

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202292450** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.12.19

(51) Int. Cl. *C07K 16/32* (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.02.26

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ AXL И КОМПОЗИЦИИ**

(31) 62/982,852

(32) 2020.02.28

(33) US

(86) PCT/IB2021/051636

(87) WO 2021/171257 2021.09.02

(71) Заявитель:
СЮМФОГЕН А/С (DK)

(72) Изобретатель:

Геттинг Торбен, Линдстед Трине,
Виллер Антон, Ворсоз Анне (DK),
Меландер Эва Мария Карльсен (SE),
Якобсен Янус Скоу, Хансен Ранди
Вест (DK)

(74) Представитель:

Веселицкий М.Б., Кузенкова Н.В.,
Каксис Р.А., Белоусов Ю.В., Куликов
А.В., Кузнецова Е.В., Соколов Р.А.,
Кузнецова Т.В. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам против AXL и к способам их применения в лечении заболеваний и состояний, связанных с активностью AXL, например рака.

202292450

A1

A1

202292450

АНТИТЕЛА ПРОТИВ AXL И КОМПОЗИЦИИ

5 Перекрестная ссылка на родственную заявку

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет из предварительной заявки на патент США 62/982,852, поданной 28 февраля 2020 г. Раскрытие этой приоритетной заявки полностью включено в настоящую заявку посредством ссылки.

10 Перечень последовательностей

[0002] Настоящая заявка содержит Перечень последовательностей, который был представлен в электронном виде в формате ASCII и полностью включен в настоящую заявку посредством ссылки. Электронная копия Перечня последовательностей, созданная 23 февраля 2021 г., называется
15 022675_WO062_SL.txt и имеет размер 43 951 байт.

Предпосылки создания изобретения

[0003] AXL, также известный как UFO, JTK11, Tyro7 или ARK, экспрессируется на подмножествах миелоидных клеток, включая макрофаги и дендритные клетки, и является членом TAM (Tyro3-Axl-Mer) семейства
20 рецепторных тирозинкиназ (RTK). TAM RTK представляют собой чувствительные к фосфатидилсерину рецепторы, участвующие в поглощении апоптотических клеток фагоцитирующими клетками. Эти киназы важны для поддержания гомеостаза тканей и органов, подвергающихся постоянному воздействию и клеточному обновлению. Лигандом для AXL является Growth
25 Arrest Specific 6 (GAS6), который функционирует как линкер между фосфатидилсерином на апоптотических клетках и AXL и облегчает поглощение клеточного дебриса в процессе, известном как эфферцитоз.

[0004] Аберрантно повышенная активность TAM тесно связана с
30 прогрессией опухоли, эпителиально-мезенхимальным переходом, метастазированием и резистентностью к таргетной терапии. Было показано, что опосредованный AXL эфферцитоз переводит экспрессирующие AXL клетки в иммуносупрессивное состояние со сниженной способностью представлять антигены Т-клеткам и продуцировать провоспалительные цитокины. После вызванной GAS6 активации AXL обеспечивает сильный сигнал выживания

опухолевым клеткам через сигнальный путь PI3K/AKT. Повышенная экспрессия GAS6 и AXL коррелирует с плохим прогнозом у онкологических больных.

5 [0005] Ввиду критической роли AXL в прогрессировании рака существует потребность в новых и улучшенных противораковых терапиях, нацеленных на AXL.

Краткое изложение сущности изобретения

10 [0006] Настоящее изобретение относится к новым рекомбинантным антителам, нацеленным на AXL, а также к фармацевтическим композициям, содержащим одно или несколько таких антител, и к применению этих антител и фармацевтических композиций для лечения рака. Антитела и композиции, описанные в настоящей заявке, могут быть использованы в способе лечения рака у пациента; могут быть использованы для изготовления лекарственного средства для лечения рака у пациента; или могут быть применены в лечении рака у пациента. По сравнению с доступными в настоящее время способами лечения 15 таких видов рака, включая лечение антителами, предполагают, что антитела и композиции, описанные в настоящей заявке, могут обеспечивать превосходный клинический ответ либо по отдельности, либо в сочетании с другим противораковым терапевтическим средством.

20 [0007] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть, которое конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание или связывается с тем же эпитопом AXL человека, что и антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 или 22883. В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть определяется аминокислотными 25 последовательностями шести CDR, переменными доменами тяжелой и легкой цепей или тяжелой и легкой цепями указанного антитела.

[0008] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против AXL или его антигенсвязывающей части, где

- а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:
- 30 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, соответственно;

ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
5 или

iv) тяжелая цепь (HC), содержащая аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3
10 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, соответственно;

ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
15 или

iv) легкая цепь (LC), содержащая аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62.

[0009] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение
20 относится к антителу против AXL или его антигенсвязывающей части, где

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID
NO: 15-17, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей
25 мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13
и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID
30 NO: 18-20, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей
мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
или

iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14
и 62.

5 **[0010]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение
относится к антителу против AXL или его антигенсвязывающей части, где

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID
NO: 25-27, соответственно;

10 ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей
мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;
или

15 iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23
и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) L-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID
NO: 28-30, соответственно;

20 ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей
мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24;
или

iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24
и 62.

25 **[0011]** В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение
относится к антителу против AXL или его антигенсвязывающей части, где

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID
NO: 35-37, соответственно;

30 ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей
мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;
или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

5 i) L-CDR-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38-40, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34; или

10 iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62.

[0012] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против AXL или его антигенсвязывающей части, где

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

15 i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

20 iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43; или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

25 i) L-CDR-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48-50, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 44;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; или

30 iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62.

[0013] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против AXL или его антигенсвязывающей части, где

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

i) H-CDR-1-3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55-57, соответственно;

ii) VH, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;

5 iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53; или

iv) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

10 i) L-CDR-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58-60, соответственно;

ii) VL, содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

15 iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54; или

iv) LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

[0014] В настоящем изобретении также предложены выделенные молекулы нуклеиновых кислот, векторы и клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то и другое, антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящей заявке. Кроме того, настоящее изобретение обеспечивает способы получения антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящей заявке, путем культивирования указанных клеток-хозяев, а также способы получения композиции антител путем смешивания антител или антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке.

[0015] Другие признаки, цели и преимущества изобретения очевидны из последующего подробного описания. Однако следует понимать, что подробное описание с указанием вариантов осуществления и аспектов изобретения дано только в качестве иллюстрации, а не ограничения. Различные изменения и модификации в пределах объема изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из подробного описания.

Краткое описание фигур

[0016] ФИГ. 1А - 1С представляют собой набор графиков, показывающих профили связывания указанных антител против AXL человека с внеклеточным доменом (ECD) AXL человека (фиг. 1А) и яванского макака (фиг. 1В), транзиторно экспрессируемым на клетках CHO-S. Псевдотрансфицированные клетки CHO-S использовали в качестве отрицательного контроля (Фиг. 1С).
5 Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=3).

[0017] ФИГ. 2 представляет собой график, показывающий пролиферацию клеток H1299 после обработки антителами против AXL. Для дальнейшей характеристики отбирали антитела в боксах. Данные были нормализованы для необработанных контролей (без GAS6), с пролиферативным ответом в присутствии GAS6 на оси X и пролиферативным ответом в отсутствие GAS6 на оси Y. Пунктирные горизонтальные и вертикальные линии обозначают уровни пролиферации при добавлении GAS6 по сравнению с контролями без GAS6,
10 нормализованными для каждой установки (+ или - GAS6) отдельно. Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех технических повторов для каждой оси.

[0018] ФИГ. 3 представляет собой пару графиков, показывающих пролиферацию клеток H1299, обработанных указанными антителами, в присутствии (верхняя панель) или в отсутствие (нижняя панель) лиганда GAS6. Данные нормализованы к необработанному контролю, и каждая точка данных на кривых представляет собой среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=3).
20

[0019] ФИГ. 4 представляет собой график, показывающий индуцированное GAS6 поглощение липосом клетками MDA-MB-468-AXL, обработанными указанными антителами. Данные нормализованы к контрольным группам, получавшим GAS6 (пунктирная линия), и представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. Каждая точка данных представляет собой среднее значение трех технических повторов.
25

[0020] ФИГ. 5А и 5В представляют собой пару графиков, показывающих влияние двух антител AXL (22995 и 23203_2) или обработки носителем на рост опухоли у мышей NOD.Scid, которым трансплантировали клетки рака молочной железы человека MDA-MB-231. Серая область обозначает период лечения. Данные представлены как среднее \pm SEM. **** P < 0,0001.
30

[0021] ФИГ. 6 представляет собой таблицу, в которой представлены результаты перекрестной конкуренции для указанных антител и лиганда AXL, GAS6, протестированные в классическом сэндвич-анализе с помощью SPR. Данные нормализовали, чтобы скорректировать различия в связывающей способности рекомбинантных AXL-ECD для каждого антитела на поверхности. Сэндвич-антитела показаны белым цветом, а блокирующие антитела — серым цветом.

