15			
	LC4	$1,46 \pm 0,05 \times 10^6$	$2,85 \pm 0,14 \times 10^{-4}$	$1,95 \pm 0,16 \times 10^{-10}$
	анетумаб	$1,68 \pm 0,64 \times 10^6$	$1,12 \pm 1,00 \times 10^{-3}$	$7,26 \pm 2,29 \times 10^{-9}$
Яванский макак	345A12 HC15			
	LC4	$1,05 \pm 1,15 \times 10^4$	$7,51 \pm 5,76 \times 10^{-4}$	$8,86 \pm 5,16 \times 10^{-8}$
	анетумаб	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует
Крыса	345A12 HC15			
	LC4	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует
	анетумаб	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует	Связывание отсутствует

[0014]

[0015] ПРИМЕР 11. Сравнение MORAb-109 с BAY 94-9343 - активность in vitro

11.1 Способы

[00345] ADC. Оценивали MORAb-109 (DAR2 и DAR6) и анетумаб равтанзин (BAY 94-9343). Анетумаб равтанзин, также обозначаемый как BAY 94-9343, представляет собой ADC, содержащий анетумаб, конъюгированный с майтансиноидным ингибитором тубулина DM4 с помощью дисульфид-содержащего линкера (восстанавливаемый линкер SPDB [N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат]). BAY 94-9343 был получен, как описано в примере 15.

[00346] Цитотоксичность. Клетки субкультивировали и высевали по 5000 клеток/лунку в полную среду для роста в 96-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Реагенты для испытания последовательно разбавляли 1:3 в планшетах для разведения с глубокими лунками объемом 2 мл, начиная с 200 нМ (всего 10 разведений). Разбавленные образцы (100 мкл) добавляли в планшеты с клетками (начальная концентрация испытуемых образцов 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение еще 5 дней. Затем среду удаляли и планшеты однократно промывали с помощью 200 мкл DPBS, окрашивали с помощью 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе и растворяли кристаллический фиолетовый в 200 мкл 1% раствора SDS. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали для определения IC₅₀ с помощью GraphPad Prism 6.

11.2 Результаты

[00347] MORAb-109 (DAR2 и DAR6) проявлял специфическую цитотоксичность на MSLN-положительных клеточных линиях (таблица 32). BAY 94-9343, напротив, продемонстрировал уничтожение как MSLN-положительных, так и MSLN-отрицательных клеточных линий.

Таблица 32. Сравнение активности in vitro на клеточных линиях MSLN⁺ и MSLN⁻

	In vitro активность в клетках, IC ₅₀ , нМ					
	OVCAR3 -A1	NCI- H1568/MSLN	NCI- H292	BxPC3	A431	SKOV3
MORAb109_DAR 2	~0,01	2,17	>300	88,24	109,30	213,80
MORAb109_DAR 6	0,02	1,09	4,80	2,66	20,12	21,77
Эрибулин	0,02	0,14	0,11	0,13	0,18	0,14
BAY 94-9343	0,41	0,15	3,07	2,53	5,31	0,81
DM4	0,10	0,57	0,24	0,57	0,71	0,28

анетумаб	>100	>100	>300	>300	>300	>300
	% Макс. уничтожения					
MORAb109_DAR 2	98,39	73,49	58,22	90,62	84,97	58,41
MORAb109_DAR 6	98,47	77,89	75,34	94,63	90,76	72,79
Эрибулин	99,31	74,39	85,37	97,28	93,04	72,82
BAY 94-9343	100,00	75,10	84,15	97,33	96,82	74,99
DM4	100,00	77,49	92,40	97,98	92,52	81,89
анетумаб	19,80	5,50	15,15	25,73	18,58	31,55
Экспрессия MSLN (MFI)	220,0	4474,00	108,6	15,59	5,6	20

[0016]

[0017] ПРИМЕР 12. Сравнение MORAb-109 с BAY 94-9343 - специфичность

12.1 Способы

[00348] Цитотоксичность. Клетки субкультивировали и высевали по 5000 клеток/лунку в полную среду для роста в 96-луночные планшеты для тканевых культур и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение ночи (16 часов). Реагенты для испытания последовательно разбавляли 1:3 в планшетах для разведения с глубокими лунками объемом 2 мл, начиная с 200 нМ (всего 10 разведений). Разбавленные образцы (100 мкл) добавляли в планшеты с клетками (начальная концентрация испытуемых образцов 100 нМ). Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение еще 5 дней. Затем среду удаляли и планшеты однократно промывали с помощью 200 мкл DPBS, окрашивали с помощью 50 мкл 0,2% раствора кристаллического фиолетового при комнатной температуре в течение 15 мин, а затем тщательно промывали водопроводной водой. Планшеты сушили на воздухе и растворяли кристаллический фиолетовый в 200 мкл 1% раствора SDS. Планшеты считывали при 570 нм. Данные анализировали для определения IC₅₀ с помощью GraphPad Prism 6.

12.2 Результаты

[00349] Анализы цитотоксичности с неконъюгированным антителом продемонстрировали специфическое уничтожение клеток, экспрессирующих мезотелин, с помощью MORAb-109 (DAR2) (фиг. 25A), но не BAY 94-9343 (фиг. 25B). Не ограничиваясь теорией, отсутствие конкуренции со стороны неконъюгированного антитела, наблюдаемое для BAY 94-9343, предполагает высвобождение полезной нагрузки, что может привести к

уничтожению, даже если связывание антитела блокируется неконъюгированным конкурентом. Это высвобождение полезной нагрузки согласуется с относительно высокими уровнями цитотоксичности, наблюдаемыми для BAY 94-9343 на мезотелин-отрицательных клеточных линиях (таблица 32). Высвобождение полезной нагрузки также непосредственно наблюдается на фиг. 27 (сравнение стабильности в плазме крови).

[0018] ПРИМЕР 13. Сравнение MORAb-109 с BAY 94-9343 - активность ADCC

13.1 Способы

[00350] Клетки CHO, экспрессирующие MSLN, размораживали и высевали по 1000 клеток/лунку (25 мкл) в 96-луночные планшеты для тканевых культур в полной RPMI-4% FBS со сверхнизким содержанием IgG. Реагенты для испытаний (антитело 345A12, MORAb-109 (DAR2) и BAY 94-9343) последовательно разбавляли 1:2,5, начиная с 20 мкг/мл, в полной RPMI-4% FBS со сверхнизким содержанием IgG, затем переносили (25 мкл) в планшет для клеток и инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 60 мин. 6000 клеток Jurkat-Effector (Promega) оттаивали и добавляли (25 мкл) в планшет для клеток, и планшет инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 18-22 часов.

[00351] Реагент для анализа с люциферазой оттаивали в темноте. В каждую лунку добавляли по 75 мкл реагента для анализа с люциферазой, планшеты встряхивали в течение 30 с на встряхивателе для планшетов. Планшеты считывали на люминометре после 5-минутной инкубации.

13.2 Результаты

[00352] MORAb-109 (DAR2) и 345A12 HC15 LC4 имели сходную активность ADCC (фиг. 26A и таблица 33), тогда как BAY 94-9343 характеризовался более слабой активностью ADCC, чем анетумаб (фиг. 26B и таблица 34).

[0019]

[0020] Таблица 33. Активность ADCC - MORAb-109 и 345A12 HC15 LC4

345A12	MORAb-109
100%	96,9%

[0021]

[0022] Таблица 34. Активность ADCC - BAY 94-9343 и анетумаб

анетумаб	BAY 94-9343
100%	65,06%

[0023]

[0024] ПРИМЕР 14. Стабильность MORAb-109 и BAY 94-9343 в матриксе

14.1 Способы

[00353] ADC к MSLN готовили в концентрации 0,1 мг/мл либо в человеческой, либо в мышинной плазме крови, образцы инкубировали при 37°C в течение 0, 24, 48, 72, 96 и 240 часов, а затем переносили для хранения при -80°C при достижении временных точек. Все образцы оттаивали до температуры окружающей среды и разбавляли 1:100 для испытания. Анализ DAR-чувствительной стабильности разработали в Gyrolab в виде пошагового

сэндвич-формата. В анализе использовали биотинилированный мезотелин для захвата после блокирования и связывания образца и Alexa Fluor 647-5E4 Fab к эрибулину или Alexa Fluor 647-антитело к DM4 (Levena Biopharma) для обнаружения. Стандартную кривую и контроль качества получали с помощью MORAb-109 и BAY 94-9343.

14.2 Результаты

[00354] MORAb-109 (DAR2) был более стабильным, чем BAY 94-9343, как в плазме крови человека, так и в плазме крови мыши (фиг. 27).

[0025] ПРИМЕР 15. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 и BAY 94-9343 на модели ксенотрансплантата рака желудка человека (NCI-N87)

15.1 Способы

15.1.1 Получение BAY 94-9343

[00355] BAY 94-9343 представляет собой ADC, содержащий анетумаб, конъюгированный с майтансиноидным ингибитором тубулина DM4 с помощью дисульфид-содержащего линкера (восстанавливаемый линкер SPDB [N-сукцинимидил-4-(2-пиридилдитио)бутаноат]). Последовательности анетумаба получили из базы данных Beason (Hanson-Wade). Последовательности антител (таблица 30) получали из перекрывающихся олигонуклеотидов, амплифицировали с помощью ПЦР, клонировали в плазмиды экспрессии и подтверждали последовательности. Стабильные пулы получали в клетках 293F, и клетки выращивали до жизнеспособности <30%. Анетумаб очищали из кондиционированной среды с помощью аффинной хроматографии с белком A. BAY 94-9343 получали путем лизин-реактивной конъюгации с SPDB-DM4 (Levena BioPharma) для достижения DAR 3,7. Неконъюгированную полезную нагрузку удаляли при помощи обессоливающей хроматографии.

15.1.2 Эффективность in vivo

[00356] Животные. Самок голых мышей NCr (Taconic) в возрасте 5 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение 5-7 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[00357] Культивирование клеток. Криоконсервированные клетки NCI-N87 размораживали и выращивали в среде, содержащей необходимые добавки. Клетки субкультивировали в полной среде в течение 2 пассажей перед использованием для инокуляции in vivo.

[00358] Имплантация опухоли, процесс регистрации и обработка. Суспензию клеток в PBS смешивали с ледяным Matrigel в соотношении 1:1 (об.:об.) до конечной концентрации $1,0 \times 10^8$ клеток/мл. 100 мкл/мышь смеси вводили подкожно. Мышей контролировали в отношении клинического состояния с измерением массы тела и опухолей с помощью цифрового штангенциркуля 3 раза в неделю, начиная с 3-го дня после имплантации.

[00359] Измерение и обработка опухоли. Объем опухоли (TV) (мм³) рассчитывали по формуле: $W \text{ (мм)} \times L \text{ (мм)} \times D \text{ (мм)} \times \pi/6$. Когда опухоли достигали в среднем около 100

мм³, животных рандомизировали по 5 в группе. Обработку проводили внутривенно в объеме 200 мкл испытуемого препарата. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела.

[00360] Статистический анализ. Описательную статистику выполняли по данным об объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой группе.

15.2 Результаты

[00361] MORAb-109 (DAR2) и BAY 94-9343 продемонстрировали схожую эффективность у мышей с опухолью NCI-N87 (фиг. 28A). Ни в какой группе не наблюдалось потери массы тела (фиг. 28B).

[0026] ПРИМЕР 16. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 и BAY 94-9343 на модели ксенотрансплантата мезотелиомы человека (HAY)

16.1 Способы

[00362] Животные. Самок мышей NOD.CB17-SCID (Jackson Laboratory) в возрасте 5 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение 5-7 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[00363] Культивирование клеток. Криоконсервированные клетки HAY размораживали и выращивали в среде, содержащей необходимые добавки. Клетки субкультивировали в полной среде в течение 2 пассажей перед использованием для инокуляции *in vivo*.

[00364] Имплантация опухоли, процесс регистрации и обработка. Суспензию клеток в PBS смешивали с ледяным Matrigel в соотношении 1:1 (об.:об.) до конечной концентрации $5,0 \times 10^7$ клеток/мл. 100 мкл/мышь смеси вводили подкожно. Мышей контролировали в отношении клинического состояния с измерением массы тела и опухолей с помощью цифрового штангенциркуля 3 раза в неделю, начиная с 3-го дня после имплантации.

[00365] Измерение и обработка опухоли. Объем опухоли (TV) (мм³) рассчитывали по формуле: $W \text{ (мм)} \times L \text{ (мм)} \times D \text{ (мм)} \times \pi/6$. Когда опухоли достигали в среднем около 100 мм³, животных рандомизировали по 5 в группе. Обработку проводили внутривенно в объеме 200 мкл испытуемого препарата. В конце исследования измеряли и регистрировали конечную массу тела.

[00366] Статистический анализ. Описательную статистику выполняли по данным об объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой

группе.

16.2 Результаты

[00367] MORAb-109 (DAR2) и BAY 94-9343 продемонстрировали схожую эффективность у мышей с опухолью HAY (фиг. 29A). Ни в какой группе не наблюдалось потери массы тела (фиг. 29B).

[0027] ПРИМЕР 17. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 и BAY 94-9343 на модели PDX мезотелиомы человека (Meso7212)

17.1 Способы

[00368] Животные. Самок мышей NMRI nu/nu (Janvier Labs) в возрасте 5-6 недель на момент прибытия акклиматизировали в течение по меньшей мере 4 дней до инокуляции. Животных содержали по 3-5 мышей в вентилируемой клетке со стерилизованными пищевыми гранулами и бутылками с водой, доступными без ограничений. Перед началом исследования животным маркировали уши и взвешивали.

[00369] Ксенотрансплантация. В день 0 опухоли Meso 7212 удаляли у пяти мышей-доноров в стерильных условиях. Опухолевую ткань разрезали на фрагменты размером 2 x 2 мм и помещали в стерильную чашку Петри, покрытую 0,9% физиологическим раствором. Параллельно животным-реципиентам подкожно вводили анальгетик Metacam® (2 мг/кг), а затем анестезировали однократной внутривенной инъекцией (0,15 мл/мышь) Etomidat-Lipuro® (12 мг/кг). Выполняли поверхностный вертикальный разрез кожи 5-8 мм на левом боку. Кончик хирургических ножниц вводили в разрез непосредственно над боком и использовали для формирования кармана в подкожном пространстве. Один фрагмент опухоли на мышь имплантировали в карман с помощью хирургического пинцета. Наконец, разрез закрывали металлической скобой и животное помещали в чистую клетку.

[00370] Экспериментальная процедура. После ксенотрансплантации приживание и распространение опухоли у мышей контролировали по меньшей мере два раза в неделю путем пальпации. Когда опухоль стала пальпируемой, измерения диаметра опухоли выполняли с помощью цифрового штангенциркуля (Mitutoyo).

[00371] Перед началом обработки животных случайным образом распределяли в экспериментальные группы в зависимости от объема опухоли (критерий включения по объему опухоли 0,1-0,3 см³). Начиная с первого дня обработки два раза в неделю регистрировали объем опухоли и массу тела. Состояние животных контролировали два раза в день.

[00372] Обработка. Все средства вводили внутривенно однократно в день рандомизации. Таким же образом животных контрольной группы обрабатывали DPBS.

[00373] Статистический анализ. Описательную статистику выполняли по данным об объеме опухоли и массе тела. Объемы опухолей животных из каждой группы обработки сравнивали с контрольной группой с помощью двустороннего ANOVA с повторными измерениями с последующим апостериорным критерием Бонферрони. Кроме того, с тем же статистическим анализом также проводили сравнение роста опухоли у животных в каждой группе.

17.2 Результаты

[00374] MORAb-109 (DAR2) и BAY 94-9343 продемонстрировали регрессию опухоли у мышей с опухолью Meso7212 (фиг. 30A). Ни в какой группе не наблюдалось потери массы тела (фиг. 30B).

[0028] ПРИМЕР 18. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 и BAY 94-9343 на модели PDX NSCLC человека (LXFA-586)

18.1 Способы

[00375] Животные. Самки мышей NMRI nu/nu в возрасте от 4 до 6 недель.

[00376] Ксенотрансплантация. Приживляют LXFA-586 как растущую опухоль (T2N1M0) из первичной немелкоклеточной аденокарциномы легкого пациента-человека.

[00377] Экспериментальная процедура. За животными наблюдали до тех пор, пока опухолевые имплантаты не достигли критерия объема исследования 50-250 мм³ (например, 80-200 мм³) у достаточного количества животных. Мышей распределяли по группам, стремясь к сопоставимым медианному и среднему объему опухоли в группе. Процесс распределения по группам (регистрация, стратифицированная рандомизация) также может называться рандомизацией. День рандомизации обозначили как день 0 эксперимента.

[00378] Обработка. Эффективность оценивали в 4 группах по 6-7 мышей в каждой:

- В группе 1 среду-носитель вводили в дозе 5 мл/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 2 BAY 94-9343 (DAR ~ 4) вводили в дозе 25 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 3 MORAb-109 (DAR2) вводили в дозе 25 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 4 эрибулин вводили в дозе 3,2 мг/кг внутривенно однократно в день 1.

[00379] Опухоли измеряли и мышей взвешивали два раза в неделю в течение экспериментального периода. Первым днем введения дозы был день 1, один день после рандомизации (день 0).

18.2 Результаты

[00380] MORAb-109 (DAR2) продемонстрировал надежную противоопухолевую эффективность (минимальное T/C составило 1,8% в день 41) в дозе 25 мг/кг на модели PDX NSCLC LXFA-586 (фиг. 31A), и Tq для него не была достигнута в ходе исследования. MORAb-109 при введении в однократной дозе также хорошо переносился мышами с опухолью LXFA-586 без потери массы тела (фиг. 31B).

[00381] BAY 94-9343 (DAR ~ 4) продемонстрировал надежную противоопухолевую эффективность, подобную MORAb-109 в дозе 25 мг/кг на модели PDX NSCLC LXFA-586 (фиг. 31A), и Tq для него не была достигнута в ходе исследования. Однако молярное количество полезной нагрузки DM4 в BAY 94-9343 примерно в два раза превышает количество полезной нагрузки эрибулина в MORAb-109.

[00382] Эрибулин, вводимый однократно в дозе 3,2 мг/кг (мышинная доза MTD или в 32 раза выше, чем молярное количество эрибулина в MORAb-109 при введении в дозе 10

мг/кг) внутривенным путем, хорошо переносился мышами с опухолью LXFA-586 и продемонстрировал противоопухолевую эффективность (минимальное Т/С составило 14,8% в день 21). Однако эрибулин вызывал небольшую и преходящую потерю массы тела после введения (фиг. 31А и фиг. 31В).

[0029] ПРИМЕР 19. Противоопухолевая эффективность MORAb-109 и BAY 94-9343 на модели PDX NSCLC человека (LXFL-529)

19.1 Способы

[00383] Животные. Самки мышей NMRI nu/nu в возрасте от 4 до 6 недель.

[00384] Ксенотрансплантация. Приживляют LXFA-529 как растущую опухоль (T3N1M0) из первичной немелкоклеточной аденокарциномы легкого пациента-человека.

[00385] Экспериментальная процедура. За животными наблюдали до тех пор, пока опухолевые имплантаты не достигли критерия объема исследования 50-250 мм³ (например, 80-200 мм³) у достаточного количества животных. Мышей распределяли по группам, стремясь к сопоставимым медианному и среднему объему опухоли в группе. Процесс распределения по группам (регистрация, стратифицированная рандомизация) также может называться рандомизацией. День рандомизации обозначили как день 0 эксперимента.

[00386] Обработка. Эффективность оценивали в 6 группах по 6-7 мышей в каждой:

- В группе 1 среду-носитель вводили в дозе 5 мл/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 2 BAY 94-9343 (DAR ~ 4) вводили в дозе 12,5 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 3 эрибулин вводили в дозе 3,2 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 4 MORAb-109 (DAR2) вводили в дозе 25 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 5 MORAb-109 (DAR2) вводили в дозе 12,5 мг/кг внутривенно однократно в день 1.
- В группе 6 MORAb-109 (DAR2) вводили в дозе 12,5 мг/кг внутривенно при введении в день 1, 8 и 16.

[00387] Опухоли измеряли и мышей взвешивали два раза в неделю в течение экспериментального периода. Первым днем введения дозы был день 1, один день после рандомизации (день 0).

19.2 Результаты

[00388] MORAb-109 (DAR2) продемонстрировал надежную противоопухолевую эффективность в дозе 12,5 и 25 мг/кг на модели PDX NSCLC LXFL-529 (фиг. 32А). MORAb-109 при введении в однократной дозе также хорошо переносился мышами с опухолью LXFL-529 без потери массы тела (фиг. 32В).

[00389] Однако BAY 94-9343 (DAR ~ 4) в дозе 12,5 мг/кг (молярное количество полезной нагрузки DM4, эквивалентное количеству полезной нагрузки эрибулина в MORAb-109 при 25 мг/кг) не продемонстрировал противоопухолевой эффективности (фиг. 32А).

[00390] Эрибулин, вводимый в однократной дозе 3,2 мг/кг (доза MTD для мышей) внутривенным путем, хорошо переносился мышами с опухолью LXFL-529 и продемонстрировал противоопухолевую эффективность. Однако эрибулин вызывал небольшую и преходящую потерю массы тела после введения (фиг. 32А и фиг. 32В).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT.

2. Выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи из вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и три определяющие комплементарность области легкой цепи из вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасы вариабельных областей тяжелой и легкой цепей человека или каркасы вариабельных областей тяжелой и легкой цепей человека с одной или несколькими обратными мутациями.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 14.

5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-5, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой каппа-цепи Ig человека.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-6, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-7, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи,

содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-8, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-10, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с терапевтическим средством.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, где терапевтическое средство представляет собой эрибулин.

13. Конъюгат антитела и лекарственного средства формулы (I):



где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, который ковалентно присоединяет Ab к D; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

14. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 13, где p представляет собой целое число от 1 до 6.

15. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 13 или п. 14, где p равняется 6.

16. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 13 или п. 14, где p равняется 2.

17. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-16, где

расщепляемый линкер предусматривает расщепляемый фрагмент, расположенный таким образом, что никакая часть линкера или антитела или антигенсвязывающего фрагмента не остается связанной с эрибулином после расщепления.

18. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-17, где расщепляемый линкер предусматривает расщепляемый пептидный фрагмент.

19. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 18, где расщепляемый пептидный фрагмент является расщепляемым под действием фермента.

20. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 18 или п. 19, где расщепляемый пептидный фрагмент является расщепляемым под действием катепсина.

21. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 18-20, где расщепляемый пептидный фрагмент является расщепляемым под действием катепсина В.

22. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-21, где расщепляемый пептидный фрагмент или расщепляемый линкер предусматривает аминокислотное звено.

23. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 22, где аминокислотное звено предусматривает валин-цитруллин (Val-Cit).

24. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-23, где расщепляемый линкер предусматривает по меньшей мере одно спейсерное звено.

25. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-24, где спейсерное звено или расщепляемый линкер предусматривает фрагмент, представляющий собой полиэтиленгликоль (PEG).

26. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 25, где фрагмент, представляющий собой PEG, предусматривает $-(\text{PEG})_m-$, и m представляет собой целое число от 1 до 10.

27. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 26, где m равняется 2.

28. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 24-27, где спейсерное звено присоединено к антителу или антигенсвязывающему фрагменту посредством фрагмента, представляющего собой малеимид (Mal) ("Mal-спейсерное звено").

29. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 28, где Mal-спейсерное звено присоединено к антителу или антигенсвязывающему фрагменту посредством остатка цистеина в антителе или антигенсвязывающем фрагменте.

30. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 29, где остаток цистеина представляет собой остаток цистеина в аминокислотном положении 80 вариабельной области легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента в соответствии с системой нумерации Kabat ("LCcys80").

31. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 30, где p равняется 2.

32. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 31, где каждый фрагмент -L-D присоединен к LCcys80 в антителе или антигенсвязывающем фрагменте.

33. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 28-32, где расщепляемый линкер предусматривает Mal-спейсерное звено и расщепляемый пептидный

фрагмент.

34. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 33, где расщепляемый пептидный фрагмент предусматривает Val-Cit.

35. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 28-34, где Mal-спейсерное звено присоединяет антитело или антигенсвязывающий фрагмент к расщепляемому фрагменту в линкере.

36. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 35, где расщепляемый фрагмент в линкере предусматривает расщепляемый пептидный фрагмент.

37. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 36, где расщепляемый пептидный фрагмент предусматривает Val-Cit.

38. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 35-37, где расщепляемый линкер предусматривает Mal-(PEG)₂-Val-Cit.

39. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 24-38, где расщепляемый фрагмент в линкере непосредственно соединен с эрибулином, или где спейсерное звено присоединяет расщепляемый фрагмент в линкере к эрибулину.

40. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 39, где расщепление конъюгата обеспечивает высвобождение эрибулина от антитела или антигенсвязывающего фрагмента и линкера.

41. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 39 или п. 40, где спейсерное звено, присоединяющее расщепляемый фрагмент в линкере к эрибулину, является саморасщепляемым.

42. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 39-41, где спейсерное звено, присоединяющее расщепляемый фрагмент в линкере к эрибулину, предусматривает *n*-аминобензилоксикарбонил (pAB).

43. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 42, где pAB присоединяет расщепляемый фрагмент в линкере к эрибулину.

44. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 42 или п. 43, где pAB обеспечивает ковалентное присоединение к эрибулину через амин C-35.

45. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 39-44, где расщепляемый фрагмент в линкере предусматривает расщепляемый пептидный фрагмент.

46. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 45, где расщепляемый пептидный фрагмент предусматривает Val-Cit.

47. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 45 или п. 46, где расщепляемый линкер предусматривает Val-Cit-pAB.

48. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-47, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека или каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека с одной или несколькими обратными мутациями.

49. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-48, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой

цепи, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 14.

50. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-49, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

51. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-50, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека.

52. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-51, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15.

53. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-52, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи Ig человека.

54. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-53, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

55. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-54, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

56. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-55, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

57. Конъюгат антитела и лекарственного средства формулы (I):



где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 1 (HCDR1), SEQ ID NO: 2 (HCDR2) и SEQ ID NO: 3 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 4 (LCDR1), SEQ ID NO: 5 (LCDR2) и SEQ ID NO: 6 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации Kabat; или три определяющие комплементарность области тяжелой цепи, содержащие аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 7 (HCDR1), SEQ ID NO: 8 (HCDR2) и SEQ ID NO: 9 (HCDR3); и три определяющие комплементарность области легкой цепи, содержащие

аминокислотные последовательности с SEQ ID NO: 10 (LCDR1), SEQ ID NO: 11 (LCDR2) и SEQ ID NO: 12 (LCDR3), которые определены согласно системе нумерации IMGT;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-Cit-pAB; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

58. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 57, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека или каркасы переменных областей тяжелой и легкой цепей человека с одной или несколькими обратными мутациями.

59. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 57 или п. 58, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, которая на по меньшей мере 90% идентична аминокислотной последовательности с SEQ ID NO: 14.

60. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-59, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14.

61. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-60, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой цепи Ig человека.

62. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-61, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

63. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-62, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

64. Конъюгат антитела и лекарственного средства формулы (I):



где

Ab представляет собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент способны связываться с мезотелином и содержат переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 13, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 14;

D представляет собой эрибулин;

L представляет собой расщепляемый линкер, предусматривающий Mal-(PEG)₂-Val-

Cit-pAB; и

p представляет собой целое число от 1 до 8.

65. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 64, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи IgG1 человека и константную область легкой каппа-цепи Ig человека.

66. Конъюгат антитела и лекарственного средства по п. 64 или п. 65, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 15, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 16.

67. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 64-66, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат тяжелую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 17, и легкую цепь, содержащую аминокислотную последовательность с SEQ ID NO: 18.

68. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-67, где p составляет от 1 до 6.

69. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-68, где p равняется 6.

70. Конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 57-68, где p равняется 2.

71. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12 или конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 и фармацевтически приемлемый носитель.

72. Фармацевтическая композиция по п. 71, где фармацевтическая композиция предусматривает множество копий антитела, антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитела и лекарственного средства.

73. Фармацевтическая композиция по п. 71 или п. 72, где фармацевтическая композиция предусматривает множество копий конъюгата антитела и лекарственного средства, где среднее значение p конъюгатов антитела и лекарственного средства в композиции составляет от приблизительно 1 до приблизительно 6. Необязательно, среднее значение p конъюгатов антитела и лекарственного средства в композиции составляет приблизительно 1,3, приблизительно 1,4, приблизительно 1,5, приблизительно 1,6, приблизительно 1,7, приблизительно 1,8, приблизительно 1,9, приблизительно 2,0, приблизительно 2,1, приблизительно 2,2 или приблизительно 2,3.

74. Фармацевтическая композиция по п. 73, где среднее значение p конъюгатов антитела и лекарственного средства в композиции составляет приблизительно 6.

75. Фармацевтическая композиция по п. 73, где среднее значение p конъюгатов антитела и лекарственного средства в композиции составляет приблизительно 1,9 или приблизительно 2,0.

76. Способ лечения субъекта, у которого имеется рак или подозрение на его наличие, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества

антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 или фармацевтической композиции по любому из пп. 71-75.

77. Способ по п. 76, где при раке экспрессируется мезотелин.

78. Способ по п. 76 или п. 77, где рак представляет собой мезотелиому, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

79. Способ по любому из пп. 76-78, где рак представляет собой мезотелиому, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

80. Способ уменьшения или замедления роста популяции раковых клеток у субъекта, предусматривающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 или фармацевтической композиции по любому из пп. 71-75.

81. Способ по п. 80, где популяция раковых клеток экспрессирует мезотелин.

82. Способ по п. 80 или п. 81, где популяция раковых клеток представляет собой солидную опухоль или гематологическое злокачественное новообразование.

83. Способ по любому из пп. 80-82, где популяция раковых клеток представляет собой мезотелиому, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

84. Способ по любому из пп. 80-83, где популяция раковых клеток представляет собой мезотелиому, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

85. Способ по любому из пп. 80-84, где введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела и лекарственного средства или фармацевтической композиции уменьшает популяцию раковых клеток на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

86. Способ по любому из пп. 80-85, где введение антитела, антигенсвязывающего фрагмента, конъюгата антитела и лекарственного средства или фармацевтической композиции замедляет рост популяции раковых клеток на по меньшей мере приблизительно 10%, по меньшей мере приблизительно 20%, по меньшей мере приблизительно 50%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 90%, по меньшей мере приблизительно 95% или по меньшей мере приблизительно 99%.

87. Способ определения того, будет ли субъект, у которого имеется рак или подозрение на его наличие, восприимчивым к лечению с помощью антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 или фармацевтической композиции по любому из пп. 71-75, предусматривающий получение биологического образца от субъекта; приведение образца в контакт с антителом или антигенсвязывающим фрагментом и выявление связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с одной или несколькими раковыми клетками в образце.

88. Способ по п. 87, где одна или несколько раковых клеток экспрессируют мезотелин.

89. Способ по п. 87 или п. 88, где при раке экспрессируется мезотелин.

90. Способ по любому из пп. 87-89, где рак представляет собой мезотелиому, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

91. Способ по любому из пп. 87-90, где рак представляет собой мезотелиому, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

92. Способ по любому из пп. 87-91, где образец представляет собой образец биоптата ткани, образец крови, образец лимфы, образец костного мозга, образец кожи или образец спинномозговой жидкости (CSF).

93. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12, конъюгат антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 или фармацевтическая композиция по любому из пп. 71-75 для применения при лечении субъекта, имеющего рак или подозрение на его наличие.

94. Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела и лекарственного средства или фармацевтическая композиция по п. 93, где при раке экспрессируется мезотелин.

95. Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела и лекарственного средства или фармацевтическая композиция по п. 93 или п. 94, где рак представляет собой мезотелиому, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

96. Антитело, антигенсвязывающий фрагмент, конъюгат антитела и лекарственного средства или фармацевтическая композиция по любому из пп. 93-95, где рак представляет собой мезотелиому, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

97. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 или фармацевтической композиции по любому из пп. 71-75 при лечении субъекта, имеющего

рак или подозрение на его наличие.

98. Применение по п. 97, где при раке экспрессируется мезотелин.

99. Применение по п. 97 или п. 98, где рак представляет собой мезотелиому, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

100. Применение по любому из пп. 97-99, где рак представляет собой мезотелиому, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

101. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70 или фармацевтической композиции по любому из пп. 71-75 в способе изготовления лекарственного препарата для лечения субъекта, имеющего рак или подозрение на его наличие.

102. Применение по п. 101, где при раке экспрессируется мезотелин.

103. Применение по п. 101 или п. 102, где рак представляет собой мезотелиому, рак молочной железы, рак шейки матки, колоректальный рак, рак эндометрия, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичника, рак поджелудочной железы, рак предстательной железы, рак почки, рак желудка, рак щитовидной железы, уротелиальный рак, рак матки, рак желчных протоков или лейкоз.

104. Применение по любому из пп. 101-103, где рак представляет собой мезотелиому, рак легкого, рак яичника или рак желудка.

105. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-12.

106. Выделенный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 105.

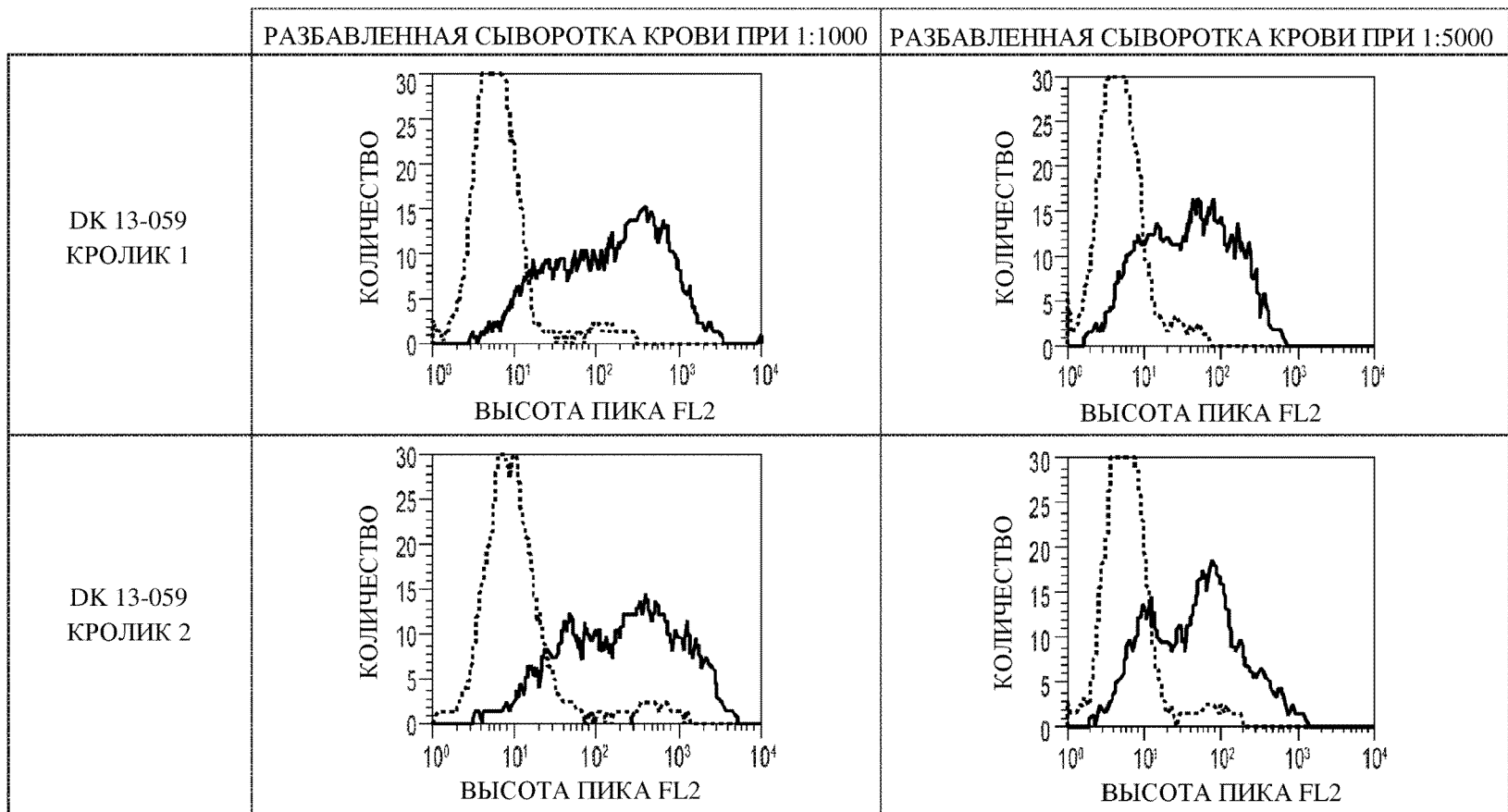
107. Выделенная клетка или клеточная популяция, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 105 или вектор по п. 106.

108. Способ получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-12, предусматривающий культивирование клетки или клеточной популяции по п. 107 в условиях, подходящих для получения антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

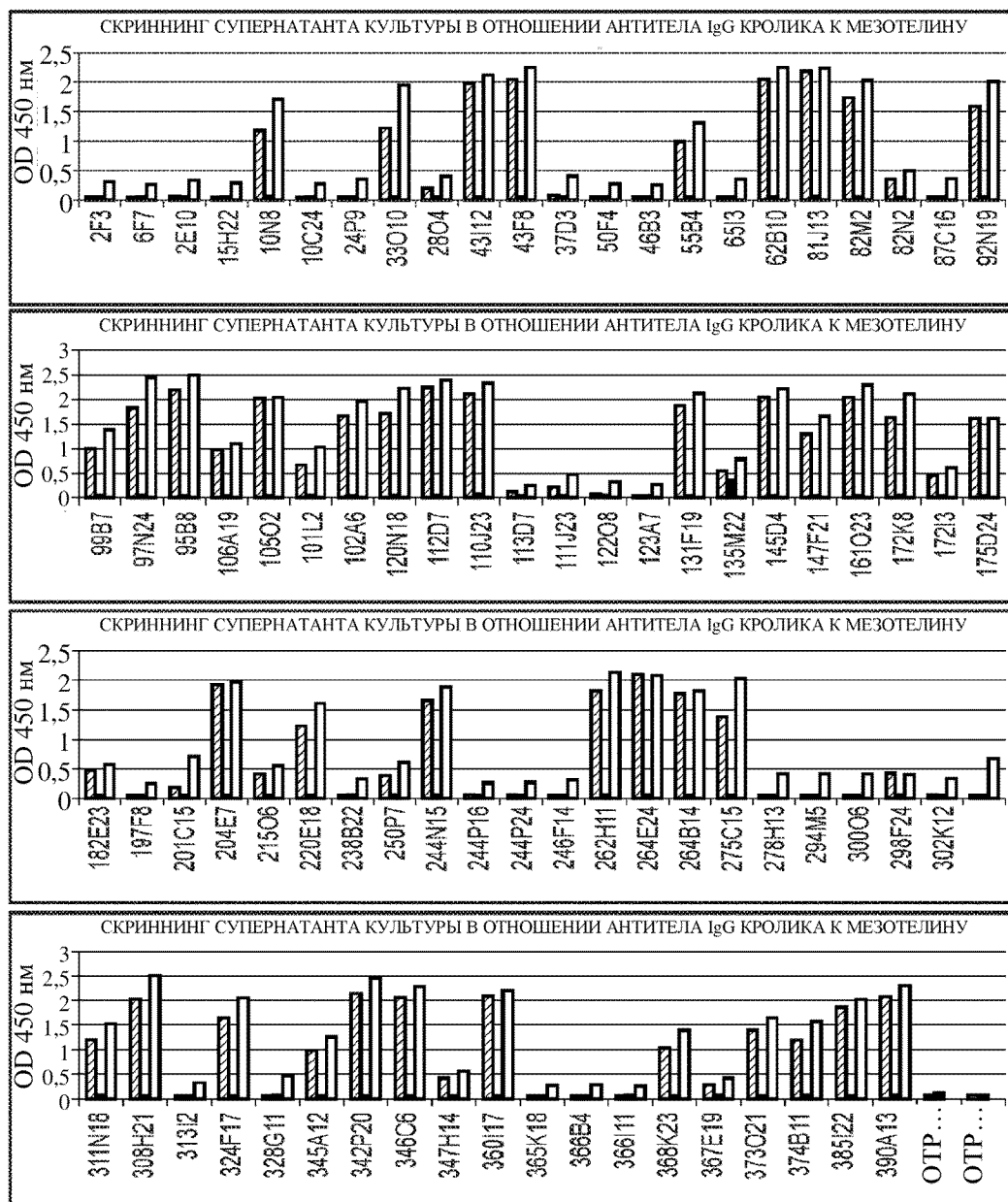
109. Способ получения конъюгата антитела и лекарственного средства по любому из пп. 13-70, предусматривающий осуществление реакции антитела или антигенсвязывающего фрагмента с расщепляемым линкером, присоединенным к эрибулину, в условиях, которые обеспечивают конъюгирование.