[0022] ФИГ. 7 представляет собой таблицу, отражающую ответы (нм) биослойной интерферометрии (BLI) для связывания указанных антител с захваченными химерными белками человека/мыши, нормализованные на связывание антитела с полноразмерным AXL-ECD человека для каждого антитела. Последовательность AXL мыши («MoAXL») была заменена последовательностью AXL человека для домена Ig1, Ig2, Fn1 или Fn2 («HuIg1», «HuIg2», «HuFn1» и «HuFn2» отмечены жирным шрифтом). Серый цвет означает отсутствие реакции связывания; отрицательные ответы обусловлены незначительной диссоциацией захваченного антигена с поверхности Penta-His. Данные взяты из одного репрезентативного эксперимента.

Подробное описание изобретения

[0023] В настоящем изобретении предложены новые антитела против AXL человека, которые можно использовать для ингибирования активности AXL у пациента, такого как больной раком. Если не указано иное, используемый в настоящей заявке термин «AXL» относится к AXL человека. Полипептидная последовательность AXL человека доступна под регистрационным номером UniProt P30530 (UFO_HUMAN) (SEQ ID NO: 63), как показано ниже:

```
10  20  30  40  50
MAWRCPRMGR VPLAWCLALC GWACMAPRGT QAEESPFGVN PGNITGARGL
60  70  80  90 100
TGTLRCQLQV QGEPPEVHWL RDGQILELAD STQTQVPLGE DEQDDWIVVS
110 120 130 140 150
QLRITSLQLS DTGQYQCLVF LGHQTFVSQP GYVGLEGLPY FLEEPEDRTV
160 170 180 190 200
AANTPFNLSC QAQGPPEPVD LLWLQDAVPL ATAPGHGPQR SLHVPGLNKT
210 220 230 240 250
SSFSCSAHNA KGVTTSTRTAT ITVLPQQPRN LHLVSRQPTL LEVAWTPGLS
```

260 270 280 290 300
GIYPLTHCTL QAVLSDDGMG IQAGEPDPPE EPLTSQASVP PHQLRLGSLH
310 320 330 340 350
PHTPYHIRVA CTSSQGPSSW THWLPVETPE GVPLGPPENI SATRNGSQAF
5 360 370 380 390 400
VHWQEPRAPL QGTLLGYRLA YQGQDTPEVL MDIGLRQEVV LELQGDGSVS
410 420 430 440 450
NLTVCVAAAYT AAGDGPWSLP VPLEAWRPGQ AQPVHQLVKE PSTPAFSWPW
460 470 480 490 500
10 WYVLLGAVVA AACVLILALF LVHRRKKETR YGEVFEPTVE RGELVVRYRV
510 520 530 540 550
RKSYSRRTE ATLNLSLGISE ELKEKLRDVM VDRHKVALGK TLGEGEFGAV
560 570 580 590 600
15 MEGQLNQDDS ILKVAVKTMK IAICTRSELE DFLSEAVCMK EFDHPNVMRL
610 620 630 640 650
IGVCFQGSER ESFPAPVVIL PFMKHGDLHS FLLYSRLGDQ PVYLPQMLV
660 670 680 690 700
KFMADIASGM EYLSTKRFIH RDLAARNCML NENMSVCVAD FGLSKKIYNG
710 720 730 740 750
20 DYYRQGRIAK MPVKWIAIES LADRVYTSKS DVWSFGVTMW EIATRGQTPY
760 770 780 790 800
PGVENSEIYD YLRQGNRLKQ PADCLDGLYA LMSRCWELNP QDRPSFTELR
810 820 830 840 850
EDLENTLKAL PPAQEPDEIL YVNMDEGGGY PEPPGAAGGA DPPTQPDPKD
25 860 870 880 890
SCSCLTAAEV HPAGRYVLCV STTPSPAQPA DRGSPAAPGQ EDGA

[0024] Термин «антитело» (Ab) или «иммуноглобулин» (Ig), используемый
в данной заявке, относится к тетрамеру, содержащему две тяжелые (H) цепи
30 (около 50-70 кДа) и две легкие (L) цепи (около 25 кДа) соединены между собой
дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменного домена
тяжелой цепи (VH) и константной области тяжелой цепи (CH). Каждая легкая
цепь состоит из переменного домена легкой цепи (VL) и константной области
легкой цепи (CL). Домены VH и VL могут быть дополнительно подразделены на
35 области гипервариабельности, называемые «областями, определяющими
комплементарность» (CDR), перемежающиеся с более консервативными
областями, называемыми «каркасными областями» (FR). Каждая VH и VL

состоит из трех CDR (H-CDR здесь обозначает CDR тяжелой цепи, а L-CDR здесь обозначает CDR легкой цепи) и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Назначение номеров аминокислот и областей FR и CDR в тяжелой или легкой цепи может соответствовать определениям IMGT[®] (нумерация Eu; Lefranc и соавт., *Dev Comp Immunol* 27(1):55-77 (2003)); или определениям Кабата, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD (1987 и 1991)); Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Chothia и соавт., *Nature* 342:878-883 (1989); MacCallum и соавт., *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996); или Honegger and Plückthun, *J. Mol. Biol.* 309(3):657-70 (2001).

[0025] Термин «рекомбинантное антитело» относится к антителу, которое экспрессируется из клетки или клеточной линии, содержащей нуклеотидную(ые) последовательность(и), кодирующую(ие) антитело, при этом указанная(ые) нуклеотидная(ые) последовательность(и) в природе не связаны с клеткой.

[0026] Термин «выделенный белок», «выделенный полипептид» или «выделенное антитело» относится к белку, полипептиду или антителу, которые в силу своего происхождения или источника происхождения (1) не связаны с естественными ассоциированными компонентами, которые сопровождают их в нативном состоянии, (2) не содержит других белков того же вида, (3) экспрессируется клеткой другого вида и/или (4) не встречается в природе. Таким образом, полипептид, синтезированный химическим путем или синтезированный в клеточной системе, отличной от клетки, из которой он происходит в природе, будет «выделен» из связанных с ним природных компонентов. Белок также может быть практически свободен от природных ассоциированных компонентов путем выделения с использованием методов очистки белка, хорошо известных в данной области.

[0027] Термин «аффинность» относится к мере притяжения между антигеном и антителом. Внутренняя привлекательность антитела для антигена обычно выражается как константа равновесия аффинности связывания (K_D) конкретного взаимодействия антитело-антиген. Говорят, что антитело специфически связывается с антигеном, когда K_D составляет ≤ 1 мМ, например, ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ или ≤ 10 нМ. Константу аффинности связывания K_D можно измерить, например, с помощью поверхностного плазмонного резонанса

(например, BIAcore™) с использованием системы IBIS MX96 SPR от IBIS Technologies или платформы Cytterra LSA SPR, или с помощью интерферометрии Bio-Layer Interferometry, например, с использованием системы Octet™ от ForteBio.

5 **[0028]** Термин «эпитоп», используемый в настоящей заявке, относится к части (детерминанте) антигена, которая специфически связывается с антителом или родственной молекулой, такой как молекула биспецифического связывания. Эпитопные детерминанты обычно состоят из химически активных
10 поверхностных групп молекул, таких как боковые цепи аминокислот или углеводов или сахаров, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Эпитоп может быть «линейным» или «конформационным». В линейном эпитопе все точки взаимодействия между белком (например, антигеном) и
15 взаимодействующей молекулой (такой как антитело) расположены линейно вдоль первичной аминокислотной последовательности белка. В
20 конформационном эпитопе точки взаимодействия расположены между аминокислотными остатками белка, которые отделены друг от друга в первичной аминокислотной последовательности. После того как желаемый эпитоп на антигене определен, можно получить антитела к этому эпитопу с
25 использованием методов, хорошо известных в данной области. Например, антитело к линейному эпитопу может быть получено, например, путем иммунизации животного пептидом, имеющим аминокислотные остатки линейного эпитопа. Антитело к конформационному эпитопу может быть
30 получено, например, путем иммунизации животного мини-доменом, содержащим соответствующие аминокислотные остатки конформационного эпитопа. Антитело к конкретному эпитопу также может быть получено, например, путем иммунизации животного интересующей молекулой-мишенью (например, AXL) или соответствующей ее частью с последующим скринингом на связывание с эпитопом.