110. Способ по п. 109, где расщепляемый линкер, присоединенный к эрибулину, вступает в реакцию с остатком цистеина на легкой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

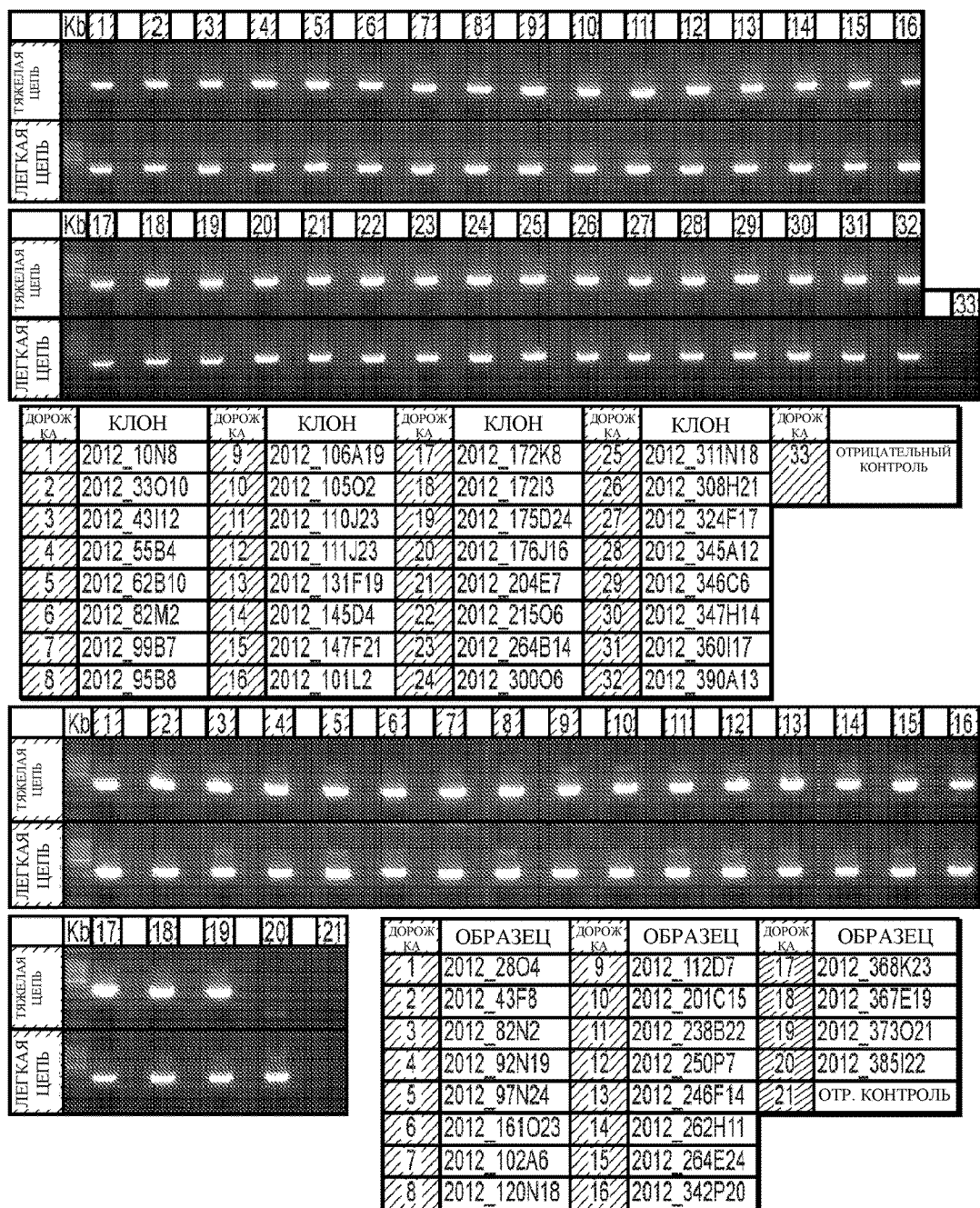
По доверенности



ФИГ. 1



ФИГ. 2



ФИГ. 3

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2012_10N8 -HC	2012_10N8 -LC	2012_106 A19-HC	2012_106 A19-LC	2012_172 K8-HC	2012_172 K8-LC	2012_311 N18-HC	2012_311 N18-LC	2012_28 O4-HC	2012_28 O4-LC	2012_11 2D7-HC	2012_11 2D7-LC
B	2012_33O1 0-HC	2012_33O1 0-LC	2012_105 O2-HC	2012_105 O2-LC	2012_172 I3-HC	2012_172 I3-LC	2012_308 H21-HC	2012_308 H21-LC	2012_43F8 -HC	2012_43F8 -LC	2012_201 C15-HC	2012_201 C15-LC
C	2012_43I 12-HC	2012_43I 12-LC	2012_110 J23-HC	2012_110 J23-LC	2012_175 D24-HC	2012_175 D24-LC	2012_324 F17-HC	2012_324 F17-LC	2012_82N2 -HC	2012_82N2 -LC	2012_238 B22-HC	2012_238 B22-LC
D	2012_55B4 -HC	2012_55B4 -LC	2012_111 J23-HC	2012_111 J23-LC	2012_176 J16-HC	2012_176 J16-LC	2012_345 A12-HC	2012_345 A12-LC	2012_92N 19-HC	2012_92N 19-LC	2012_250 P7-HC	2012_250 P7-LC
E	2012_62B 10-HC	2012_62B 10-LC	2012_131 F19-HC	2012_131 F19-LC	2012_204 E7-HC	2012_204 E7-LC	2012_346 C6-HC	2012_346 C6-LC	2012_97N 24-HC	2012_97N 24-LC	2012_246 F14-HC	2012_246 F14-LC
F	2012_82 M2-HC	2012_82 M2-LC	2012_145 D4-HC	2012_145 D4-LC	2012_215 O6-HC	2012_215 O6-LC	2012_347 H14-HC	2012_347 H14-LC	2012_161 O23-HC	2012_161 O23-LC	2012_262 H11-HC	2012_262 H11-LC
G	2012_99 B7-HC	2012_99 B7-LC	2012_147 F21-HC	2012_147 F21-LC	2012_264 B14-HC	2012_264 B14-LC	2012_360 I17-HC	2012_360 I17-LC	2012_102 A6-HC	2012_102 A6-LC	2012_264 E24-HC	2012_264 E24-LC
H	2012_95 B8-HC	2012_95 B8-LC	2012_101 L2-HC	2012_101 L2-LC	2012_300 O6-HC	2012_300 O6-LC	2012_390 A13-HC	2012_390 A13-LC	2012_120 N18-HC	2012_120 N18-LC	2012_342 P20-HC	2012_342 P20-LC

Фиг. 4

ЛУНКА	КЛОН	ОБЩЕЕ (мкг)
A1	2012_10N8	492,4
B1	2012_33O10	420,2
C1	2012_43I12	459,8
D1	2012_55B4	439,8
E1	2012_62B10	423,6
F1	2012_82M2	327,6
G1	2012_99B7	397
H1	2012_95B8	466,4
A2	2012_106A19	132,3
B2	2012_105O2	слишком низкий
C2	2012_110J23	521,8
D2	2012_111J23	слишком низкий
E2	2012_131F19	591
F2	2012_145D4	439,4
G2	2012_147F21	235,6
H2	2012_101L2	319,4

ЛУНКА	КЛОН	ОБЩЕЕ (мкг)
A3	2012_172K8	138,14
B3	2012_172I3	166,4
C3	2012_175D24	792,8
D3	2012_176J16	830
E3	2012_204E7	слишком низкий
F3	2012_215O6	246,6
G3	2012_264B14	160,16
H3	2012_300O6	263,6
A4	2012_311N18	139,68
B4	2012_308H21	397,8
C4	2012_324F17	649,6
D4	2012_345A12	330,6
E4	2012_346C6	262,2
F4	2012_347H14	685,6
G4	2012_360H17	78,82
H4	2012_390A13	292,4

ЛУНКА	КЛОН	ОБЩЕЕ (мкг)
A5	2012_28O4	637,2
B5	2012_43F8	195,2
C5	2012_82N2	236,4
D5	2012_92N19	960,2
E5	2012_97N24	315,2
F5	2012_161O23	671
G5	2012_102A6	231,18
H5	2012_120N18	408,8
A6	2012_112D7	77,6
B6	2012_201C15	610
C6	2012_238B22	333,6
D6	2012_250P7	361,6
E6	2012_246F14	285,8
F6	2012_262H11	282,4
G6	2012_264E24	288,8
H6	2012_342P20	341,4

ФИГ. 5

		OVCA3		A431-K5		A431	
		EC50 (M)	МАКС. УНИЧТОЖЕНИЕ (%)	EC50 (M)	МАКС. УНИЧТОЖЕНИЕ (%)	EC50 (M)	МАКС. УНИЧТОЖЕНИЕ (%)
2012_10N8	A1	5,21E-09	95,5	7,885E-09	82,4	~5,359e-008	32,9
2012_33O10	B1	2,273E-09	94,6	1,913E-09	76,7	~2,319e-007	21,3
2012_43I12	C1	2,428E-09	91,8	1,301E-08	80,7	~1,562e-006	45,6
2012_55B4	D1	2,922E-09	94,1	7,013E-10	69,0	~4,604e-006	21,9
2012_62B10	E1	3,675E-09	96,2	5,753E-10	83,5	~3,956e-008	26,3
2012_82M2	F1	1,644E-09	89,1	8,471E-10	77,3	~4,326e-007	16,4
2012_99B7	G1	4,971E-09	89,3	2,499E-09	79,4	~6,102e-007	49,8
2012_95B8	H1	4,154E-09	87,5	1,742E-08	77,5	~1,411e-007	34,0
2012_106A19	A2	7,855E-10	87,8	1,063E-08	74,5	~2,509e-005	18,4
2012_105O2	B2	1,914E-09	88,6	~0,006310	77,5	~1,004e-005	20,3
2012_110J23	C2	5,911E-09	85,3	4,272E-09	76,0	~3,027e-008	21,1
2012_111J23	D2	6,658E-09	85,7	~1,946e-008	80,4	~7,776e-007	13,3
2012_131F19	E2	6,894E-09	84,4	9,003E-10	79,9	~7,996e-007	22,9
2012_145D4	F2	4,839E-09	84,0	1,19E-09	80,7	~9,026e-007	21,9
2012_147F21	G2	4,91E-09	83,3	8,149E-09	84,2	~3,497e-006	30,7
2012_101L2	H2	1,06E-08	83,1	5,102E-09	77,2	~6,119e-008	23,6
2012_172K8	A3	7,714E-09	83,7	3,398E-09	84,6	~8,408e-008	15,9
2012_172I3	B3	7,243E-09	83,2	2,204E-09	81,3	~8,136e-008	22,8
2012_175D24	C3	6,611E-09	81,5	~2,570e-008	65,0	~6,087e-008	30,4
2012_176J16	D3	2,392E-09	78,4	9,117E-09	69,8	~8,135e-008	42,6
2012_204E7	E3	1,193E-08	88,5	~2,062e-008	63,5	~2,507e-008	8,6
2012_215O6	F3	~2s981e-011	87,7	1,407E-08	70,2	~8,772e-007	14,3
2012_264B14	G3	2,837E-09	85,9	1,776E-08	73,0	~3,077e-008	12,7
2012_300O6	H3	5,156E-09	85,2	1,507E-08	75,0	~8,050e-008	29,2
2012_311N18	A4	5,868E-09	83,6	6,931E-09	77,3	~7,831e-008	17,6

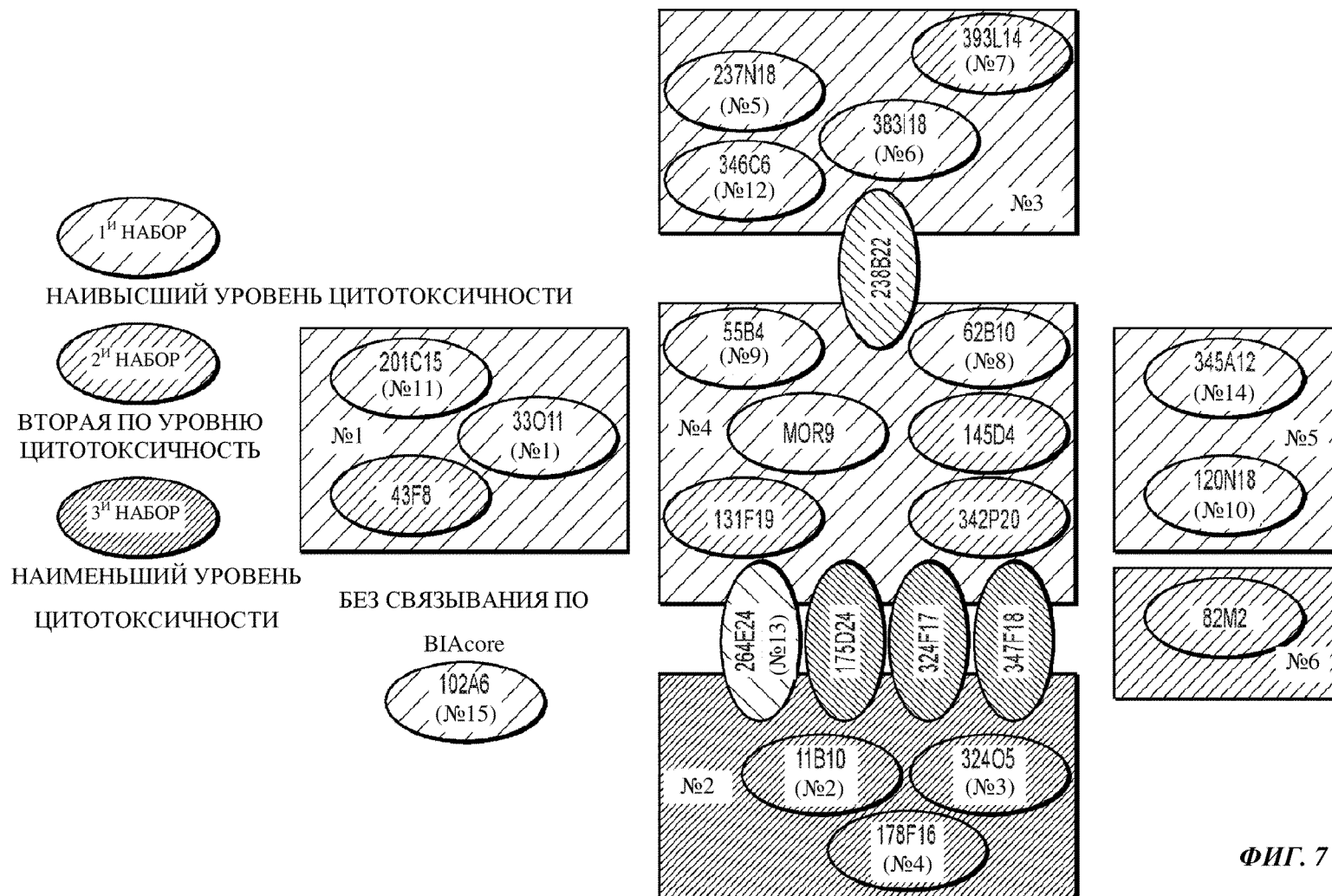
К ФИГ. 6,
ПРОД.

ФИГ. 6

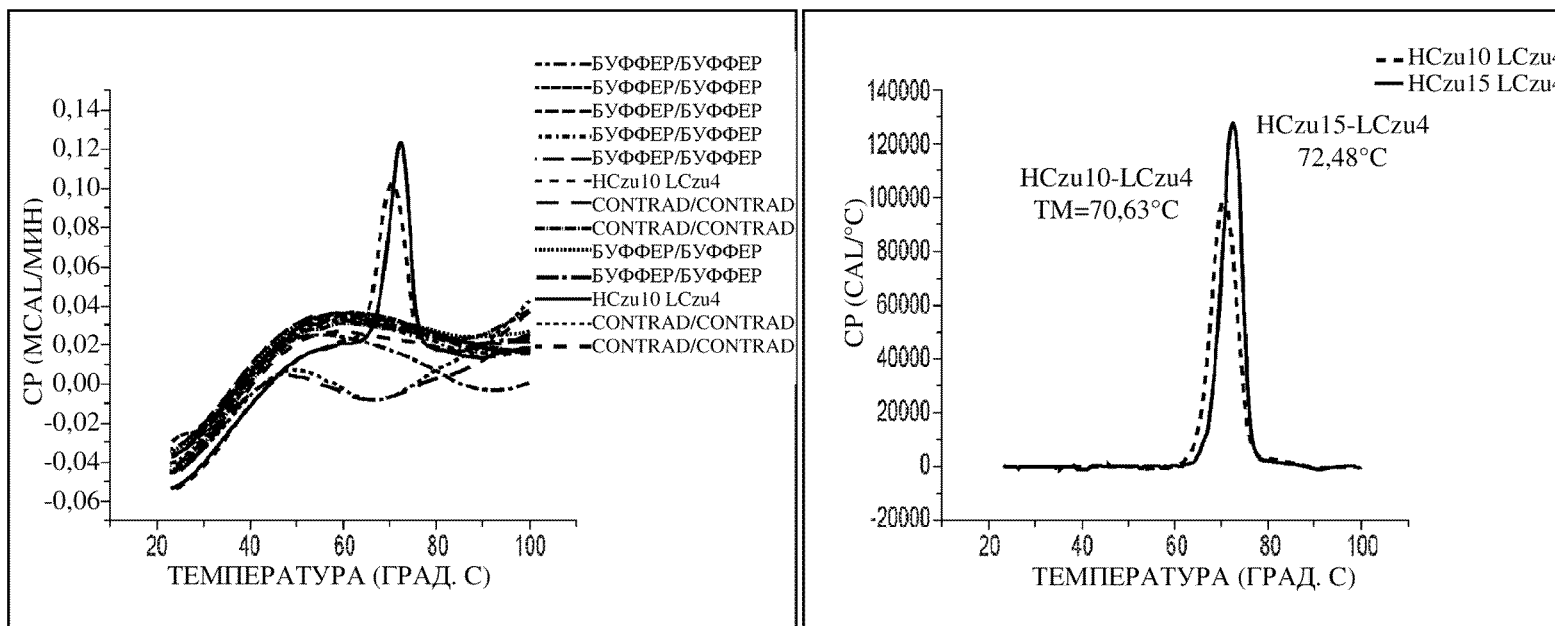
←
ОТ
ФИГ. 6

ФИГ. 6,
ПРОД.

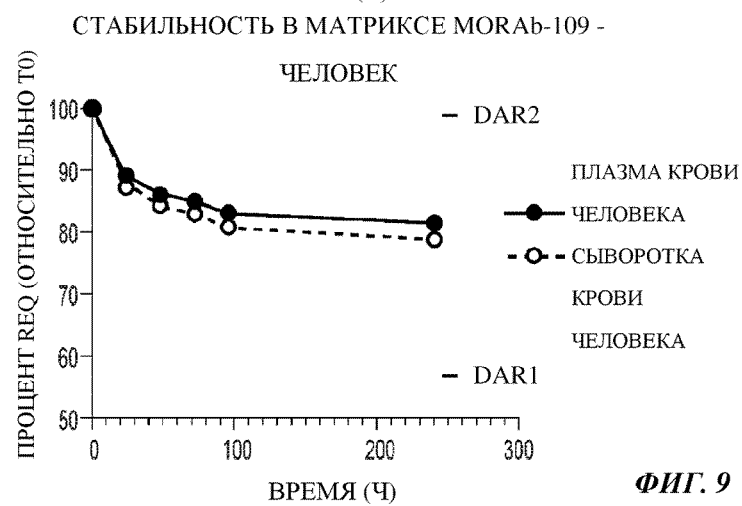
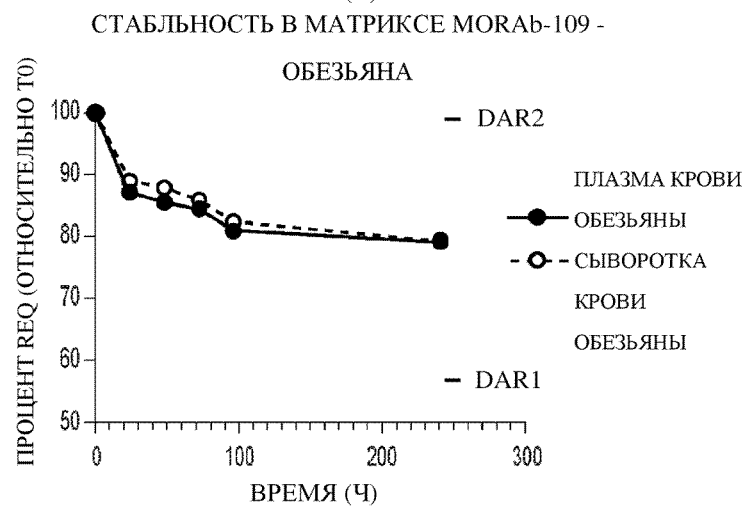
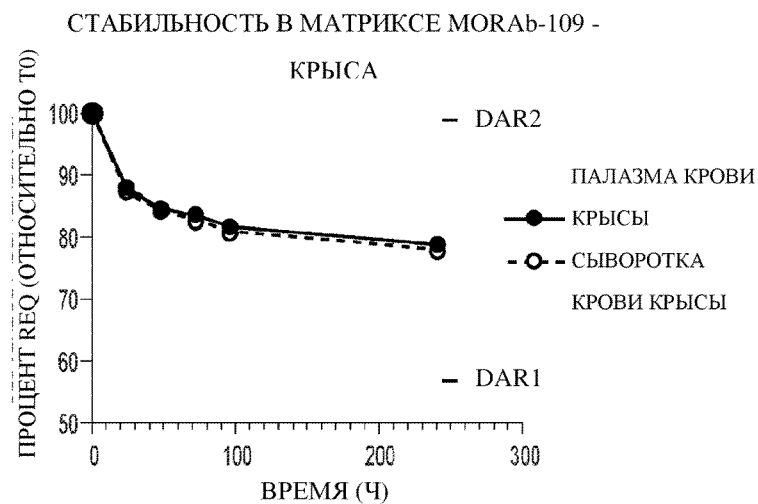
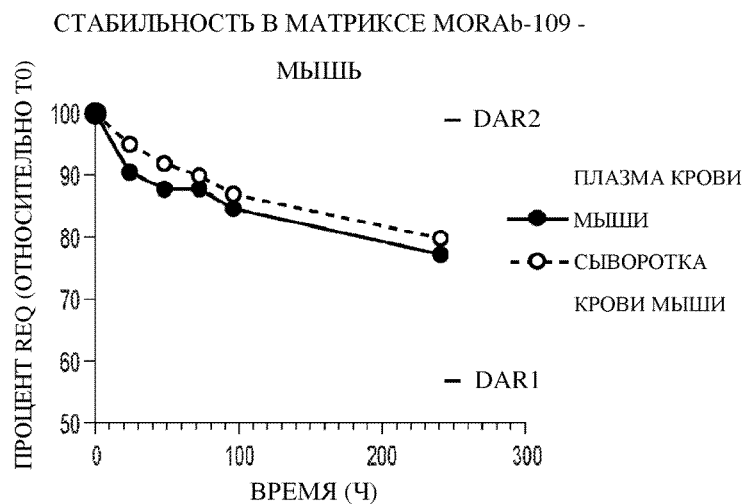
		OVCAR3		A431-K5		A431	
		EC50 (M)	МАКС. УНИЧТОЖЕНИЕ (%)	EC50 (M)	МАКС. УНИЧТОЖЕНИЕ (%)	EC50 (M)	МАКС. УНИЧТОЖЕНИЕ (%)
2012_308H21	B4	5,494E-09	84,2	~2,815e-008	61,5	~6,055e-008	14,2
2012_324F17	C4	8,997E-09	84,6	~2,467e-008	66,2	~2,356e-006	15,4
2012_345A12	D4	5,987E-09	87,3	1,468E-09	75,8	~8,451e-007	23,3
2012_346C6	E4	4,411E-09	86,2	6,677E-10	77,7	~1,085e-006	21,6
2012_347H14	F4	7,124E-09	88,3	1,869E-08	69,7	~6,063e-007	43,3
2012_360I17	G4	5,161E-09	89,7	3,78E-09	83,0	~5,143e-007	22,1
2012_390A13	H4	6,473E-09	87,5	2,004E-09	81,6	~5,892e-007	20,6
2012_28O4	A5	3,674E-09	85,3	4,534E-09	83,2	~6,230e-007	23,4
2012_43F8	B5	4,015E-09	85,7	1,076E-09	79,7	~2,064e-006	17,8
2012_82N2	C5	3,307E-09	80,8	8,358E-09	81,6	~1,550e-006	27,4
2012_92N19	D5	3,977E-10	89,6	4,74E-09	82,1	~3,785e-008	26,3
2012_97N24	E5	2,382E-09	88,3	1,215E-08	83,1	~3,773e-007	55,2
2012_161O23	F5	4,007E-09	87,5	3,466E-09	82,5	~3,762e-007	20,3
2012_102A6	G5	9,218E-11	89,5	4,243E-10	86,1	~6,315e-007	45,8
2012_120N18	H5	2,369E-09	86,6	6,946E-10	83,1	~1,582e-006	42,8
2012_112D7	A6	2,601E-09	89,2	~2,380e-008	74,1	~3,334e-008	21,4
2012_201C15	B6	3,515E-09	72,8	7,284E-10	80,3	~3,850e-007	23,4
2012_238B22	C6	4,599E-09	87,5	1,292E-09	82,6	~4,032e-008	22,6
2012_250P7	D6	1,086E-09	89,2	1,336E-08	73,0	~4,885e-007	20,8
2012_246F14	E6	3,866E-09	87,9	2,296E-09	78,6	~8,035e-007	32,7
2012_262H11	F6	1,89E-09	92,2	3,288E-09	86,2	~3,765e-008	33,2
2012_264E24	G6	3,782E-09	90,3	1,75E-10	83,0	~8,320e-008	39,0
2012_342P20	H6	1,232E-09	91,3	7,018E-10	83,0	~8,206e-008	25,0
	#1	~1s529e+010	51,1	2,355E-10	78,9	~6,380e-008	34,0
	#2	~0s0009022	45,2	~3,878e-006	43,2	~2,823e-007	50,1



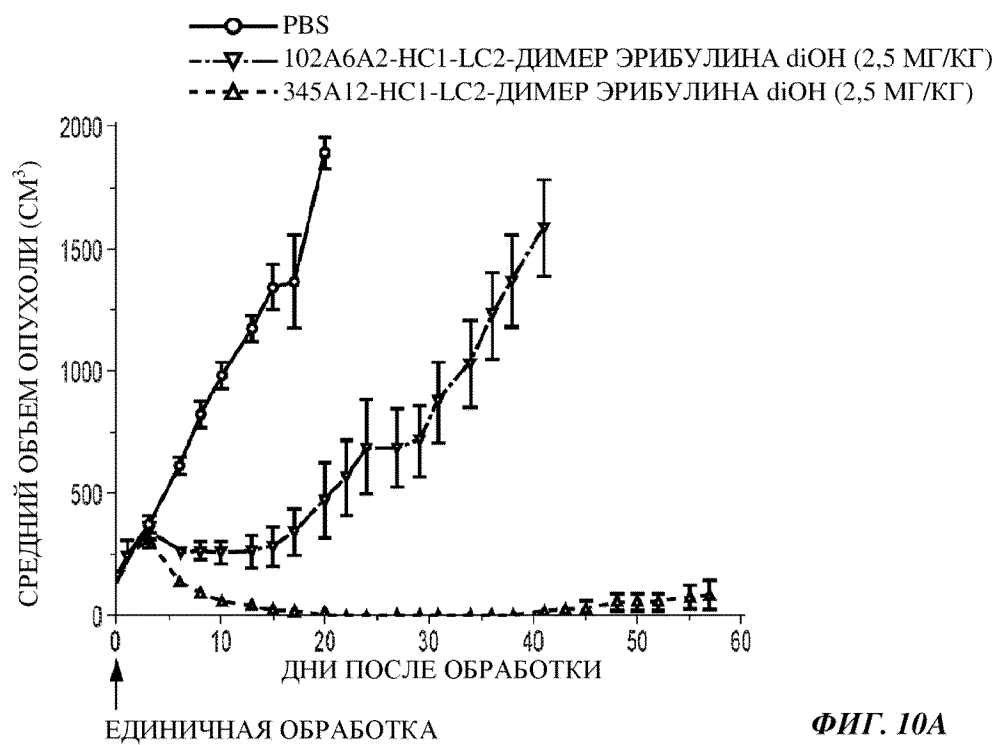
ФИГ. 7



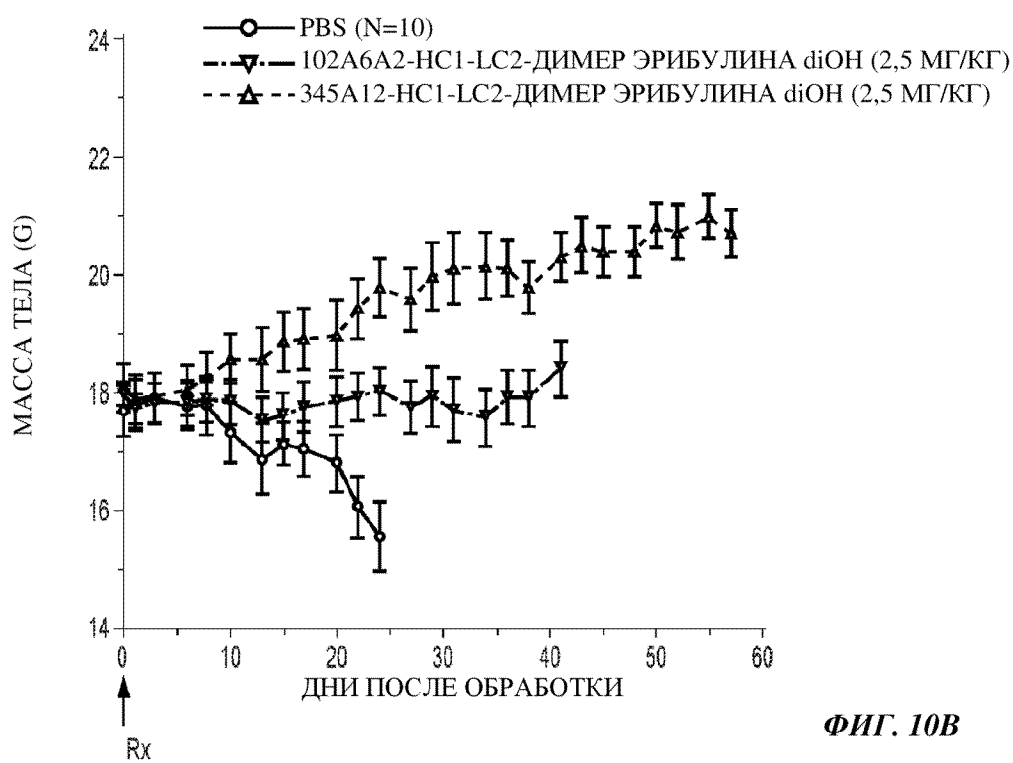
ФИГ. 8



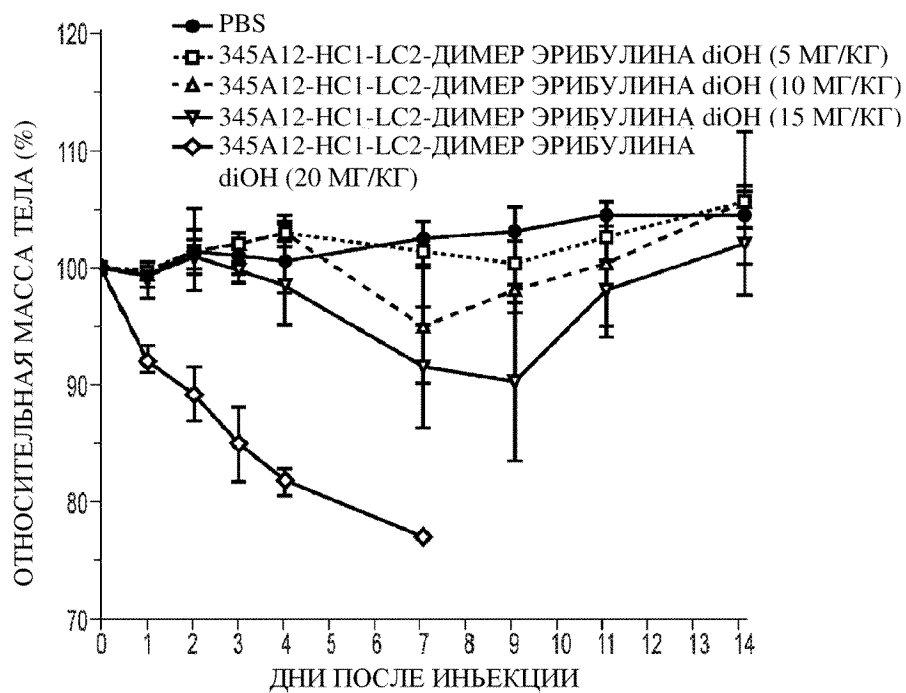
ФИГ. 9



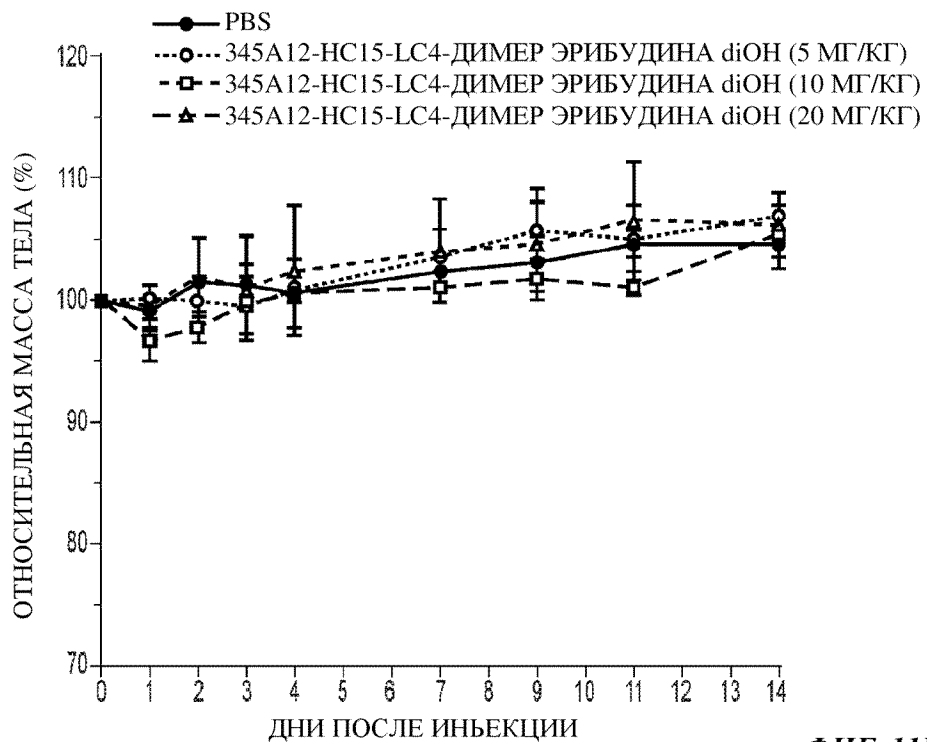
ФИГ. 10А



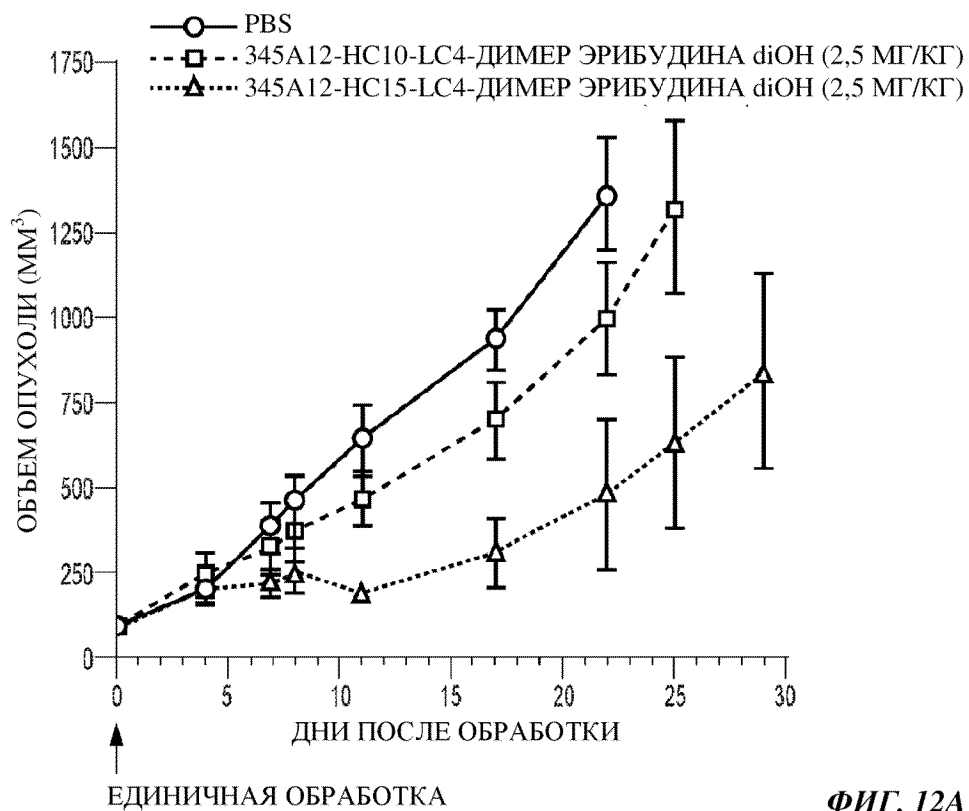
ФИГ. 10В



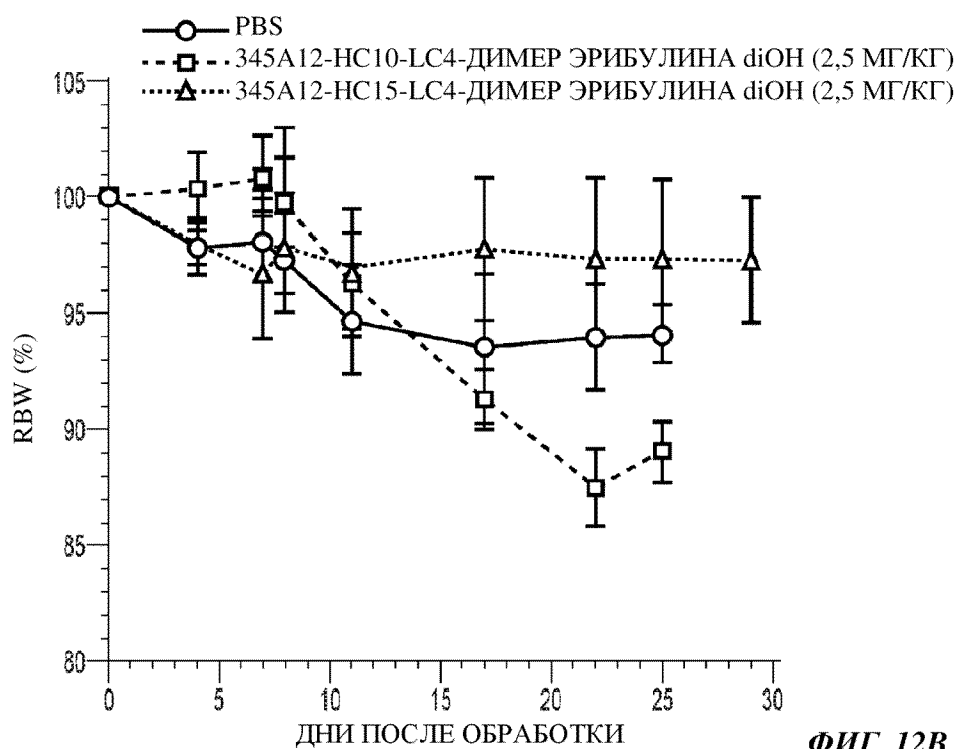
ФИГ. 11А



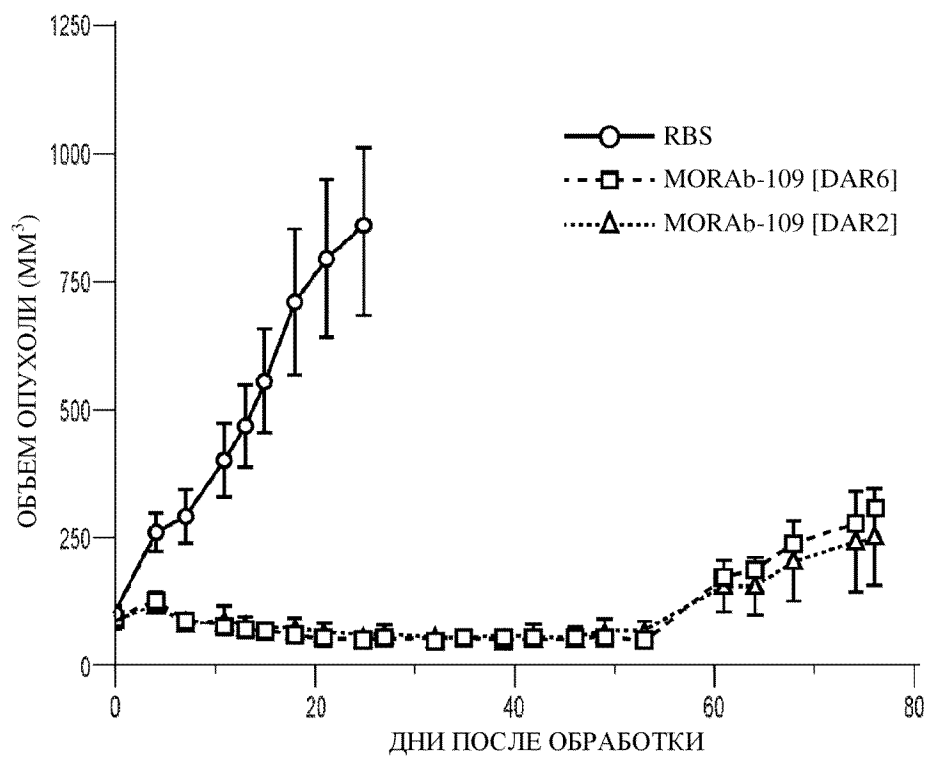
ФИГ. 11В



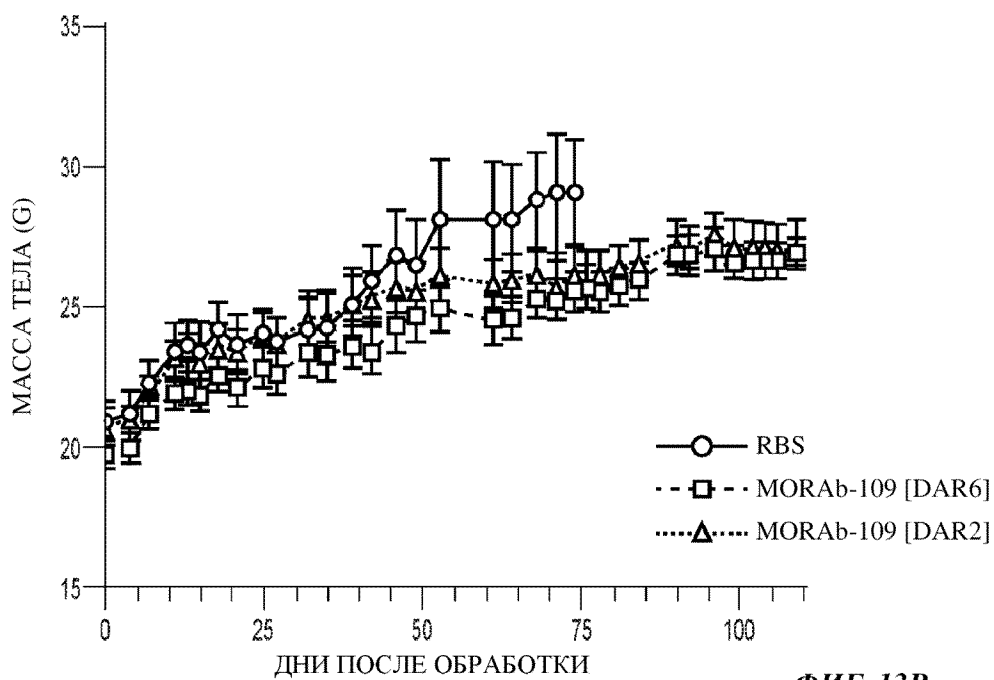
ФИГ. 12А