30 **[0029]** Можно определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и антитело против AXL в соответствии с настоящим изобретением, или конкурирует за связывание с ним, используя методы, известные в данной области, включая, помимо прочего, конкурентные анализы, связывание эпитопов и сканирование аланином. В некоторых вариантах осуществления антителу

против AXL согласно настоящему изобретению дают связываться с AXL в условиях насыщения, а затем измеряют способность тестируемого антитела связываться с AXL. Если тестируемое антитело способно связываться с AXL одновременно с эталонным антителом против AXL, то тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, чем эталонное антитело против AXL. Однако, если тестируемое антитело не способно одновременно связываться с AXL, тогда тестируемое антитело связывается с тем же эпитопом, перекрывающимся эпитопом или эпитопом, который находится в непосредственной близости от эпитопа, связанного антителом против AXL согласно настоящему изобретению. Этот эксперимент можно проводить с использованием, например, ELISA, RIA, VIACORE™, SPR, интерферометрии Bio-Layer или проточной цитометрии. Чтобы проверить, конкурирует ли перекрестно антитело против AXL с другим антителом против AXL, можно использовать метод конкуренции, описанный выше, в двух направлениях, т.е. определить, блокирует ли известное антитело тестируемое антитело, и наоборот. Такие перекрестно конкурентные эксперименты можно проводить, например, с использованием прибора IBIS MX96 или Cytterra LSA SPR или системы Octet™.

[0030] Термин «человеческое антитело» относится к антителу, в котором последовательности вариабельного домена и константной области получены из последовательностей человека. Этот термин охватывает антитела с последовательностями, происходящими из генов человека, но модифицированными, например, для снижения иммуногенности, повышения аффинности и/или повышения стабильности. Кроме того, этот термин охватывает антитела, продуцируемые рекомбинантно в нечеловеческих клетках, которые могут придавать гликозилирование, нетипичное для клеток человека. Термин также охватывает антитела, продуцируемые в трансгенных нечеловеческих организмах с генами человеческих антител (например, крысы OmniRat®).

[0031] Термин «антигенсвязывающая часть» антитела (или просто «часть антитела») в данном контексте относится к одной или нескольким частям или фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, AXL человека или его частью). Показано, что определенные фрагменты полноразмерного антитела могут выполнять антигенсвязывающую функцию антитела. Примеры связывающих фрагментов,

охватываемых термином «антигенсвязывающая часть», включают в себя (i) фрагмент Fab: одновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; (ii) фрагмент F(ab')₂: двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов VH и CH1; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb, состоящий из домена VH; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR), способную специфически связываться с антигеном. Более того, хотя два домена фрагмента Fv, VL и VH, кодируются отдельными генами, их можно соединить с помощью рекомбинантных методов с помощью синтетического линкера, что позволяет сделать их единой белковой цепью, в которой домены VL и VH спариваются с образованием одновалентных молекул (известных как одноцепочечные Fv (scFv)). Также в рамках настоящего изобретения представлены антигенсвязывающие молекулы, содержащие VH и/или VL. В случае VH молекула может также содержать одну или несколько областей CH1, шарнирную, CH2 или CH3. Предполагают, что такие одноцепочечные антитела охватываются термином «антигенсвязывающая часть» антитела. Также охватываются другие формы одноцепочечных антител, такие как диатела. Диатела представляют собой двухвалентные, биспецифические антитела, в которых домены VH и VL экспрессируются на одной полипептидной цепи, но с использованием слишком короткого линкера, который не позволяет спаривать два домена в одной цепи, тем самым заставляя домены спариваться с комплементарными доменами другой цепи и создавая два антигенсвязывающие участки.

[0032] Части антител, такие как фрагменты Fab и F(ab')₂, могут быть получены из цельных антител с использованием обычных способов, таких как расщепление цельных антител папаином или пепсином. Кроме того, антитела, части антител и молекулы иммуноадгезина можно получить с использованием стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, как описано в настоящей заявке.

[0033] Класс (изотип) и подкласс антител против AXL можно определить любым способом, известным в данной области. Как правило, класс и подкласс антитела можно определить с использованием антител, специфичных для конкретного класса и подкласса антител. Такие антитела коммерчески доступны.

Класс и подкласс можно определить с помощью ELISA или вестерн-блоттинга, а также с помощью других методов. Альтернативно, класс и подкласс можно определить путем секвенирования всей или части константной области тяжелых и/или легких цепей антител, сравнения их аминокислотных последовательностей с известными аминокислотными последовательностями различных классов и подклассов иммуноглобулинов, и определения класса и подкласса антител.

[0034] Если не указано иное, все номера аминокислотных остатков антител, указанные в данном описании, соответствуют нумерации по схеме IMGT[®] (нумерация ЕС).

Антитела против AXL

[0035] Настоящее изобретение относится к антителам, направленным против AXL, и их антигенсвязывающим частям. В конкретном аспекте антитела, раскрытые в настоящей заявке, представляют собой человеческие антитела, полученные из трансгенных животных (например, крыс), которые способны продуцировать антитела, кодируемые реаранжированными генами антител человека. В некоторых вариантах осуществления антитела человека могут содержать определенные мутации, например, для замены мутаций, происходящих от праймеров, обратно на последовательность зародышевой линии (см., например, «скорректированные по Symplex» варианты последовательности в таблице 1).

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитела против AXL в соответствии с настоящим изобретением имеют мутации «LALA» (L234A/L235A) в области Fc. Эти мутации препятствуют связыванию антител с человеческим FcγR (гамма-рецепторами Fc). Такие антитела выгодны, потому что они имеют низкий уровень вторичных эффекторных функций и, следовательно, не истощают эффекторные T-клетки и не нацеливаются на другие незлокачественные клетки.

[0037] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть конкурирует или перекрестно конкурирует за связывание с AXL человека с или связывается с тем же эпитопом AXL человека, что и антитело, содержащее:

а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61 и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

5 в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

10 д) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62; или

е) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность CDR3 тяжелой цепи (H-CDR3) SEQ ID NO: 7, 17, 27, 37, 47 или 57.

20 **[0039]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет CDR1-3 тяжелой цепи (H-CDR1-3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, 15-17, 25-27, 35-37, 45-47 или 55-57, соответственно.

25 **[0040]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи (VH), которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53.

30 **[0041]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53.

[0042] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL имеет аминокислотную последовательность VH, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53; и

последовательность аминокислот константной области тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 61.

5 **[0043]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL содержит аминокислотную последовательность VH SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53 и аминокислотную последовательность константной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 61.

10 **[0044]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность CDR3 легкой цепи (L-CDR3) SEQ ID NO: 10, 20, 30, 40, 50 или 60.

[0045] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет CDR1-3 легкой цепи (L-CDR1-3), содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, 18-20, 28-30, 38-40, 48-50 или 58-60, соответственно.

15 **[0046]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи (VL), которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54.

20 **[0047]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть имеет VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54.

25 **[0048]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL имеет аминокислотную последовательность VL, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54; и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи, которая по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 62.

30 **[0049]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL содержит аминокислотную последовательность VL SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44, или 54 и аминокислотную последовательность константной области легкой цепи SEQ ID NO: 62.

[0050] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL содержит любую из описанных выше тяжелых цепей и любую из описанных выше легких цепей.

5 **[0051]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- 10
- а) SEQ ID NO: 5-10, соответственно;
 - б) SEQ ID NO: 15-20, соответственно;
 - в) SEQ ID NO: 25-30, соответственно;
 - г) SEQ ID NO: 35-40, соответственно;
 - д) SEQ ID NO: 45-50, соответственно; или
 - е) SEQ ID NO: 55-60, соответственно.

15 **[0052]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением содержит VH и VL, которые на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, или 99% идентичны (например, идентичны на 90%) с аминокислотными последовательностями:

- 20
- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
 - б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
 - в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
 - г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
 - д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно; или
 - е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

25 **[0053]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением содержит VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности:

- 30
- а) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
 - б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
 - в) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
 - г) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно;
 - д) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно; или
 - е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

[0054] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL в соответствии с настоящим изобретением содержит:

а) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

б) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

в) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

г) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

д) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62; или

е) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

[0055] В настоящем изобретении также предложено антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, которые конкурируют или перекрестно конкурируют за связывание или связываются с тем же эпитопом, что и антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 или 22883.

[0056] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 или 22883.

[0057] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением содержит VH и VL, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотной последовательности VH и VL, соответственно, антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 или 22883.

[0058] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением содержит

VH и VL, которые представляют собой VH и VL, соответственно, антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995, или 22883.