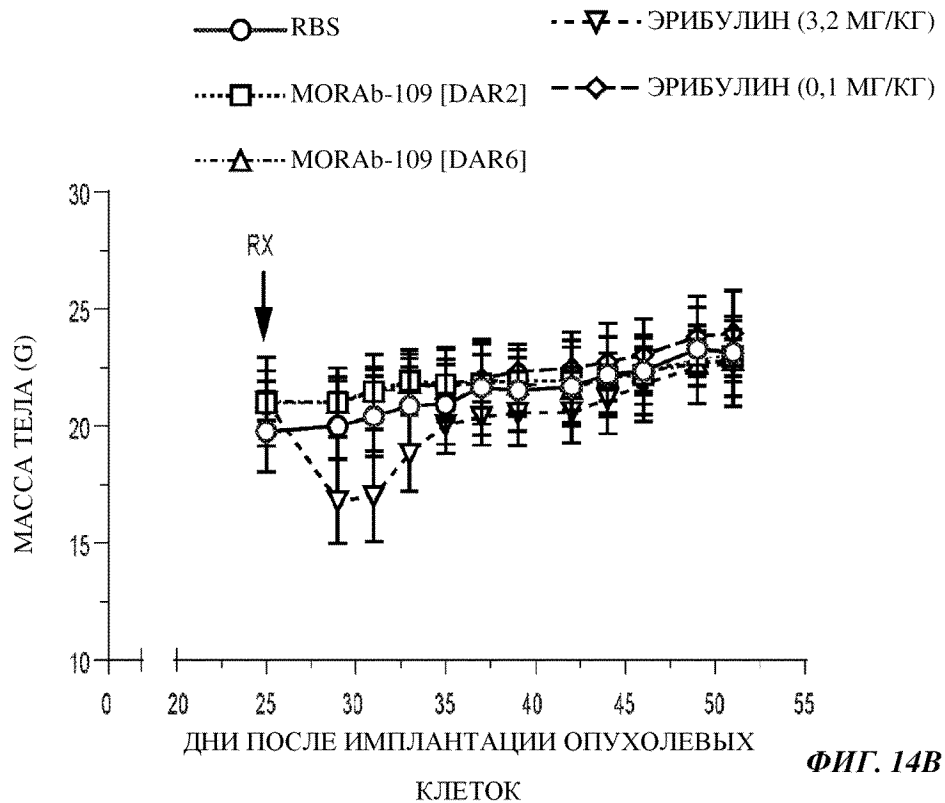
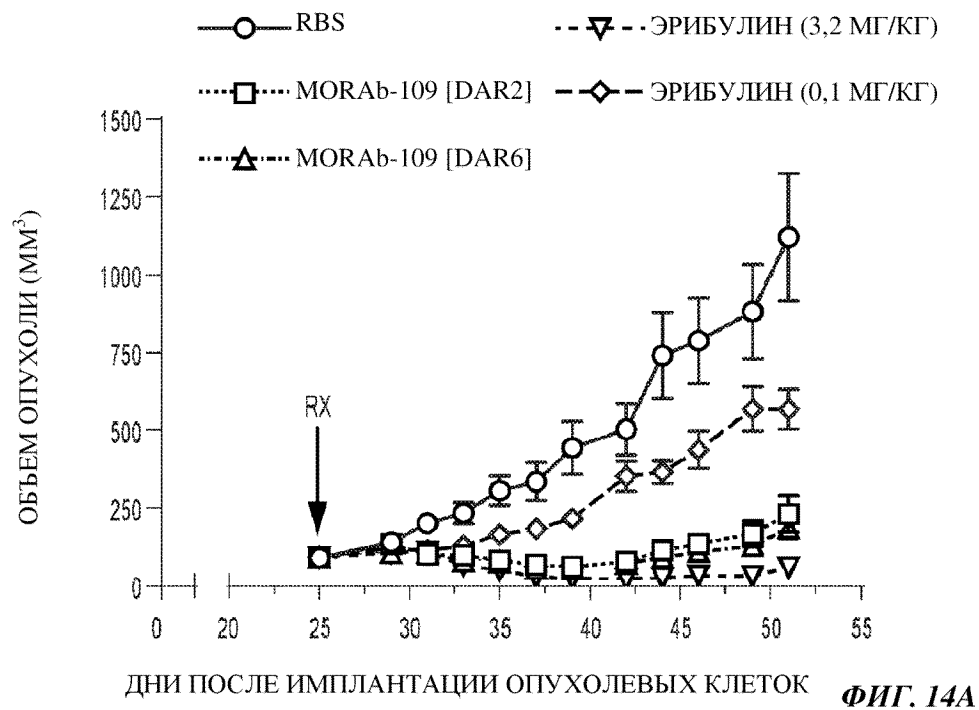
ФИГ. 12В

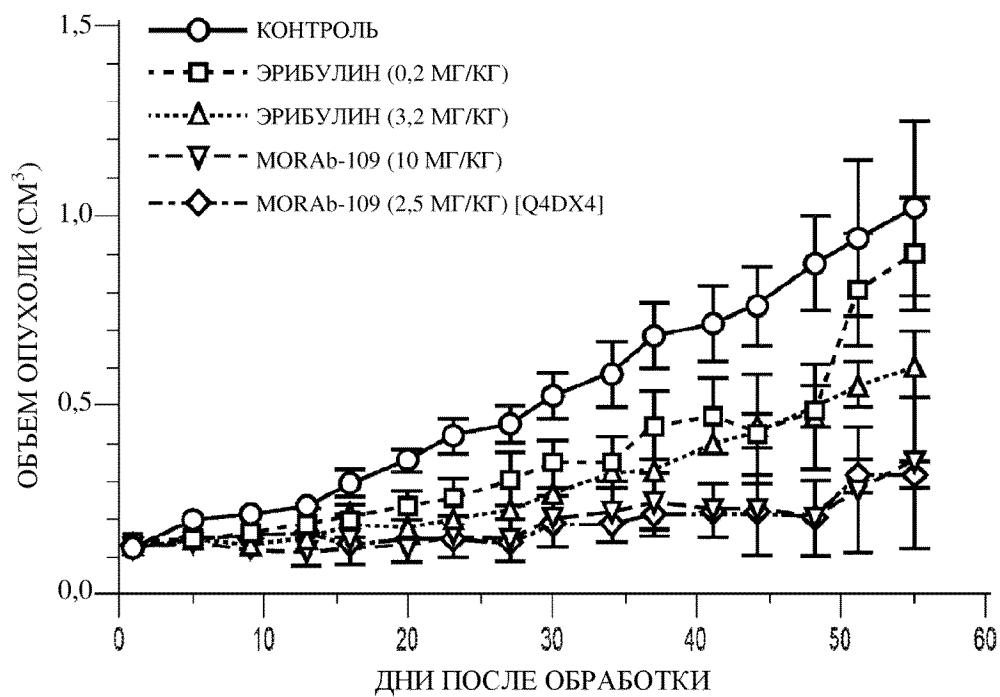


ФИГ. 13А

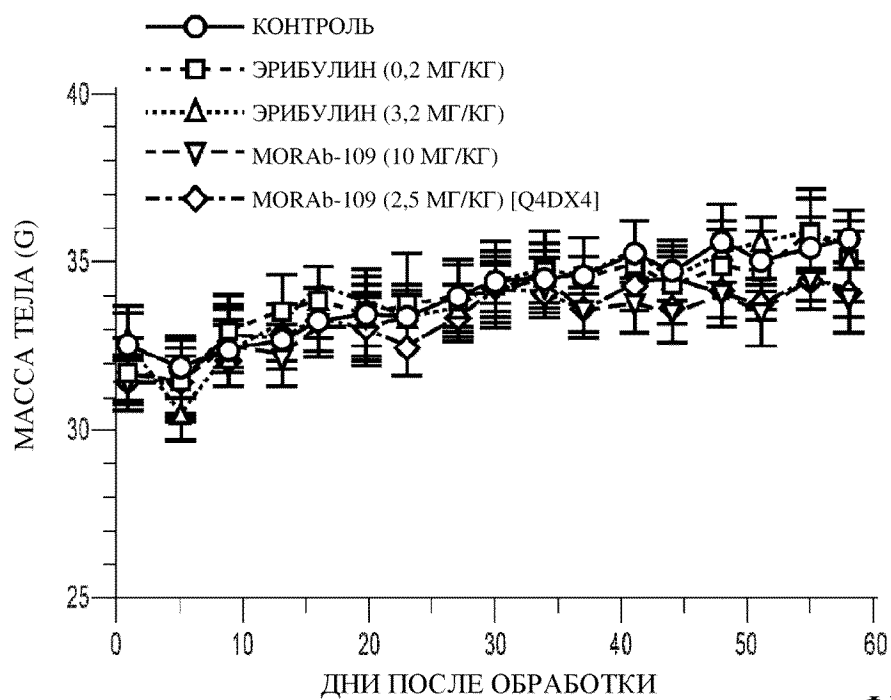


ФИГ. 13В

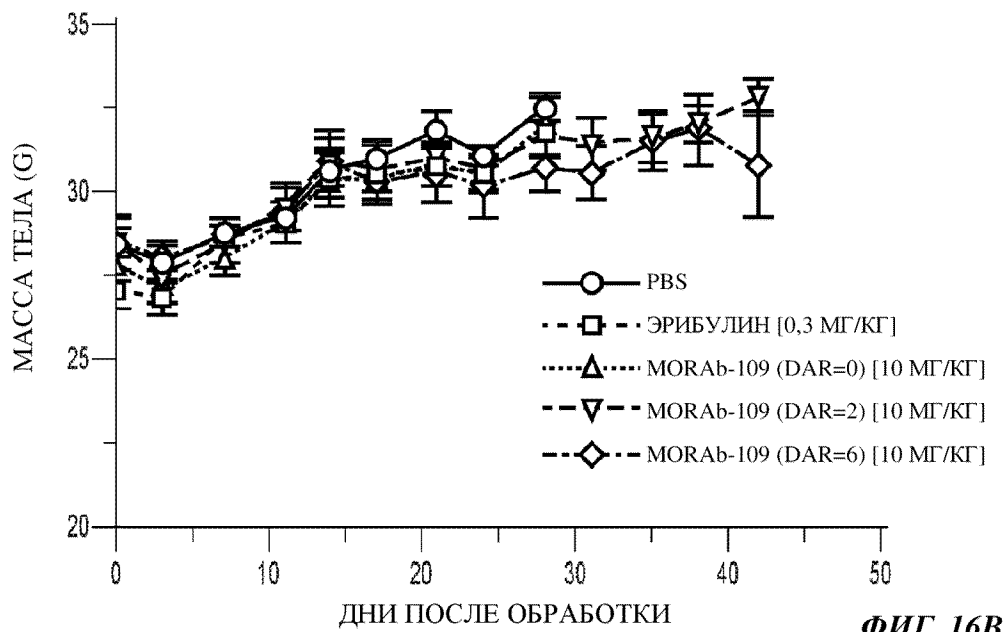
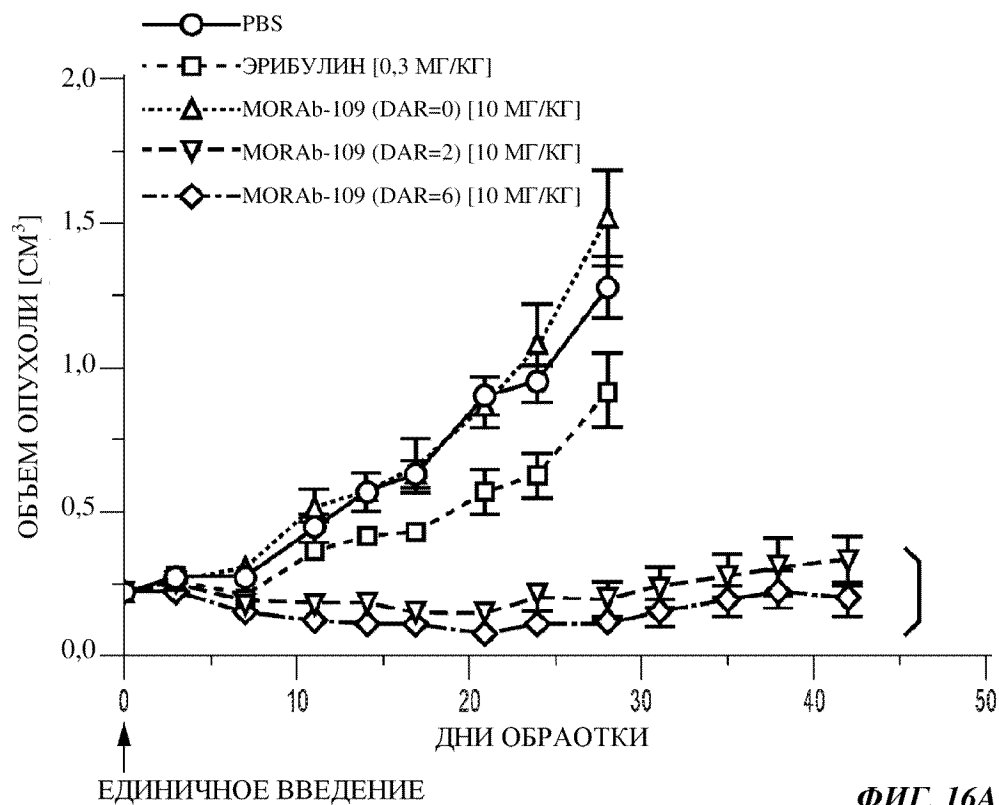


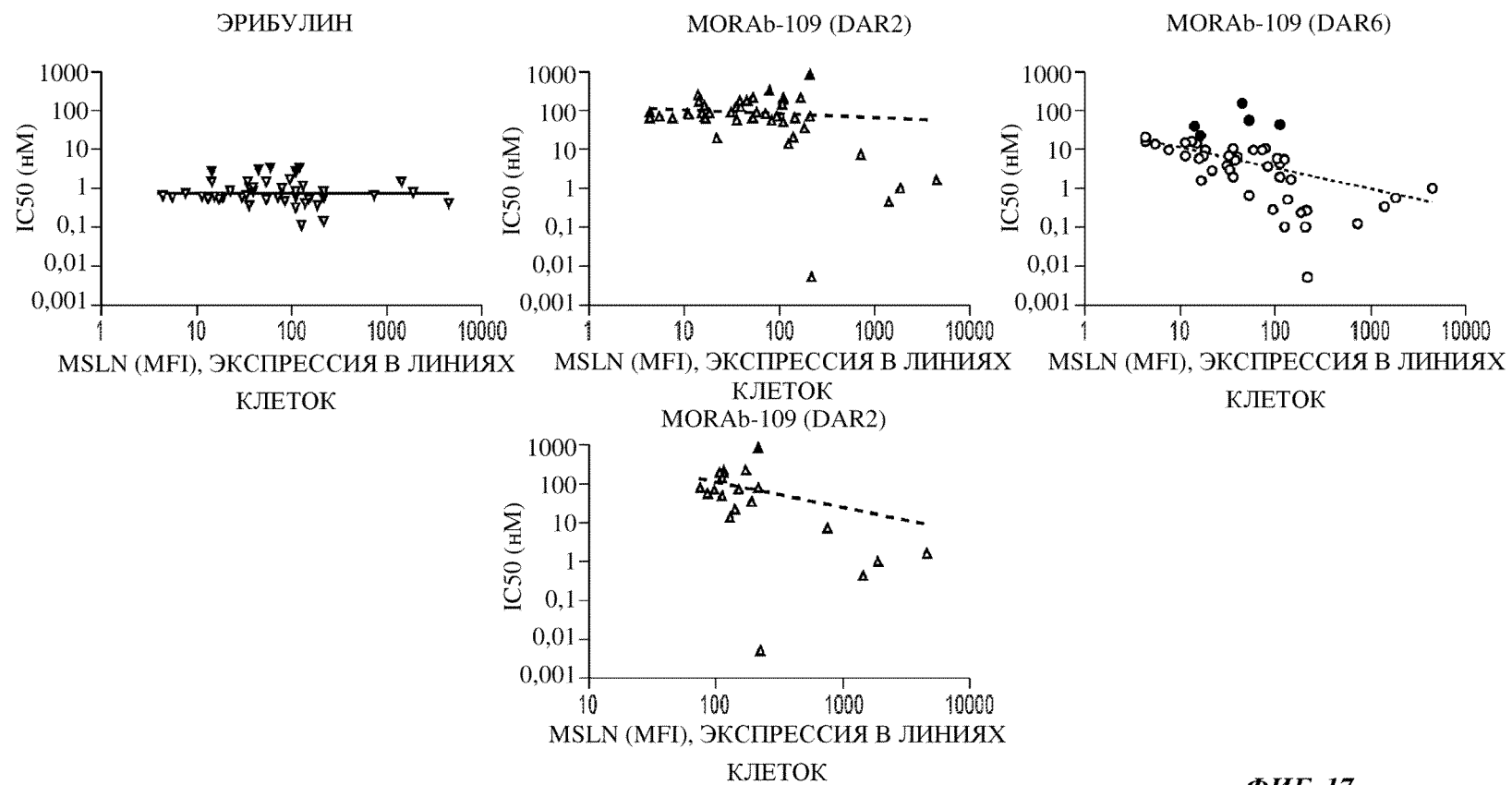


ФИГ. 15А

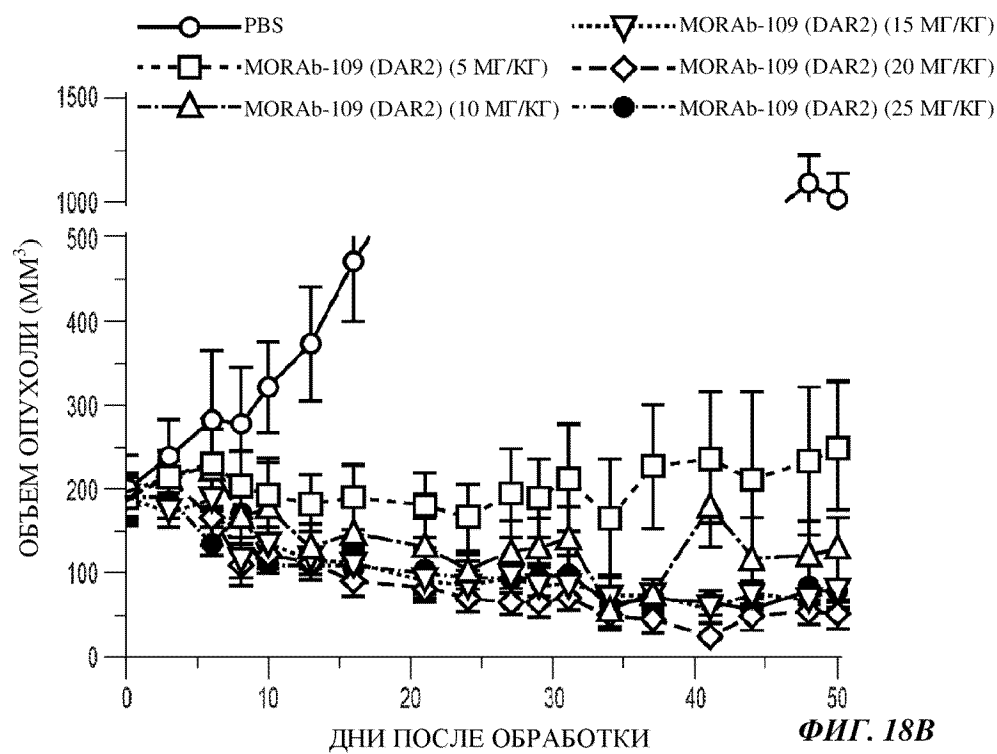
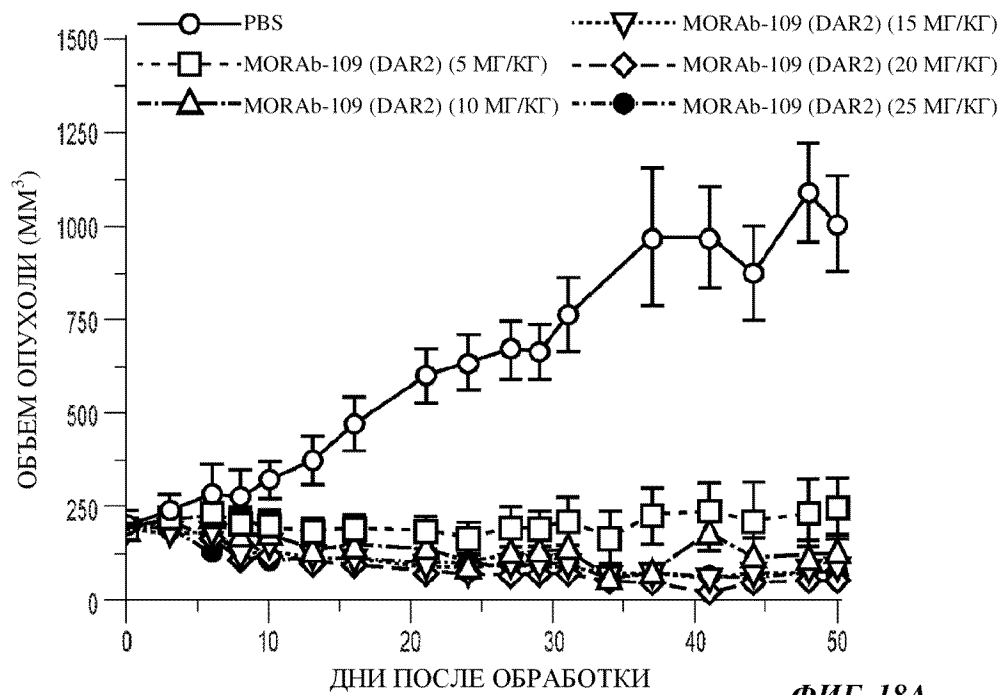