5 **[0059]** В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL в соответствии с настоящим изобретением представляет собой антитело 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 или 22883, или антитело с той же аминокислотной последовательностью, что и указанное антитело.

10 **[0060]** В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке и относящихся к последовательности, содержащей H-CDR3 антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3 или 23203_4, указанная H-CDR3 может быть заменена вариантом H-CDR3, в котором остаток серина (S) в положении 2 в последовательности CSSREYSSRW~~H~~FDYW (SEQ ID NO: 7) заменен аланином (A), так что последовательность H-CDR3 представляет собой **CASREYSSRW~~H~~FDYW** (SEQ ID NO: 65). Вариантный остаток выделен жирным/подчеркнутым шрифтом.

15 **[0061]** В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке и относящихся к последовательности, содержащей H-FR3 антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3 или 23203_4, указанный H-FR3 может быть заменен вариантом H-FR3, в котором остаток аспартата (D) в положении 32 в последовательности NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY (SEQ ID NO: 66) заменен остатком глицина (G), так что последовательность H-FR3 представляет собой NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTA**A~~G~~**TAVYY (SEQ ID NO: 67). Вариантный остаток выделен жирным/подчеркнутым шрифтом.

20 **[0062]** В любом из вариантов осуществления, описанных в настоящей заявке, относящихся к VL 22995 (SEQ ID NO: 44), указанная последовательность может быть заменена любой последовательностью зародышевой линии IGKV/IGKJ человека. В некоторых вариантах осуществления замещающая последовательность может содержать L-CDR1, L-CDR2 и L-CDR3 SEQ ID NO: 48, 49 и 50, соответственно, которые привиты к любой последовательности IGKV/IGKJ человека, тем самым заменяя исходную последовательность зародышевой линии.

30 **[0063]** Класс антитела против AXL, полученного способами, описанными в настоящей заявке, может быть изменен или заменен другим классом или подклассом. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая VL или VH, выделяется с

использованием способов, хорошо известных в данной области, так что она не включает последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие CL или CH, соответственно. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие VL или VH, затем оперативно связывают с последовательностью нуклеиновой кислоты, кодирующей CL или CH, соответственно, из другого класса молекулы иммуноглобулина. Это может быть достигнуто с использованием вектора или молекулы нуклеиновой кислоты, которая содержит последовательность CL или CH, как описано выше. Например, класс антитела против AXL, который изначально был IgM, может быть изменен на IgG. Кроме того, переключение классов можно использовать для преобразования одного подкласса IgG в другой, например, из IgG₁ в IgG₂. Константная область легкой цепи κ может быть заменена, например, на константную область легкой цепи λ или наоборот. Примерный способ получения антитела в соответствии с настоящим изобретением с желаемым изотипом Ig включает стадии выделения молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей тяжелую цепь антитела против AXL, и молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей легкую цепь антитела против AXL, получения переменного домена тяжелой цепи, лигирование кодирующей последовательности переменного домена тяжелой цепи с кодирующей последовательностью константной области тяжелой цепи желаемого изотипа, экспрессирования легкой цепи и тяжелой цепи, кодируемых лигированной последовательностью в клетке, и сбор антитела против AXL с желаемым изотипом.

[0064] Антитело против AXL согласно настоящему изобретению может представлять собой молекулу IgG, IgM, IgE, IgA или IgD, но обычно относится к изотипу IgG, например, к подклассу IgG IgG₁, IgG_{2a} или IgG_{2b}, IgG₃ или IgG₄. В некоторых вариантах осуществления антитело относится к подклассу изотипа IgG₁.

[0065] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL может содержать по меньшей мере одну мутацию в области Fc. Известен ряд различных мутаций Fc, где эти мутации изменяют эффекторную функцию антитела. Например, в некоторых вариантах осуществления антитело против AXL содержит по меньшей мере одну мутацию в области Fc, которая снижает эффекторную функцию, например, мутации в одном или нескольких из

положений 228, 233, 234 и 235, где положения аминокислот пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT[®].

5 [0066] В некоторых вариантах осуществления, например, когда антитело относится к подклассу IgG₁, один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 могут быть мутированы, например, с Leu на Ala (L234A/L235A). Эти мутации снижают эффекторную функцию области Fc антител IgG₁. Положения аминокислот пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT[®].

10 [0067] В некоторых вариантах осуществления, например, когда антитело относится к подклассу IgG₄, оно может содержать мутацию S228P, где положение аминокислот пронумеровано в соответствии со схемой нумерации IMGT[®]. Известно, что эта мутация уменьшает нежелательный обмен фрагментами Fab.

15 [0068] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть связывается с AXL человека с K_D приблизительно 5 x 10⁻⁸, 4 x 10⁻⁸, 3 x 10⁻⁸, 2 x 10⁻⁸, 1 x 10⁻⁸, 9 x 10⁻⁹, 8 x 10⁻⁹, 7 x 10⁻⁹, 6 x 10⁻⁹, 5 x 10⁻⁹, 4 x 10⁻⁹, 3 x 10⁻⁹, 2 x 10⁻⁹, 1 x 10⁻⁹, 9 x 10⁻¹⁰, 8 x 10⁻¹⁰, 7 x 10⁻¹⁰, 6 x 10⁻¹⁰, или 5 x 10⁻¹⁰ М или менее.

20 [0069] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть связывается с AXL яванского макака с K_D приблизительно 9 x 10⁻⁸, 8 x 10⁻⁸, 7 x 10⁻⁸, 6 x 10⁻⁸, 5 x 10⁻⁸, 4 x 10⁻⁸, 3 x 10⁻⁸, 2 x 10⁻⁸, 1 x 10⁻⁸, 9 x 10⁻⁹, 8 x 10⁻⁹, 7 x 10⁻⁹, 6 x 10⁻⁹ или 5 x 10⁻⁹ или менее.

25 [0070] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть ингибирует пролиферацию клеток H1299 *in vitro* в концентрации приблизительно 1, 5, 10, 15, 20 или 25 мкг/мл или менее в присутствии GAS6 (например, когда GAS6 присутствует в концентрации приблизительно 1 мкг/мл).

30 [0071] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть не проявляет агонистической активности, например, в концентрации до приблизительно 1, 5, 10, 15, 20, или 25 мкг/мл, при отсутствии GAS6.

[0072] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть ингибирует индуцированное GAS6 поглощение фосфатидилсеринсодержащих липосом, например, в концентрации

приблизительно 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 4, или 6 мкг/мл или менее, в клетках MDA-MB-468-AXL, стабильно экспрессирующих экзогенный AXL.

5 [0073] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть ингибирует рост опухоли *in vivo*, например, в концентрации приблизительно 10 мг/кг или 50 мг/кг.

[0074] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть ингибирует связывание GAS6 с AXL человека.

10 [0075] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть распознает другой эпитоп AXL человека, чем 10G5 и/или YW327.6S2.

[0076] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть не связывается с AXL мыши.

15 [0077] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть связывается с доменом Ig1 AXL человека. В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть связывается с доменом Ig2 AXL человека.

[0078] В настоящем изобретении также рассматривают антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть, описанные в настоящей заявке, с любой комбинацией вышеуказанных свойств.

20 [0079] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящей заявке, имеют по меньшей мере одно (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или все 9) из следующих свойств:

- а) связывается с AXL человека с K_D 3×10^{-8} М или менее;
- б) связывается с AXL яванского макака с K_D 8×10^{-8} М или менее;
- 25 в) не связывается с AXL мыши;
- г) связывается с доменом Ig1 или Ig2 AXL человека;
- д) ингибирует связывание GAS6 с AXL человека;
- е) ингибирует пролиферацию клеток H1299 *in vitro* в присутствии GAS6 (например, когда антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть
- 30 находится в концентрации 25 мкг/мл или менее и GAS6 находится в концентрации 1 мкг/мл);
- ж) не проявляет агонистической активности в отсутствие GAS6 (например, в концентрации до 25 мкг/мл);

з) ингибирует индуцированное GAS6 поглощение фосфатидилсеринсодержащих липосом в клетках MDA-MB-468-AXL, стабильно экспрессирующих экзогенный AXL (например, в концентрации 6 мкг/мл или менее); и

5 и) ингибирует рост опухоли *in vivo* (например, в концентрации 10 мг/кг или 50 мг/кг).

В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть обладают по меньшей мере свойствами а)-и). В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть обладают по меньшей мере свойствами а)-д) и ж)-и). В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть обладают по меньшей мере свойствами а), б), д), ж) и з). В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть обладают по меньшей мере свойствами а)-д), ж) и з).
10 В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть обладают по меньшей мере свойствами а)-д), ж), а также и).
15

[0080] В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящей заявке, могут ингибировать рост опухоли и/или вызывать регрессию роста опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящей заявке, могут замедлить или обратить вспять метастазирование у онкологического больного. В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, описанные в настоящей заявке, могут продлить жизнь онкологического больного. Также рассматривается любая комбинация вышеуказанных свойств.
20
25

[0081] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению может быть частью более крупной молекулы иммуноадгезина, образованной ковалентной или нековалентной ассоциацией антитела или его части с одним или несколькими другими белками или пептидами. Примеры таких молекул иммуноадгезина включают использование центральной области стрептавидина для получения тетрамерной молекулы scFv (Kipriyanov и соавт., *Human Antibodies and Hybridomas* 6:93-101 (1995)) и использование цистеинового
30

остатка, маркерного пептида и С-концевой полигистидиновой метки для образования двухвалентных и биотинилированных молекул scFv (Kirgizyanov и соавт., *Mol. Immunol.* 31:1047-1058 (1994)). Другие примеры включают случаи, когда один или несколько CDR из антитела встраивают в молекулу либо ковалентно, либо нековалентно, чтобы сделать ее иммуноадгезином, который специфически связывается с представляющим интерес антигеном. В таких вариантах осуществления CDR могут быть встроены как часть более крупной полипептидной цепи, могут быть ковалентно связаны с другой полипептидной цепью или могут быть встроены нековалентно.

10 **[0082]** В другом аспекте может быть получено слитое антитело или иммуноадгезин, которое содержит все антитело против AXL согласно настоящему изобретению или его часть, связанные с другим полипептидом. В некоторых вариантах осуществления с полипептидом связаны только переменные домены антитела против AXL. В некоторых вариантах осуществления домен VH антитела против AXL связан с первым полипептидом, тогда как домен VL антитела против AXL связан со вторым полипептидом, который связывается с первым полипептидом таким образом, что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом, образуя антигенсвязывающий участок. В некоторых вариантах осуществления домен VH отделен от домена VL линкером, так что домены VH и VL могут взаимодействовать друг с другом (например, одноцепочечные антитела). Затем антитело VH-линкер-VL связывают с представляющим интерес полипептидом. Кроме того, могут быть созданы слитые антитела, в которых два (или более) одноцепочечных антитела связаны друг с другом. Это выгодно, если нужно создать двухвалентное или поливалентное антитело на одной полипептидной цепи или если нужно создать биспецифическое антитело.

20 **[0083]** Для создания одноцепочечного антитела (scFv), фрагменты ДНК, кодирующие VH и VL, оперативно связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующий аминокислотную последовательность (Gly₄-Ser)₃ (SEQ ID NO: 64), так что последовательности VH и VL могут быть экспрессированы как непрерывный одноцепочечный белок с доменами VL и VH, соединенными гибким линкером. См., например, Bird и соавт., *Science* 242:423-426 (1988); Huston и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883 (1988); и McCafferty и соавт., *Nature* 348:552-554 (1990).

Одноцепочечное антитело может быть одновалентным, если используют только одиночные VH и VL; двухвалентным, если используют два VH и VL; или поливалентным, если используют более двух VH и VL. Могут быть созданы биспецифические или поливалентные антитела, которые специфически связываются с AXL человека и, например, с другой молекулой.

[0084] В других вариантах осуществления другие модифицированные антитела могут быть получены с использованием молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих антитело против AXL. Например, «каппа-тела» (III и соавт., *Protein Eng.* 10:949-57 (1997)), «минитела» (Martin и соавт., *EMBO J.* 13:5303-9 (1994)), «диатела» (Holliger и соавт., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993)) или «янусины» (Traunecker и соавт., *EMBO J.* 10:3655-3659 (1991) и Traunecker и соавт., *Int. J. Cancer (Suppl.)* 7:51-52 (1992)) могут быть получены с использованием стандартных молекулярно-биологических методов в соответствии с решениями описания.

[0085] Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть согласно настоящему изобретению могут быть дериватизированы или связаны с другой молекулой (например, другим пептидом или белком). Как правило, антитела или их части дериватизируют таким образом, что связывание AXL не подвергается неблагоприятному влиянию дериватизации или мечения. Соответственно, предполагают, что антитела и части антител в соответствии с настоящим изобретением включают в себя как интактные, так и модифицированные формы человеческих антител против AXL, описанных в настоящей заявке. Например, антитело или часть антитела согласно настоящему изобретению могут быть функционально связаны (путем химического связывания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одним или несколькими другими молекулярными объектами, такими как другое антитело (например, биспецифическое антитело или диатело), детектирующий агент, фармацевтическое средство и/или белок или пептид, который может опосредовать ассоциацию антитела или части антитела с другой молекулой (такой как ядро стрептавидина или полигистидиновая метка).

[0086] Один тип дериватизированного антитела получают путем перекрестного связывания двух или более антител (одного или разных типов, например, для создания биспецифических антител). Подходящие сшивающие агенты включают те, которые являются гетеробифункциональными, имеющими

две отчетливо реакционноспособные группы, разделенные подходящим спейсером (например, *m*-малеимидобензоил-*N*-гидроксисукцинимидный эфир) или гомобифункциональными (например, дисукцинимидилсуберат). Такие линкеры доступны, например, от Pierce Chemical Company, Rockford, IL.

5 **[0087]** Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть также могут быть дериватизированы химической группой, такой как
полиэтиленгликоль (ПЭГ), метильной или этильной группой или углеводной группой. Эти группы могут быть полезны для улучшения биологических характеристик антитела, например, для увеличения периода полужизни в
10 сыворотке.

[0088] Антитело или его антигенсвязывающая часть в соответствии с настоящим изобретением также могут быть мечеными. Используемые в настоящей заявке термины «метка» или «меченый» относятся к встраиванию другой молекулы в антитело. В некоторых вариантах осуществления метка
15 представляет собой поддающийся обнаружению маркер, например, встраивание меченой радиоактивным изотопом аминокислоты или присоединение к полипептиду биотинильных фрагментов, которые могут быть обнаружены с помощью меченого авидина (например, стрептавидин, содержащий
20 флуоресцентный маркер или ферментативную активность, которую можно обнаружить оптическими или колориметрическими методами). В некоторых вариантах осуществления метка или маркер могут быть терапевтическими, например, конъюгатом лекарственного средства или токсином. В данной области известны и могут быть использованы различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов. Примеры меток для полипептидов включают в себя, но не
25 ограничиваются ими, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ³H, ¹⁴C, ¹⁵N, ³⁵S, ⁹⁰Y, ⁹⁹Tc, ¹¹¹In, ¹²⁵I, ¹³¹I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, лантанидные люминофоры), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные маркеры, биотинильные группы, заданные
30 полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой молнии, участки связывания вторичных антител, домены связывания металлов, эпитопные метки), магнитные агенты, такие как хелаты гадолиния, токсины, такие как коклюшный токсин, таксол, цитохалазин В, грамицид D, бромид этидия, эметин, митомицин, этопозид,

тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. В некоторых вариантах осуществления метки прикреплены спейсерами agms различной длины для уменьшения возможных стерических затруднений.

[0089] В некоторых вариантах осуществления антитела в соответствии с настоящим изобретением могут присутствовать в нейтральной форме (включая цвиттерионные формы) или в виде положительно или отрицательно заряженных частиц. В некоторых вариантах осуществления антитела могут образовывать комплекс с противоионом с образованием фармацевтически приемлемой соли.

Композиции антитела против AXL

[0090] Настоящее изобретение также обеспечивает комбинированную терапию (например, композицию), которая содержит одно, два, три, четыре или большее количество антител против AXL или их антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления комбинированная терапия (например, композиция) содержит два антитела против AXL или их антигенсвязывающие части. Комбинированная терапия может принимать форму, например, способа лечения с использованием указанных антител или антигенсвязывающих частей или фармацевтической композиции, содержащей указанные антитела или антигенсвязывающие части.

[0091] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение обеспечивает композицию, содержащую первое антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть и второе антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть, где первое и второе антитела представляют собой:

- антитела 23203_1 и 23203_2, соответственно;
- антитела 23203_1 и 23203_3, соответственно;
- антитела 23203_1 и 23203_4, соответственно;
- антитела 23203_1 и 22995, соответственно;
- антитела 23203_1 и 22883, соответственно;
- антитела 23203_2 и 23203_3, соответственно;
- антитела 23203_2 и 23203_4, соответственно;
- антитела 23203_2 и 22995, соответственно;
- антитела 23203_2 и 22883, соответственно;

- антитела 23203_3 и 23203_4, соответственно;
- антитела 23203_3 и 22995, соответственно;
- антитела 23203_3 и 22883, соответственно;
- антитела 23203_4 и 22995, соответственно;
- 5 - антитела 23203_4 и 22883, соответственно; или
- антитела 22995 и 22883, соответственно.