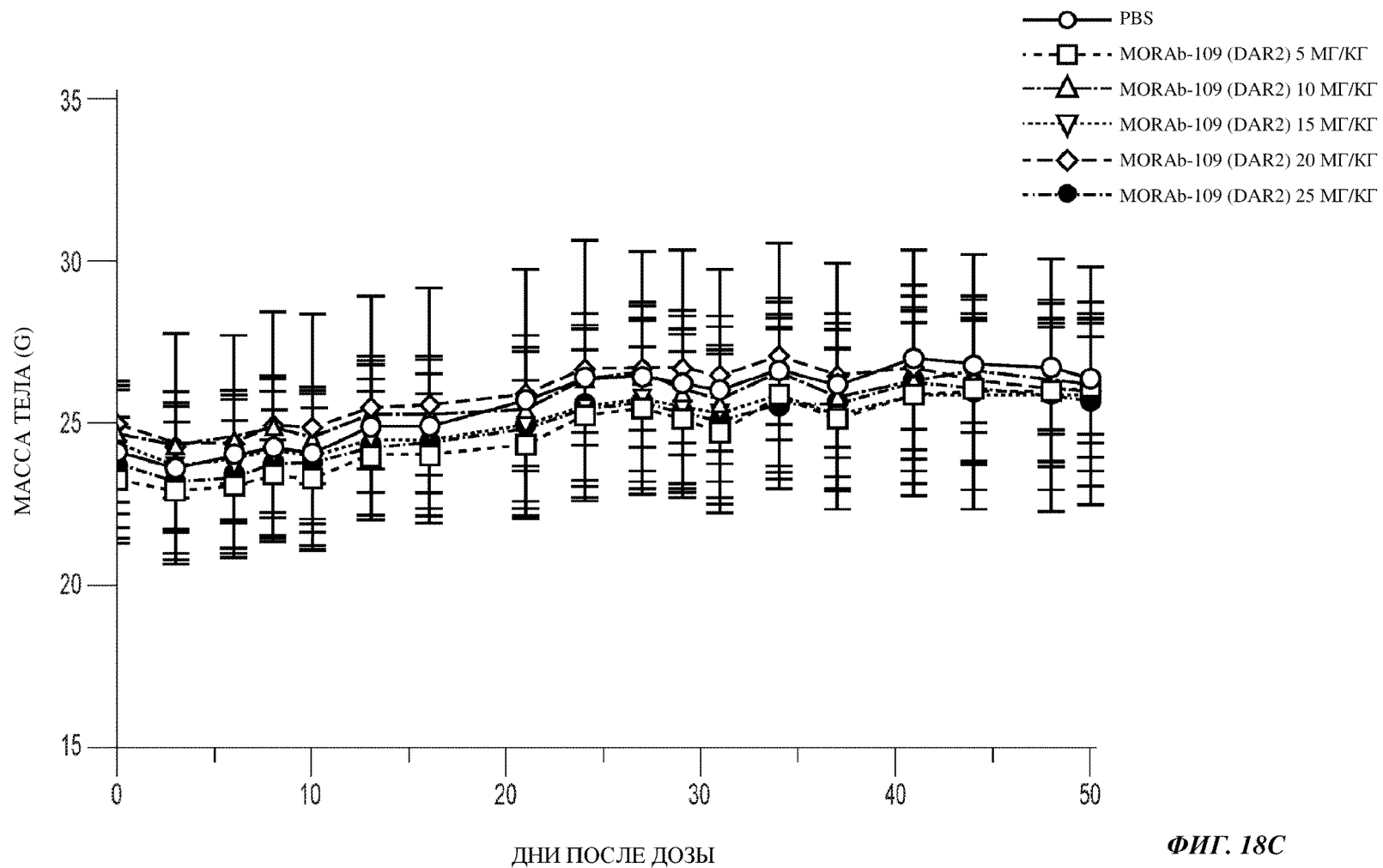
ФИГ. 15В



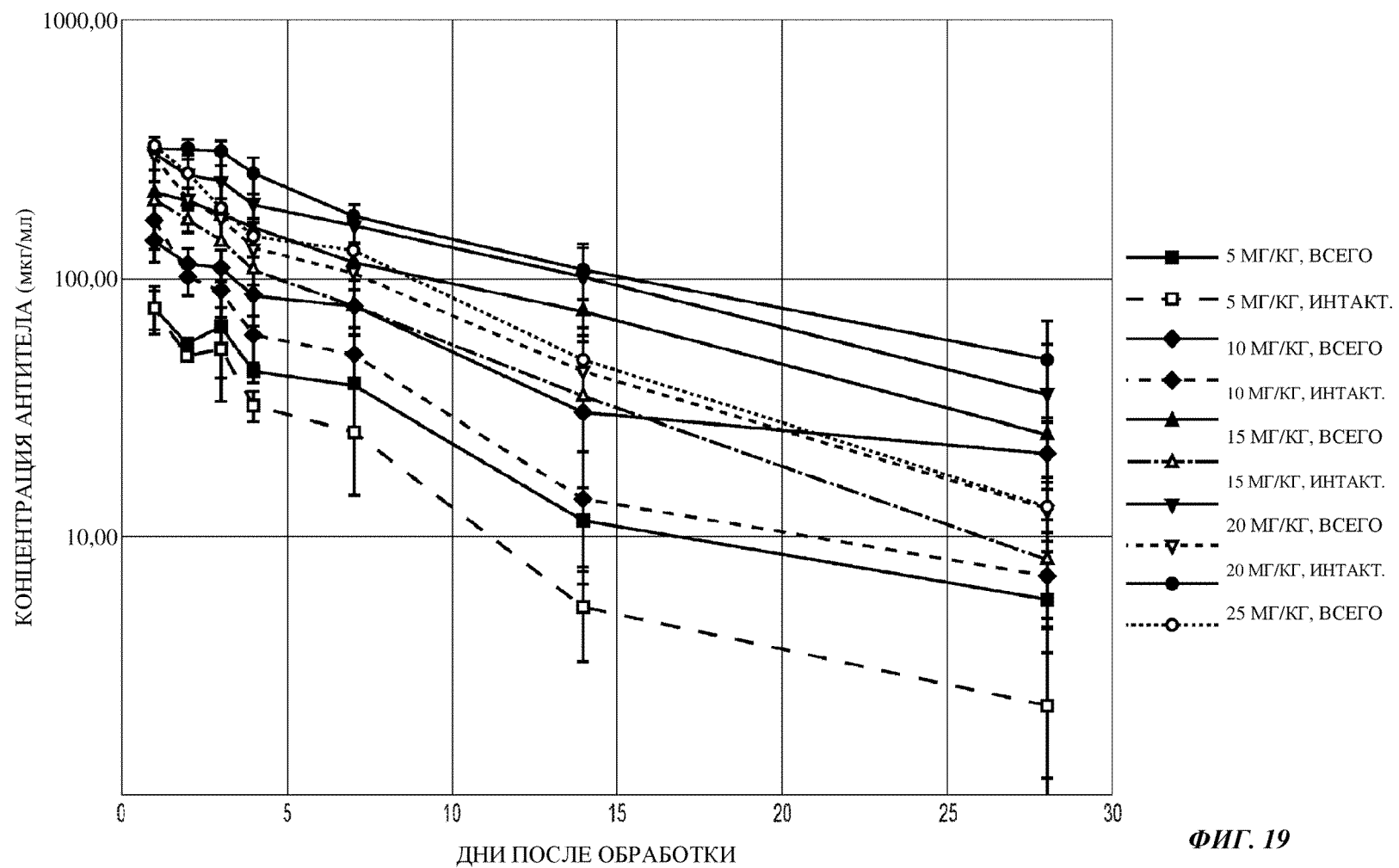


ФИГ. 17

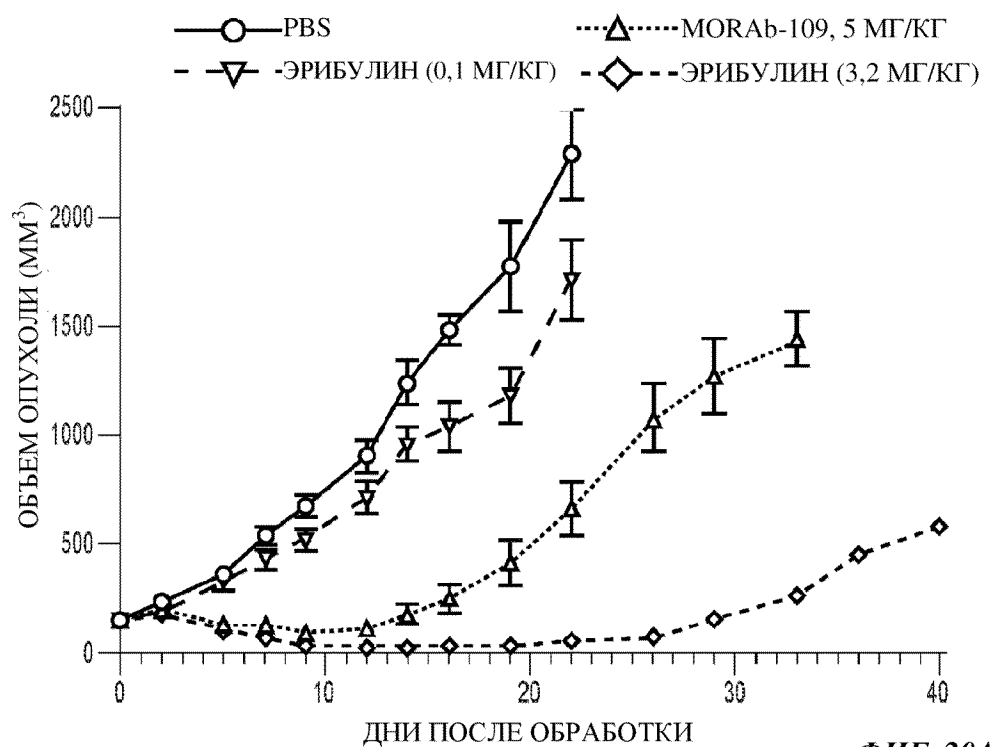




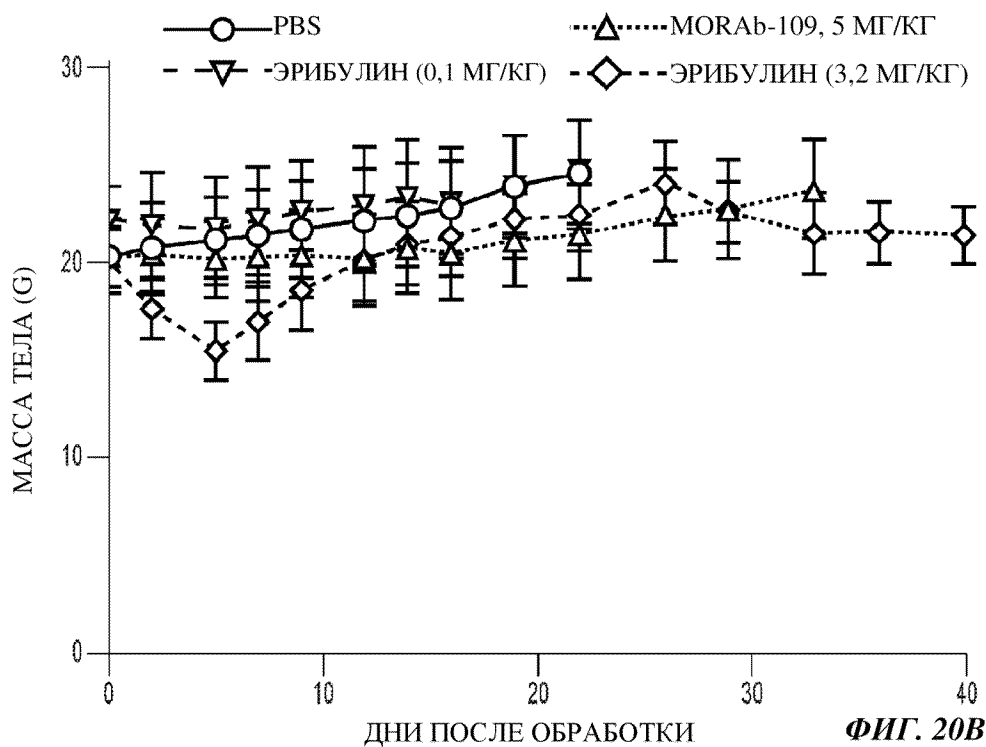
ФИГ. 18С



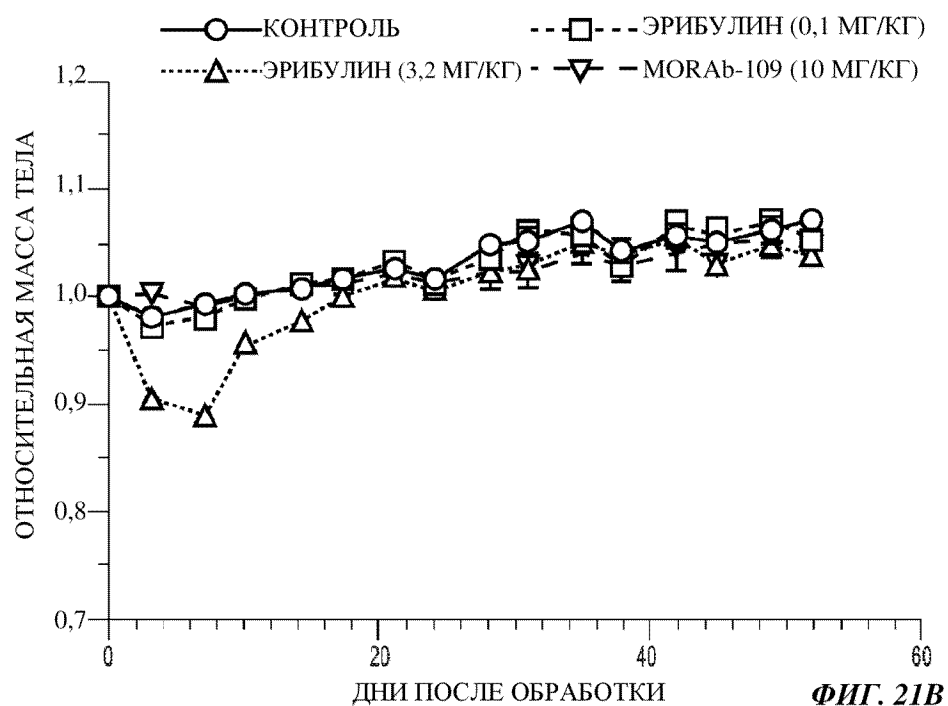
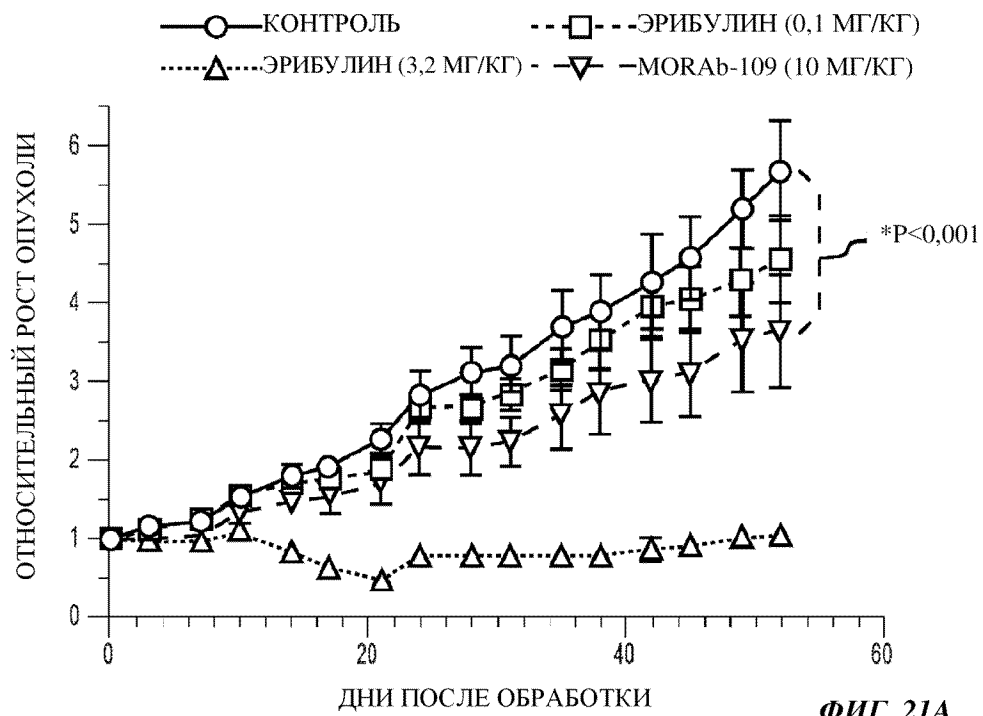
ФИГ. 19