10 **[0092]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитела или их антигенсвязывающие части, которые связываются с тем же эпитопом, что и указанные первое и второе антитела, или конкурируют за связывание с ними.

15 **[0093]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которая содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3 указанного второго антитела.

20 **[0094]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны аминокислотным последовательностям VH и VL, соответственно, указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые по меньшей мере на 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 25 99% идентичны аминокислотным последовательностям VH и VL, соответственно, указанного второго антитела.

30 **[0095]** В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат аминокислотные последовательности VH и VL указанного первого антитела, и антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат аминокислотные последовательности VH и VL указанного второго антитела.

[0096] В некоторых вариантах осуществления композиция содержит антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат аминокислотные последовательности HC и LC указанного первого антитела, и

антитело или его антигенсвязывающую часть, которые содержат аминокислотные последовательности HC и LC указанного второго антитела.

[0097] В некоторых вариантах осуществления указанная композиция может содержать одно, два или большее количество антител или их

5 антигенсвязывающих частей, выбранных из группы, включающей в себя:

а) антитело, содержащее H-CDR1-3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7, 15-17, 25-27, 35-37, 45-47 или 55-57, соответственно;

10 б) антитело, последовательность VH которого по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53;

в) антитело, VH которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, 13, 23, 33, 43 или 53;

15 г) антитело, HC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61, 13 и 61, 23 и 61, 33 и 61, 43 и 61 или 53 и 61;

д) антитело, содержащее L-CDR1-3, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10, 18-20, 28-30, 38-40, 48-50 или 58-60, соответственно;

20 е) антитело, VL которого по меньшей мере на 90% идентичен аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54;

ж) антитело, VL которого содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, 14, 24, 34, 44 или 54;

з) антитело, LC которого содержит аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62, 14 и 62, 24 и 62, 34 и 62, 44 и 62 или 54 и 62;

25 и) антитело, H-CDR1-3 и L-CDR1-3 которого содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-10, 15-20, 25-30, 35-40, 45-50 или 55-60, соответственно;

к) антитело, содержащее VH и VL, аминокислотные последовательности которых по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным последовательностям SEQ ID NO: 3 и 4, 13 и 14, 23 и 24, 33 и 34, 43 и 44, или 53 и 54, соответственно;

30 л) антитело, содержащее VH и VL, которые содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 4, 13 и 14, 23 и 24, 33 и 34, 43 и 44, или 53 и 54, соответственно; и

м) антитело, содержащее HC и LC, которые содержат аминокислотные последовательности 3 и 61, и 4 и 62; 13 и 61, и 14 и 62; 23 и 61, и 24 и 62; 33 и 61, и 34 и 62; 43 и 61, и 44 и 62; или 53 и 61, и 54 и 62; соответственно.

5 [0098] В некоторых вариантах осуществления композиция антител против AXL, описанная в настоящей заявке, может ингибировать рост опухоли и/или индуцировать регрессию роста опухоли *in vivo*. В некоторых вариантах осуществления композиция антител против AXL, описанная в настоящей заявке, может продлевать выживаемость больного раком.

10 [0099] В настоящем изобретении также предложен способ получения композиции антител против AXL, описанный в настоящей заявке, включающий получение первого антитела против AXL или его антигенсвязывающей части и второго антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, а также смешивание двух антител или частей.

Биспецифические связывающие молекулы

15 [0100] В настоящем изобретении также предложена биспецифическая связывающая молекула, обладающая специфичностью связывания (например, включающая антигенсвязывающие части, такие как шесть CDR или VH и VL) антитела против AXL, описанного в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая связывающая молекула дополнительно
20 обладает специфичностью связывания другого, отличного от AXL антитела (например, другого антитела против AXL, описанного в настоящей заявке) или антитела, которое нацелено на другой белок, такой как раковый антиген или другую молекулу клеточной поверхности, активность которой опосредует болезненное состояние, такое как рак. Такие биспецифические связывающие
25 молекулы известны в данной области техники, и примеры различных типов биспецифических связывающих молекул приведены в настоящей заявке в другом месте.

Молекулы нуклеиновых кислот и векторы

30 [0101] В настоящем изобретении также представлены молекулы нуклеиновых кислот и последовательности, кодирующие антитела против AXL или их антигенсвязывающие части, описанные в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления разные молекулы нуклеиновых кислот кодируют аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела против AXL или его антигенсвязывающей части. В других вариантах осуществления

одна и та же молекула нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотные последовательности тяжелой и легкой цепей антитела против AXL или его антигенсвязывающей части.

5 [0102] Ссылка на нуклеотидную последовательность охватывает ее комплементарность, если не указано иное. Таким образом, следует понимать, что ссылка на нуклеиновую кислоту, имеющую конкретную последовательность, охватывает ее комплементарную цепь с ее комплементарной последовательностью. Термин «полинуклеотид», используемый в настоящей заявке, означает полимерную форму нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 10 оснований, либо рибонуклеотидов, либо дезоксинуклеотидов, либо модифицированную форму нуклеотида любого типа. Термин включает одно- и двухцепочечные формы.

[0103] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную 15 последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то, и другое, антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, описанной в настоящей заявке.

20 [0104] В настоящем изобретении также представлены нуклеотидные последовательности, которые по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99% идентичны одной или нескольким нуклеотидным последовательностям, приведенным в настоящей заявке, например, нуклеотидной последовательности, выбранной из группы, включающей в себя 25 SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51 и 52, или нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей в себя SEQ ID NO: 3, 4, 13, 14, 23, 24, 33, 34, 43, 44, 53 и 54. Термин «процентная идентичность последовательности» в контексте последовательностей нуклеиновых кислот относится к остаткам в 30 двух последовательностях, которые являются одинаковыми при выравнивании для максимального соответствия. Длина сравнения идентичности последовательностей может составлять по меньшей мере около девяти нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 18 нуклеотидов, чаще по меньшей мере около 24 нуклеотидов, обычно по меньшей мере около 28 нуклеотидов,

более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 32 нуклеотида, и предпочтительно по меньшей мере приблизительно 36, 48 или более нуклеотидов. В данной области известен ряд различных алгоритмов, которые можно использовать для измерения идентичности нуклеотидной последовательности. Например, полинуклеотидные последовательности можно сравнивать с помощью FASTA, Gap или Bestfit, которые являются программами в пакете Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisconsin. FASTA, которая включает, например, программы FASTA2 и FASTA3, обеспечивает выравнивание и процентную идентичность последовательностей областей наилучшего перекрытия между последовательностями запроса и поиска (см., например, Pearson, *Methods Enzymol.* 183:63-98 (1990); Pearson, *Methods Mol. Biol.* 132:185-219 (2000); Pearson, *Methods Enzymol.* 266:227-258 (1996); и Pearson, *J. Mol. Biol.* 276:71-84 (1998); включенные в настоящую заявку посредством ссылки). Если не указано иное, используют параметры по умолчанию для конкретной программы или алгоритма. Например, процентная идентичность последовательностей между последовательностями нуклеиновых кислот может быть определена с использованием FASTA с параметрами по умолчанию (размер слова 6 и коэффициент NOPAM для оценочной матрицы) или с использованием пробела с параметрами по умолчанию, как предусмотрено в версии 6.1 GCG, включенной в настоящую заявку посредством ссылки.

[0105] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к молекуле нуклеиновой кислоты, содержащей нуклеотидную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 2, 11, 12, 21, 22, 31, 32, 41, 42, 51 и 52. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидные последовательности SEQ ID NO: 1 и 2, 11 и 12, 21 и 22, 31 и 32, 41 и 42, или 51 и 52.

[0106] В любом из приведенных выше вариантов осуществления могут быть выделены молекулы нуклеиновой кислоты. Молекулы нуклеиновой кислоты, упоминаемые в настоящей заявке как «выделенные» или «очищенные», представляют собой нуклеиновые кислоты, которые (1) были отделены от нуклеиновых кислот геномной ДНК или клеточной РНК их источника происхождения; и/или (2) не встречаются в природе.

[0107] В еще одном аспекте настоящего изобретения предложен вектор, подходящий для экспрессии одной или обеих цепей антитела или его антигенсвязывающей части, которые описаны в настоящей заявке.

Используемый в настоящей заявке термин «вектор» означает молекулу нуклеиновой кислоты, способную транспортировать другую нуклеиновую кислоту, с которой она связана. В некоторых вариантах осуществления вектор представляет собой плазмиду, т. е. кольцевую двухцепочечную часть ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Более того, некоторые векторы способны направлять экспрессию генов, с которыми они оперативно связаны. Такие векторы упоминают в настоящей заявке как «рекомбинантные векторы экспрессии» (или просто «векторы экспрессии»).

[0108] В настоящем изобретении предложены векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют тяжелую цепь, легкую цепь или как тяжелую, так и легкую цепи антитела против AXL, как описано в настоящей заявке, или его антигенсвязывающую часть. В некоторых вариантах осуществления вектор согласно настоящему изобретению содержит молекулу нуклеиновой кислоты, описанную в настоящей заявке. В настоящем изобретении также предложены векторы, содержащие молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие слитые белки, модифицированные антитела, фрагменты антител и их зонды. Вектор может дополнительно содержать последовательность контроля экспрессии.

[0109] Используемый в настоящей заявке термин «последовательность контроля экспрессии» означает полинуклеотидные последовательности, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они лигированы. Последовательности контроля экспрессии включают соответствующие последовательности инициации, терминации транскрипции, промотора и энхансера; эффективные сигналы обработки РНК, такие как сигналы сплайсинга и полиаденилирования; последовательности, стабилизирующие цитоплазматическую мРНК; последовательности, повышающие эффективность трансляции (например, консенсусная последовательность Козака); последовательности, повышающие стабильность белка; и, при желании, последовательности, которые усиливают секрецию белка. Природа таких контрольных последовательностей различается в зависимости от организма-хозяина; у прокариот такие контрольные

последовательности обычно включают промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Предполагается, что термин «контрольные последовательности» включает, как минимум, все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии и процессинга, а также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых выгодно, например, лидерные последовательности и последовательности-партнеры слияния.

5
10
15
[0110] В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты, описанная в настоящей заявке, содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VH антитела против AXL или его антигенсвязывающую часть, описанную в настоящей заявке, присоединенную в рамке считывания к нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область тяжелой цепи из любого источника. Аналогично, молекула нуклеиновой кислоты, описанная в настоящей заявке, может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую домен VL антитела против AXL, или его антигенсвязывающую часть, описанную в настоящей заявке, присоединенную внутри рамки считывания к нуклеотидной последовательности, кодирующей константную область легкой цепи из любого источника.

20
25
30
[0111] В еще одном аспекте настоящего изобретения молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие VH и/или VL, могут быть «превращены» в гены полноразмерных антител. В некоторых вариантах осуществления молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH или VL, превращают в гены полноразмерных антител путем вставки в вектор экспрессии, уже кодирующий константные области тяжелой цепи (CH) или константные области легкой цепи (CL) соответственно, так что VH сегмент функционально связан с сегментом(ами) CH внутри вектора, и/или сегмент VL функционально связан с сегментом CL внутри вектора. В другом аспекте молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие домены VH и/или VL, превращают в гены полноразмерного антитела путем связывания, например, лигирования, молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей домен VH и/или VL, с молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей CH и/или области CL с использованием стандартных молекулярно-биологических методов. Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие полноразмерные тяжелые и/или легкие цепи, затем могут

быть экспрессированы из клетки, в которую они были введены, и выделено антитело против AXL.

5 [0112] В некоторых вариантах осуществления каркасная(ые) область(и) мутированы таким образом, что полученная(ые) каркасная(ые) область(и) имеют аминокислотную последовательность соответствующего гена зародышевой
10 линии. Мутация может быть произведена в каркасной области или константной области, например, для увеличения времени полужизни антитела против AXL. См., например, публикацию WO 00/09560. Мутация в каркасной области или константной области также может быть осуществлена для изменения
15 иммуногенности антитела и/или для создания сайта для ковалентного или нековалентного связывания с другой молекулой. В соответствии с настоящим изобретением антитело может иметь мутации в любой одной или нескольких CDR или каркасных областях переменного домена или константной области.

Клетки-хозяева и способы получения антител и композиций антител

15 [0113] Настоящее изобретение также обеспечивает способы получения композиций антител и антител и их антигенсвязывающих частей, описанных в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к способу получения антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, как описано в настоящем документе, включающему
20 получение клетки-хозяина (например, рекомбинантной клетки-хозяина) содержащей нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или его антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящей заявке;
25 культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его антигенсвязывающей части; и выделение полученного антитела или его антигенсвязывающей части. Антитела или антигенсвязывающие части, продуцируемые такой экспрессией в таких рекомбинантных клетках-хозяевах, называют в настоящей заявке
30 «рекомбинантными» антителами или антигенсвязывающими частями. Настоящее изобретение также обеспечивает клетки-потомки таких клеток-хозяев и антитела или антигенсвязывающие части, продуцируемые ими.

[0114] Термин «рекомбинантная клетка-хозяин» (или просто «клетка-хозяин») в данном контексте означает клетку, в которую был введен

рекомбинантный вектор экспрессии. По определению рекомбинантная клетка-хозяин не встречается в природе. Настоящее изобретение обеспечивает клетки-хозяева, которые могут содержать, например, вектор, как описано в настоящей заявке. Настоящее изобретение также относится к клеткам-хозяевам, которые
5 содержат, например, нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то, и другое, антитела против AXI или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящей заявке. Следует понимать, что «рекомбинантная клетка-хозяин» и
10 «клетка-хозяин» означают не только конкретную исследуемую клетку, но также и потомство такой клетки. Поскольку определенные модификации могут возникать в последующих поколениях либо из-за мутации, либо из-за влияния окружающей среды, такое потомство может фактически не быть идентичным родительской клетке, но все же включено в объем термина «клетка-хозяин», как
15 он используется в настоящей заявке.

[0115] Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела против AXI и их антигенсвязывающие части, и векторы, содержащие эти молекулы нуклеиновой кислоты, можно использовать для трансфекции подходящей клетки-хозяина млекопитающего, растения, бактерии или дрожжей.
20 Трансформация может быть осуществлена любым известным способом введения полинуклеотидов в клетку-хозяина. Способы введения гетерологичных полинуклеотидов в клетки млекопитающих хорошо известны в данной области и включают трансфекцию, опосредованную декстраном, преципитацию фосфатом кальция, трансфекцию, опосредованную полибренном, слияние протопластов,
25 электропорацию, инкапсулирование полинуклеотида(ов) в липосомы и прямую микроинъекцию ДНК в ядра. Кроме того, молекулы нуклеиновой кислоты могут быть введены в клетки млекопитающих с помощью вирусных векторов.

[0116] Вполне вероятно, что антитела, экспрессируемые разными клеточными линиями или у трансгенных животных, будут иметь разные
30 паттерны гликозилирования друг от друга. Однако все антитела, кодируемые молекулами нуклеиновых кислот, представленными в настоящем документе, или содержащие аминокислотные последовательности, представленные в настоящей заявке, являются частью настоящего изобретения, независимо от состояния

гликозилирования антител и, в более общем смысле, независимо от наличия или отсутствия посттрансляционной модификация(й).

Фармацевтические композиции

[0117] Другой аспект настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую в качестве активного ингредиента (или единственного активного ингредиента) антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть, композицию антител или биспецифически связывающую молекулу согласно настоящему изобретению. Фармацевтическая композиция может дополнительно содержать фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество. В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции предназначены для улучшения состояния, профилактики и/или лечения рака, например рака, описанного в настоящей заявке. В некоторых вариантах осуществления рак находится в ткани, такой как кожа, легкое, кишечник, толстая кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почка, мягкие ткани, система кровотока, голова и шея, печень, кость, мочевой пузырь, молочная железа, желудок, матка, шейка матки и поджелудочная железа. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому, рак головы и шеи, глиобластому, рак щитовидной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной железы), рак поджелудочной железы, рак яичников, рак шейки матки, карциному маточной трубы, первичную перитонеальную карциному, рак эндометрия, уротелиальную карциному, почечно-клеточную карциному, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак предстательной железы, мезотелиому, плоскоклеточный рак, саркому, хронический миелоидный лейкоз, малый лимфоцитарный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, малый лимфоцитарный лейкоз, миелодиспластический синдром или лимфому Ходжкина.

[0118] Фармацевтические композиции согласно настоящему изобретению будут содержать одно или несколько антител против AXL, антигенсвязывающих частей, композиций антител или биспецифических связывающих молекул согласно настоящему изобретению, например, одно или два антитела против AXL, антигенсвязывающие части или биспецифические связывающие молекулы. В некоторых вариантах осуществления композиция содержит одно антитело против AXL согласно настоящему изобретению или его антигенсвязывающую

часть. В другом аспекте композиция содержит два различных антитела против AXL согласно настоящему изобретению или их антигенсвязывающие части.