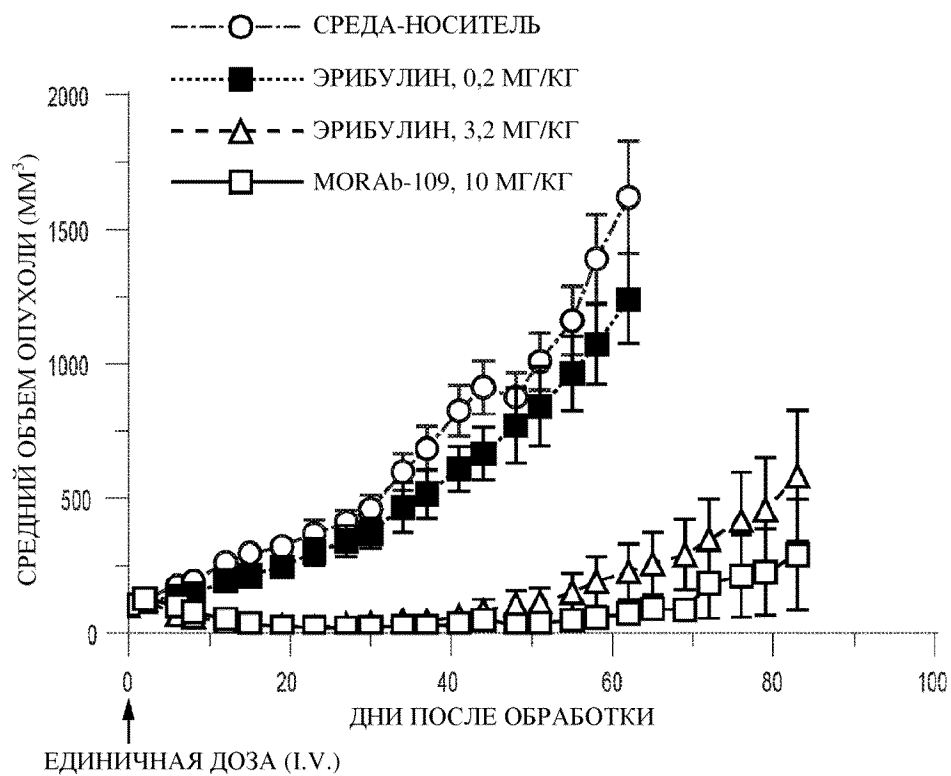


ФИГ. 20А

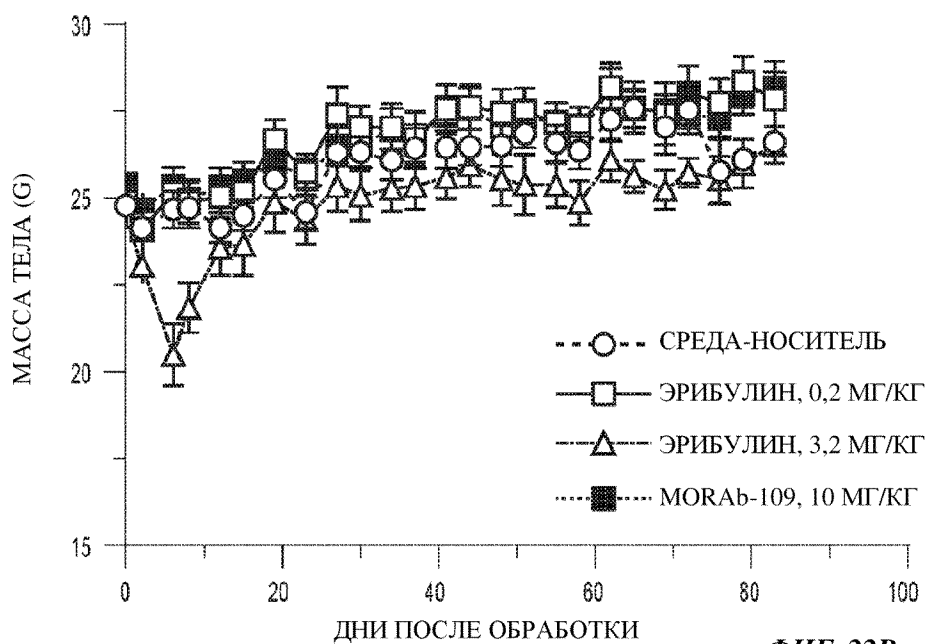


ФИГ. 20В



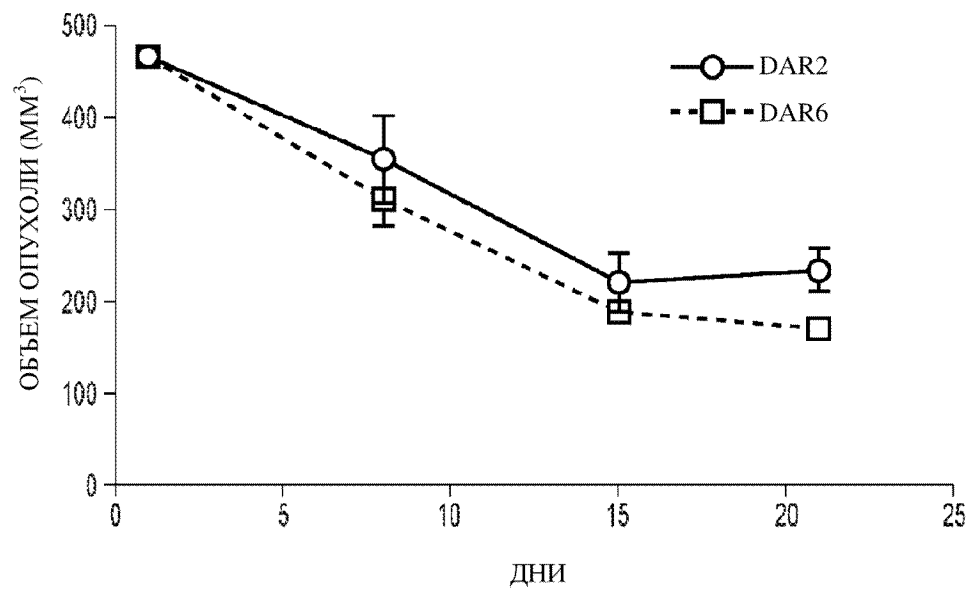


ФИГ. 22А

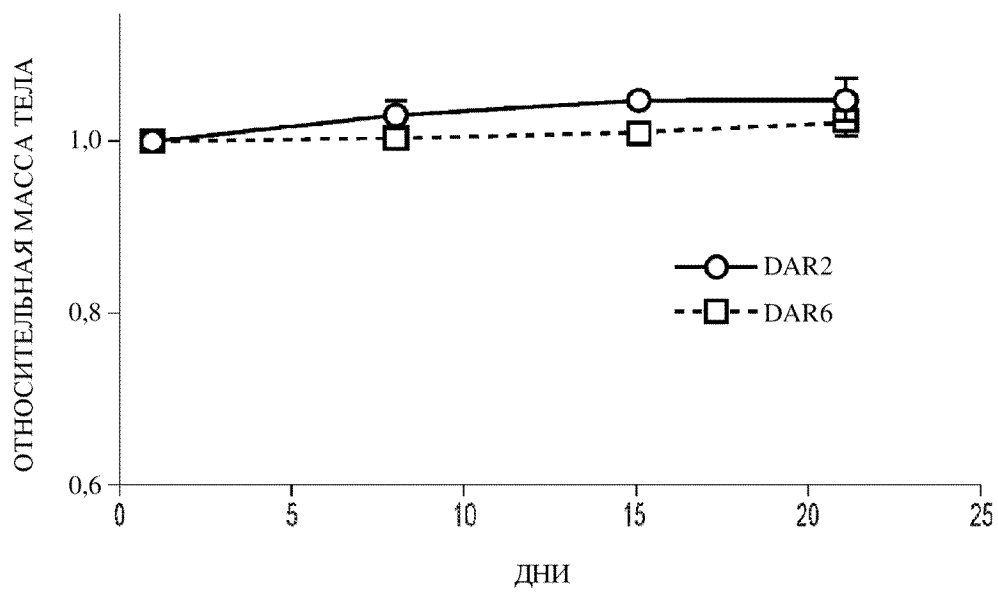


ФИГ. 22В

25/34

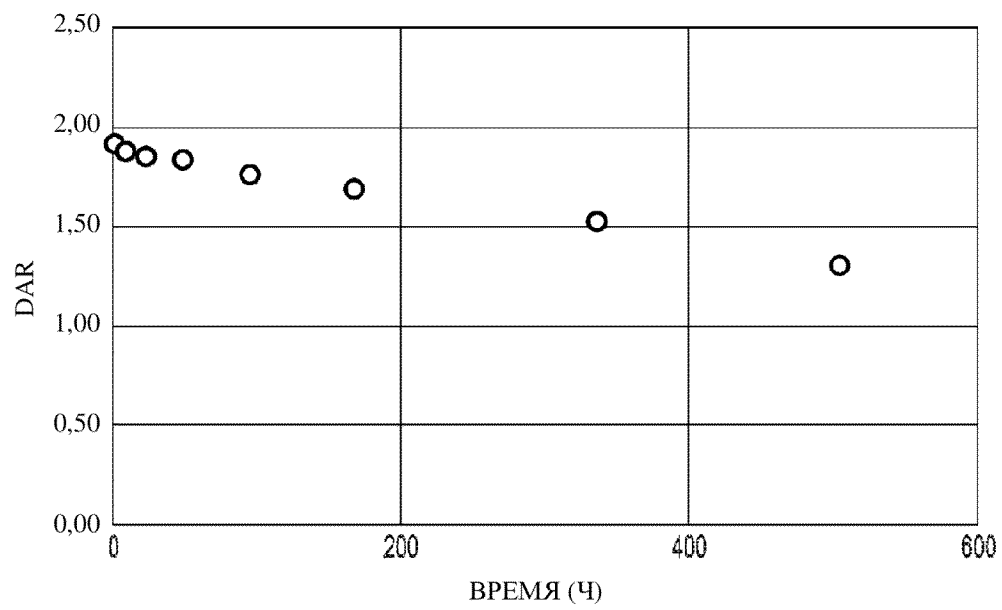


ФИГ. 23А

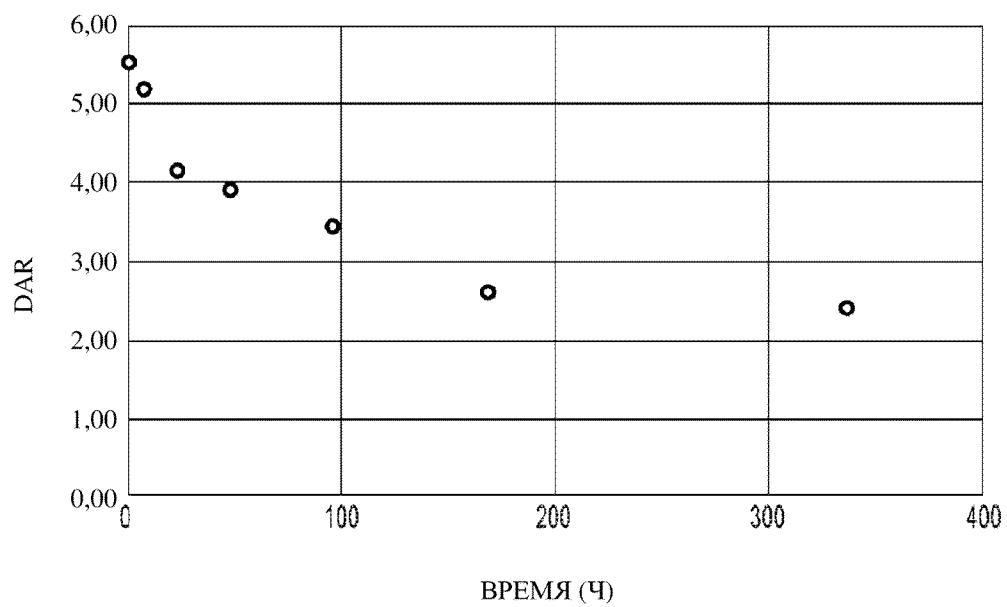


ФИГ. 23В

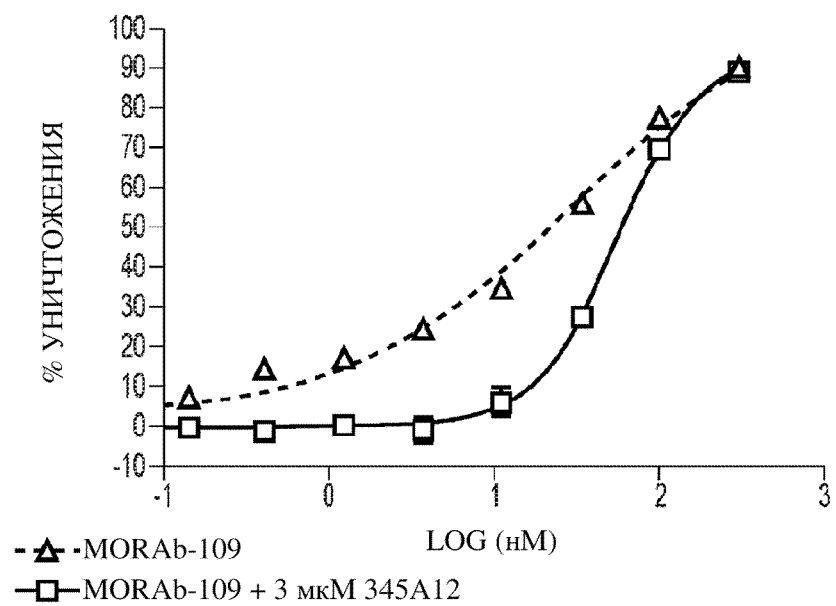
26/34



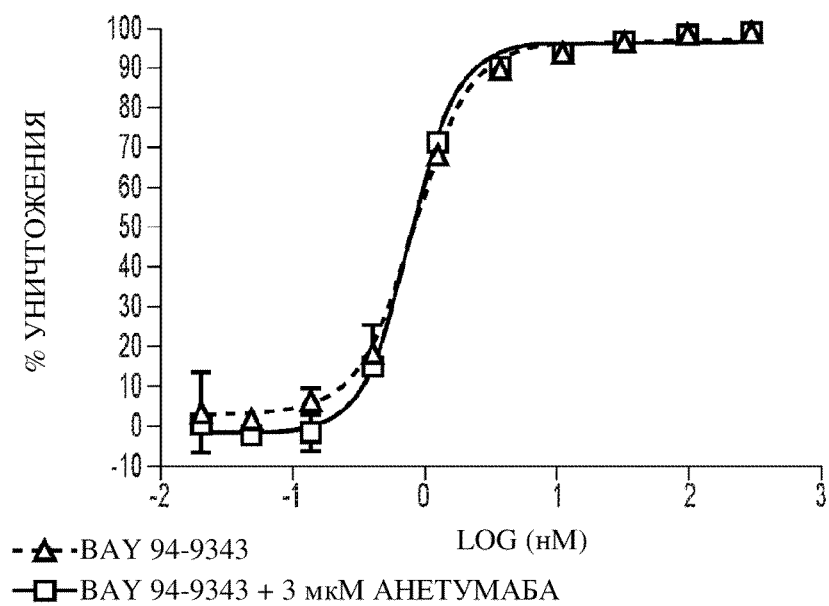
ФИГ. 24А



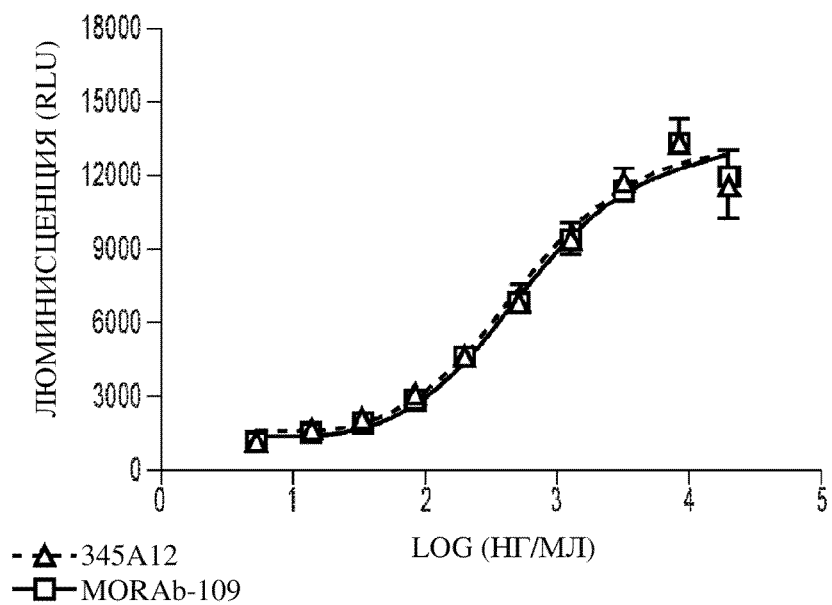
ФИГ. 24В



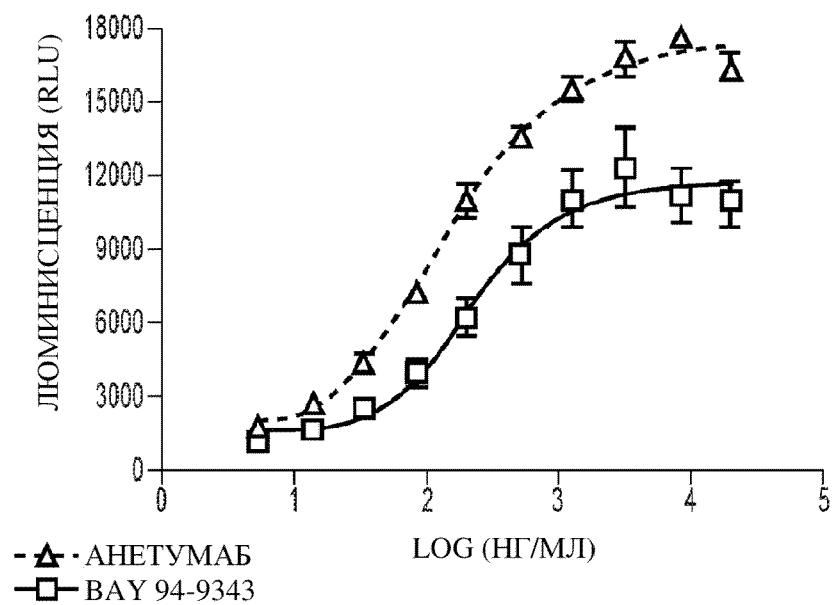
ФИГ. 25A



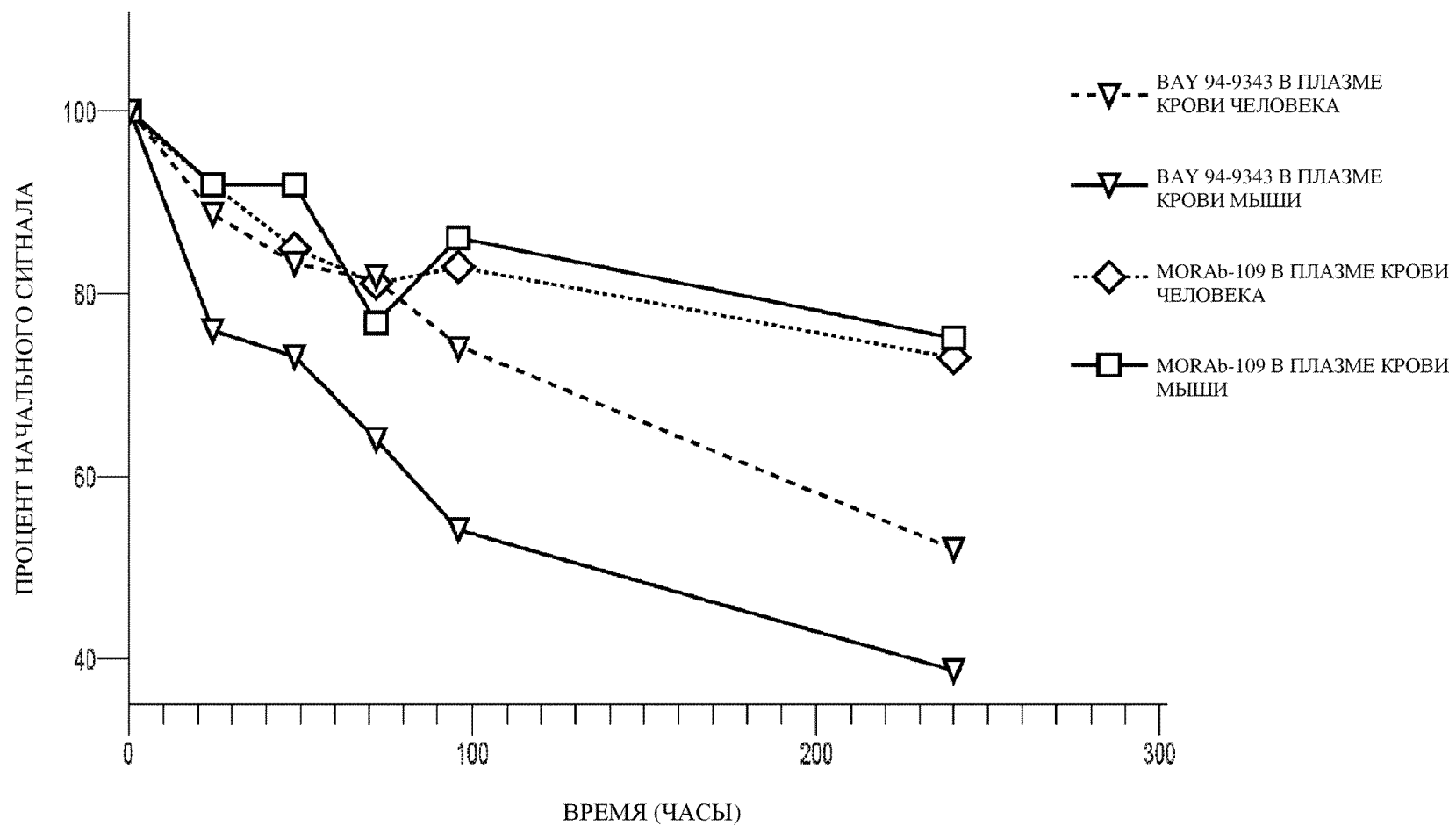
ФИГ. 25B



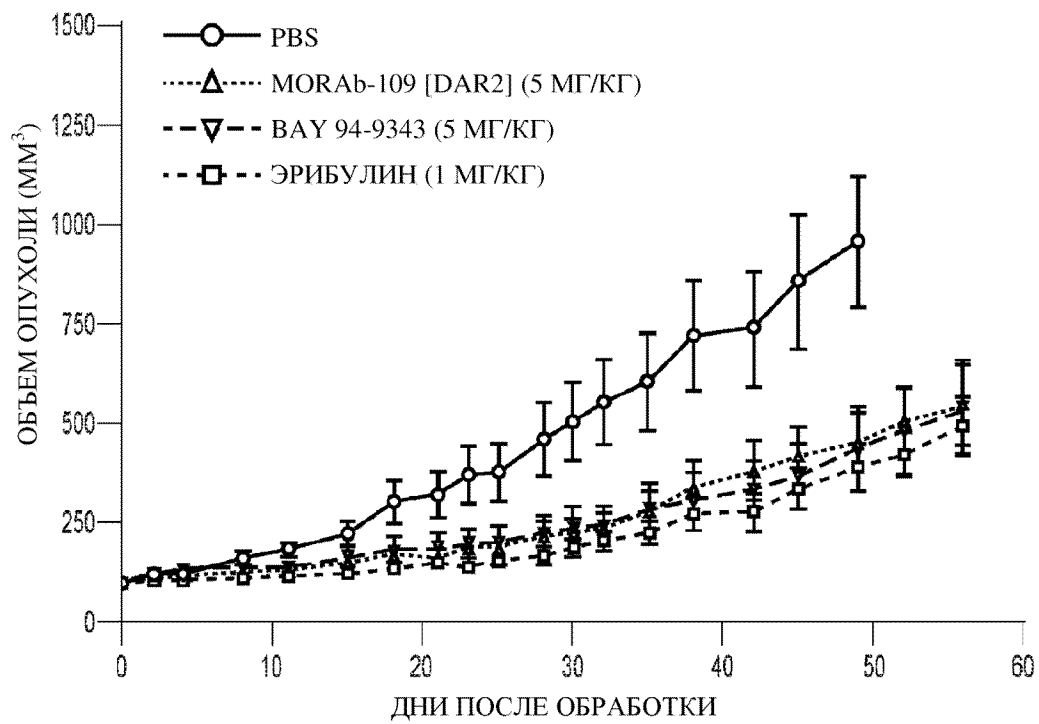
ФИГ. 26А



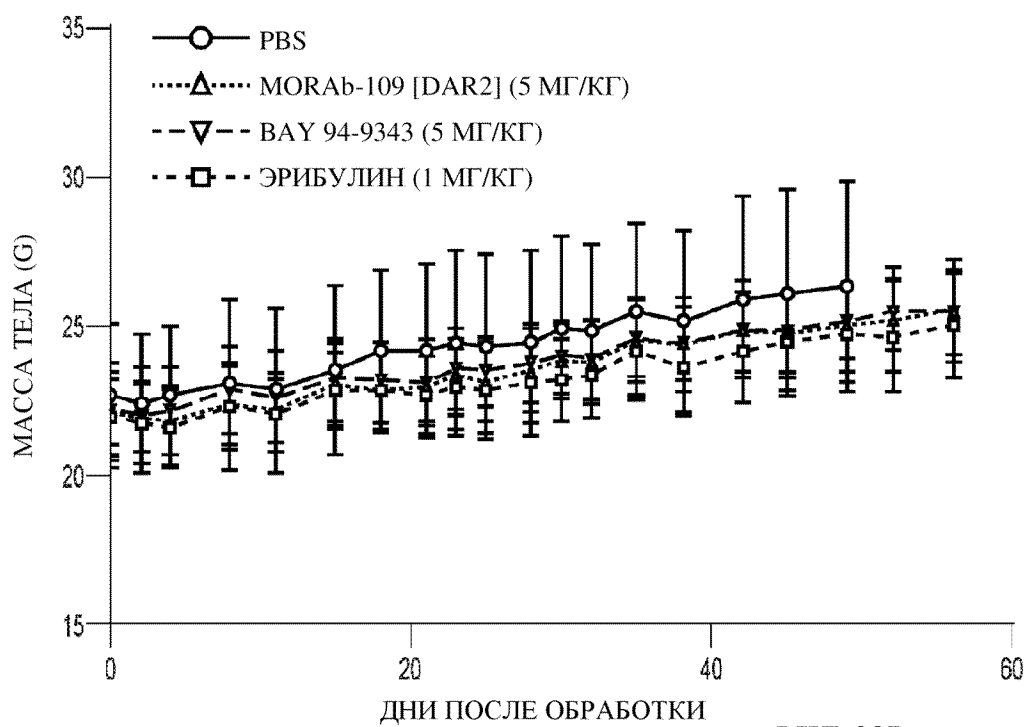
ФИГ. 26В



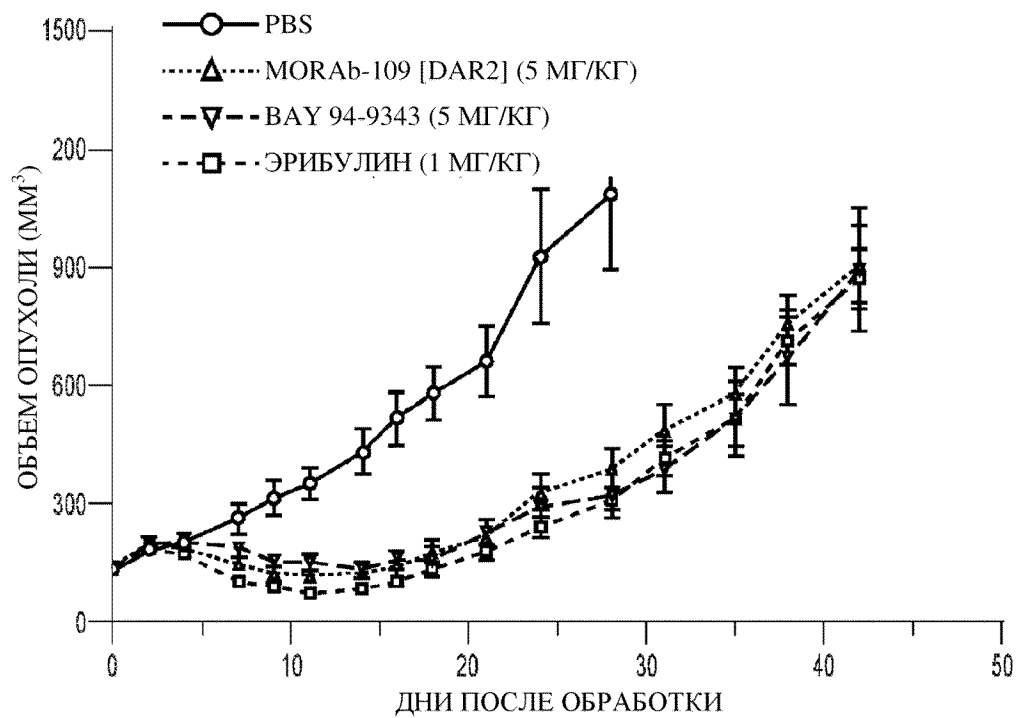
ФИГ. 27



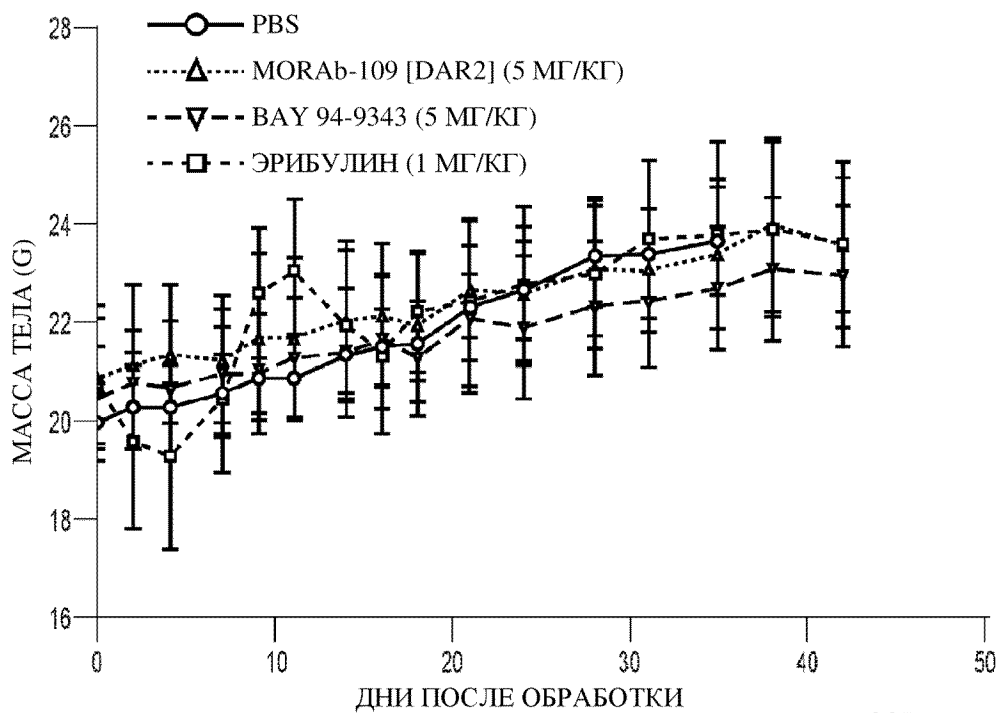
ФИГ. 28А



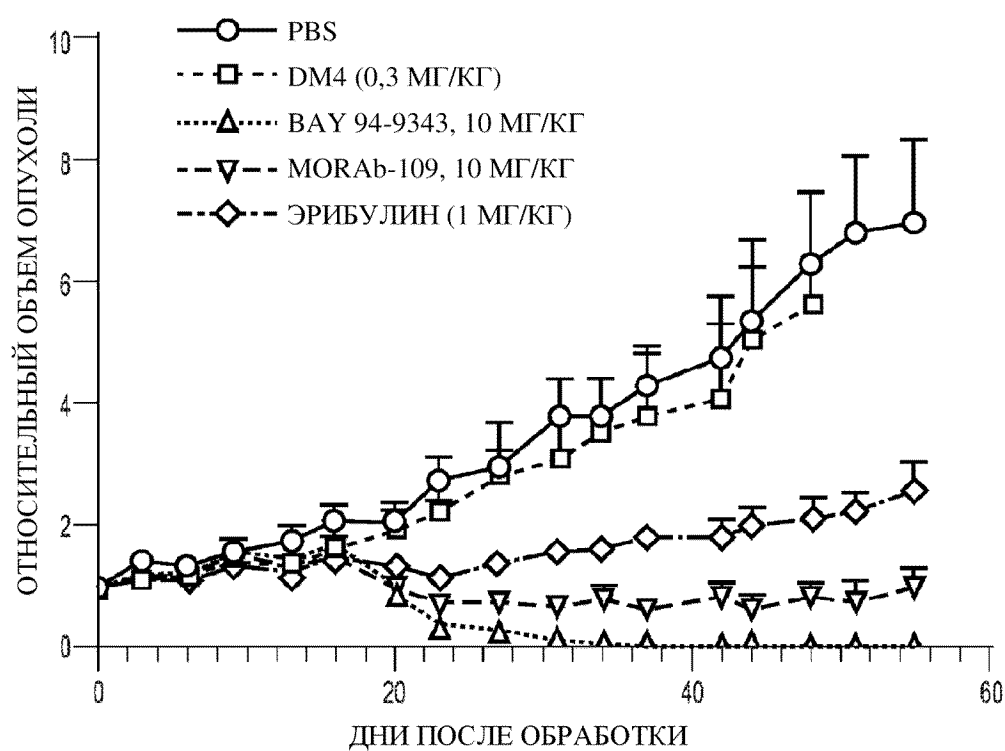
ФИГ. 28В



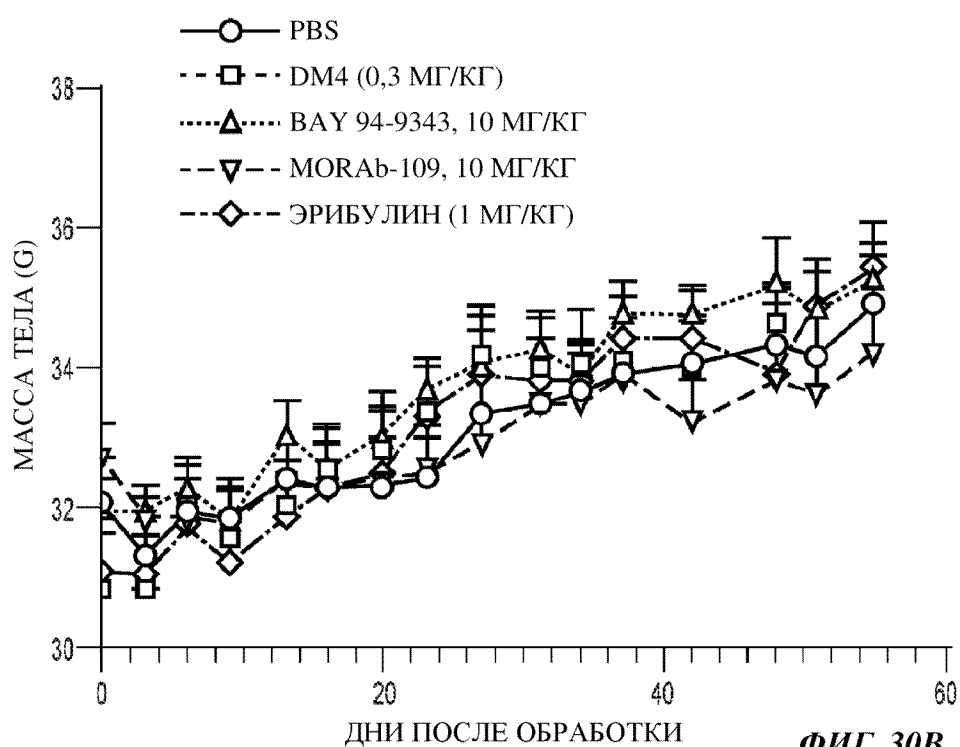
ФИГ. 29А



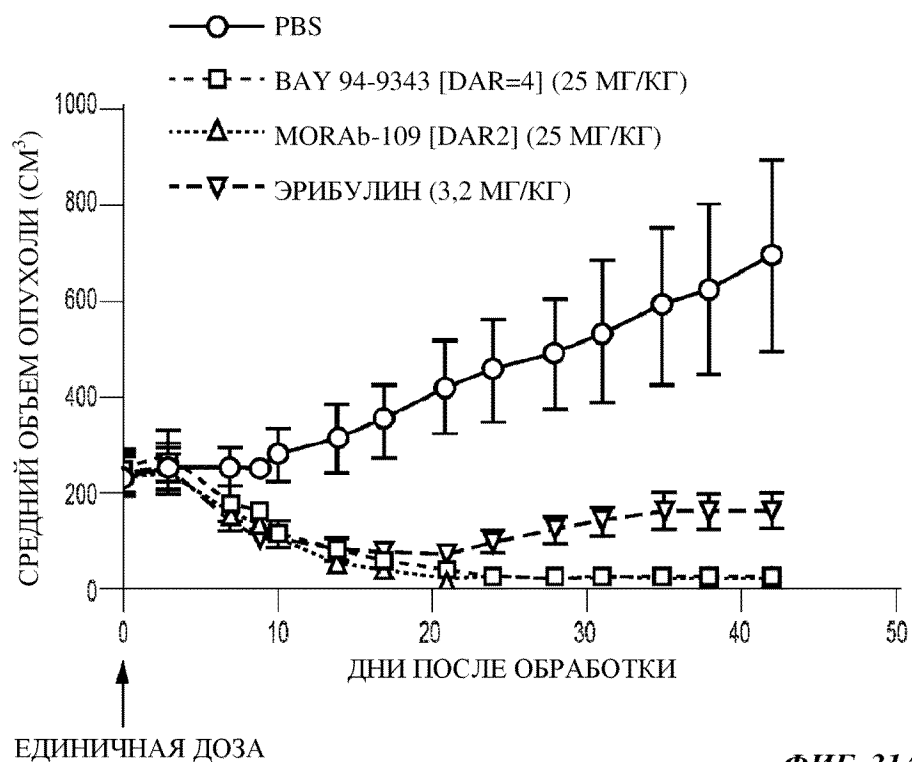
ФИГ. 29В



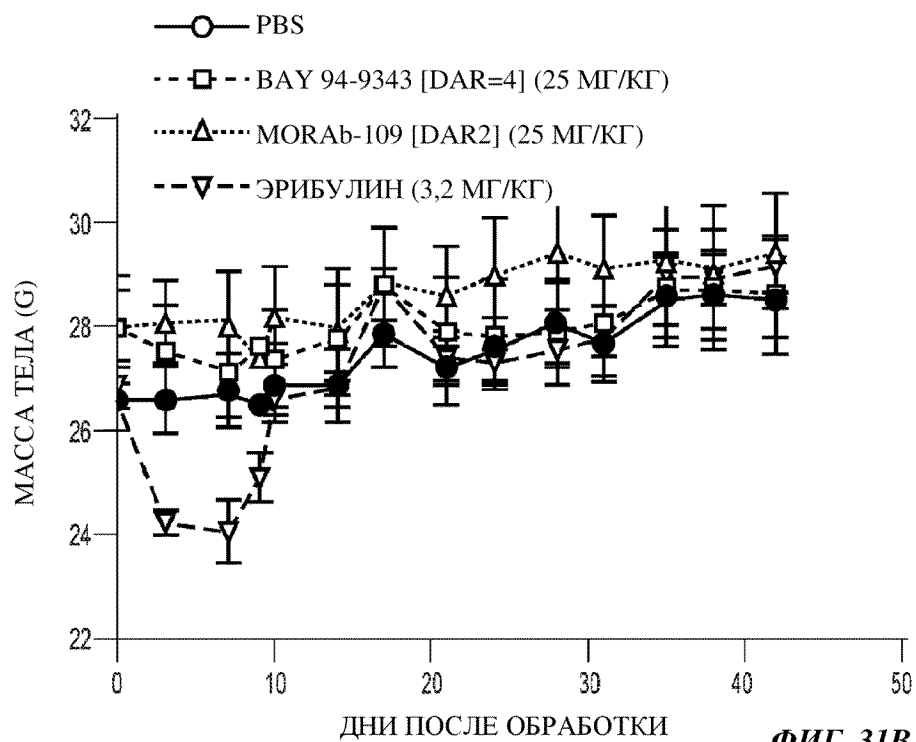
ФИГ. 30А



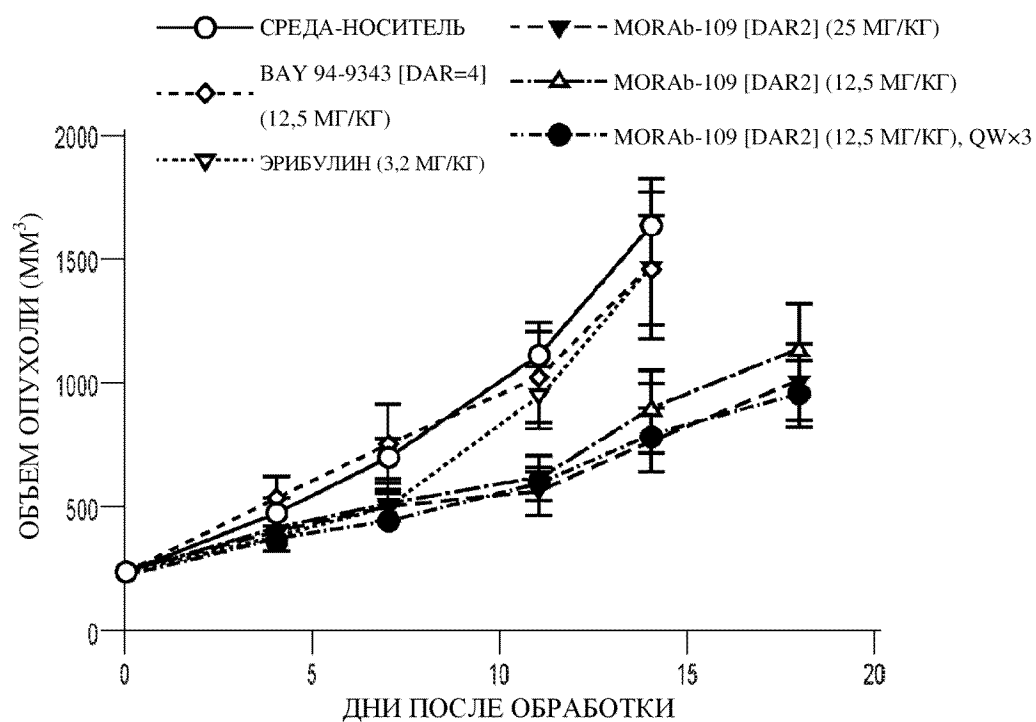
ФИГ. 30В



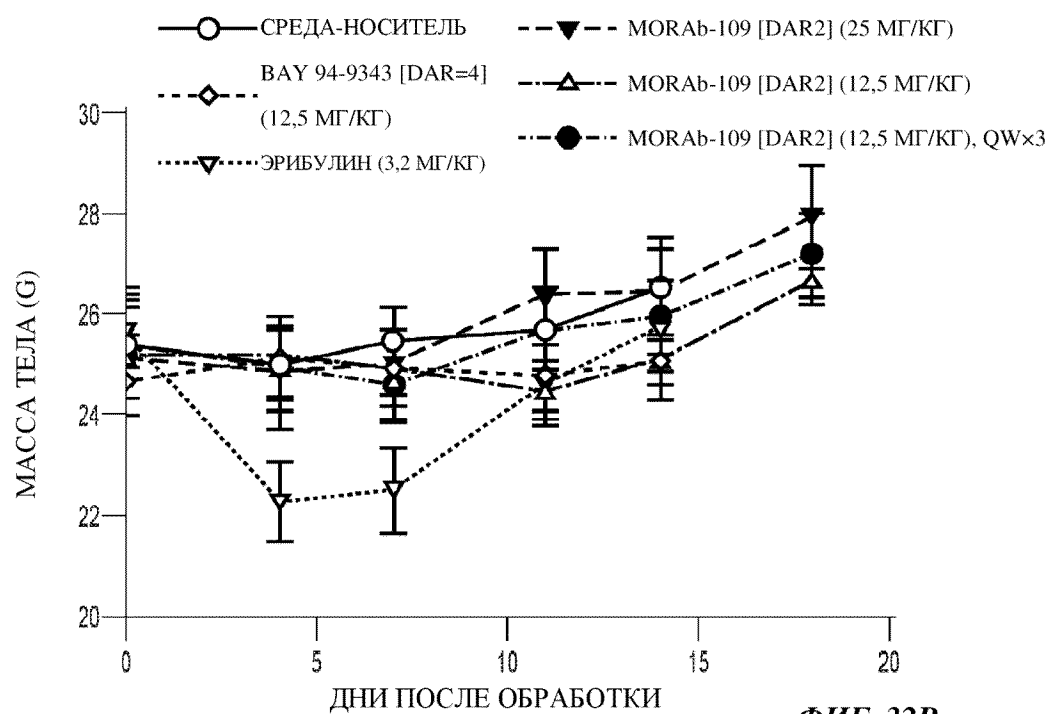
ФИГ. 31А



ФИГ. 31В



ФИГ. 32А



ФИГ. 32В