5 [0119] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать по меньшей мере одно антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть в соответствии с настоящим изобретением, например, антитело против AXL или его часть и одно или несколько дополнительных антител, нацеленных на один или несколько соответствующих рецепторов клеточной поверхности, например, один или несколько рецепторов, связанных с раком.

10 [0120] Как правило, антитела, антигенсвязывающие части и биспецифические связывающие молекулы согласно настоящему изобретению подходят для введения в виде состава в сочетании с одним или несколькими фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами, например, как описано ниже.

15 [0121] Термин «вспомогательное вещество» используют в настоящей заявке для описания любого ингредиента, отличного от соединения(й) согласно настоящему изобретению. Выбор вспомогательного вещества (веществ) будет в значительной степени зависеть от таких факторов, как конкретный способ введения, влияние вспомогательного вещества на растворимость и стабильность и природа лекарственной формы. Используемый в настоящей заявке термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» включает в себя
20 любые и все растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и противогрибковые средства, изотонические средства и средства, замедляющие всасывание, и т.п., которые являются физиологически совместимыми.

25 Некоторыми примерами фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ являются вода, солевой раствор, фосфатно-солевой буфер, декстроза, глицерин, этанол и т.п., а также их комбинации. Во многих случаях предпочтительно включать в композицию изотонические средства, например, сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит или хлорид натрия.

30 Дополнительными примерами фармацевтически приемлемых веществ являются смачивающие агенты или незначительные количества вспомогательных веществ, таких как смачивающие или эмульгирующие средства, консерванты или буферы, которые увеличивают срок хранения или эффективность антитела.

[0122] Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением и способы их получения будут очевидны специалистам в данной области техники. Такие композиции и способы их получения можно найти, например, в *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 19-е издание (Mack Publishing Company, 1995). Фармацевтические композиции предпочтительно производят в соответствии с условиями GMP (надлежащей производственной практики).

[0123] Фармацевтическая композиция в соответствии с настоящим изобретением может быть приготовлена, упакована или продана без упаковки, в виде разовой стандартной дозы или в виде множества разовых стандартных доз. Используемый в настоящей заявке термин «разовая доза» представляет собой дискретное количество фармацевтической композиции, содержащее заданное количество активного ингредиента. Количество активного ингредиента обычно равно дозе активного ингредиента, которая будет введена субъекту, или подходящей части такой дозы, такой как, например, половина или одна треть такой дозы.

[0124] Составы фармацевтической композиции, подходящие для парентерального введения, обычно содержат активный ингредиент в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем, таким как стерильная вода или стерильный изотонический солевой раствор. Такие составы могут быть приготовлены, упакованы или проданы в форме, пригодной для болюсного введения или для непрерывного введения. Препараты для инъекций могут быть приготовлены, упакованы или проданы в стандартной лекарственной форме, например, в ампулах или в контейнерах с несколькими дозами, содержащими консервант. Составы для парентерального введения включают, но не ограничиваются ими, суспензии, растворы, эмульсии в масляных или водных носителях, пасты и т.п. Такие составы могут дополнительно содержать один или несколько дополнительных ингредиентов, включая, но не ограничиваясь ими, суспендирующие, стабилизирующие или диспергирующие средства. В некоторых вариантах осуществления состава для парентерального введения активный ингредиент предоставляется в сухой (т.е. порошкообразной или гранулированной) форме для восстановления подходящим носителем (например, стерильной апиrogenной водой) перед парентеральным введением восстановленной композиции. Составы для парентерального введения также включают водные растворы, которые могут содержать вспомогательные

вещества, такие как соли, углеводы и буферные средства (предпочтительно до рН от 3 до 9), но для некоторых применений они могут быть более подходящими в виде стерильного неводного раствора или в виде высушенной формы для использования в сочетании с подходящим носителем, таким как стерильная апиrogenная вода. Типичные формы для парентерального введения включают в себя растворы или суспензии в стерильных водных растворах, например, водные растворы пропиленгликоля или декстрозы. При желании такие лекарственные формы могут быть соответствующим образом забуферены. Другие пригодные для парентерального введения композиции включают в себя те, которые содержат активный ингредиент в микрокристаллической форме или в липосомальном препарате.

Терапевтическое применение антител и композиций в соответствии с настоящим изобретением

[0125] В некоторых вариантах осуществления антитела против AXL и их антигенсвязывающие части, композиции антител против AXL и биспецифические связывающие молекулы согласно настоящему изобретению предназначены для применения при лечении рака, например, AXL-положительного рака. Рак может присутствовать в одной или нескольких тканях, таких как кожа, легкие, кишечник, толстая кишка, яичник, головной мозг, предстательная железа, почки, мягкие ткани, система кроветворения, голова и шея, печень, кости, мочевого пузыря, молочная железа, желудок, матка, шейки матки и поджелудочной железы.

[0126] В некоторых вариантах осуществления раковые заболевания, которые лечат антителами против AXL, антигенсвязывающими частями, композициями и биспецифическими связывающими молекулами согласно настоящему изобретению могут включать в себя, например, меланому (например, прогрессирующую или метастатическую меланому), базальноклеточный рак кожи, глиобластому, глиому, глиосаркому, астроцитому, менингиому, нейробластому, рак надпочечников, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак ротовой полости, рак слюнных желез, рак носоглотки, рак молочной железы, рак легких (например, немелкоклеточный рак легкого (НМРЛ), мелкоклеточный рак легкого и плоскоклеточный рак легкого), рак пищевода, рак желудочно-пищеводного перехода, рак желудка, рак желудочно-кишечного тракта, первичный рак брюшины, рак печени, гепатоцеллюлярную карциному,

рак желчных путей, рак толстой кишки, рак прямой кишки, колоректальный рак, рак яичников, рак маточной трубы, рак мочевого пузыря, рак верхних мочевыводящих путей, уротелиальный рак, почечно-клеточный рак, рак почки, рак мочеполовой системы, рак шейки матки, рак предстательной железы, фибросаркому, липосаркому, рабдомиосаркому, остеосаркому, гистиоцитому, рак поджелудочной железы, рак эндометрия, рак аппендикса, прогрессирующий рак клеток Меркеля, множественную миелому, саркомы, хориокарциному, эритролейкоз, острый лимфобластный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, острый лимфобластный лейкоз, тучноклеточный лейкоз, малую лимфоцитарную лимфому, лимфому Беркитта, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, диффузную В-крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому, моноцитарную лимфому, HTLV-ассоциированный Т-клеточный лейкоз/лимфому, мезотелиому и солидные опухоли. Рак может находиться, например, на ранней, промежуточной, поздней, местно-распространенной или метастатической стадии и может быть рецидивирующим или резистентным к другим терапевтическим средствам (например, другим терапевтическим средствам против AXL) или стандартная терапия может отсутствовать.

[0127] В некоторых вариантах осуществления рак, который лечат антителами против AXL, антигенсвязывающими частями, композициями и/или биспецифическими связывающими молекулами в соответствии с настоящим изобретением может включать в себя, например, меланому, рак головы и шеи, глиобластому, рак щитовидной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы (например, трижды негативный рак молочной желез), рак поджелудочной железы, рак яичников, рак шейки матки, карциному фаллопиевых труб, первичную карциному брюшины, рак эндометрия, уротелиальную карциному, почечно-клеточную карциному, колоректальный рак, рак предстательной железы, мезотелиому, плоскоклеточную карциному, саркому, хронический миелоидный лейкоз, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, малый лимфолейкоз, миелодиспластический синдром и/или лимфому Ходжкина.

[0128] Понятия «лечить» и «лечение» относятся к способу облегчения или отмены биологического расстройства и/или по меньшей мере одного из

сопутствующих ему симптомов. Используемое в настоящей заявке понятие «облегчать» заболевание, расстройство или состояние означает снижение тяжести и/или частоты возникновения симптомов заболевания, расстройства или состояния. Кроме того, ссылки в настоящей заявке на «лечение» включают
5 ссылки на лечебное, паллиативное и профилактическое лечение.

[0129] Понятие «терапевтически эффективное количество» относится к количеству вводимого терапевтического средства, которое в некоторой степени облегчит один или несколько симптомов заболевания, подвергаемого лечению. Терапевтически эффективное количество противоракового терапевтического
10 средства может, например, приводить к задержке роста опухоли, уменьшению размеров опухоли, повышению выживаемости, элиминации раковых клеток, замедлению или уменьшению прогрессирования заболевания, обращению метастазов или другим клиническим результатам, которых хотят достичь медицинские работники.

[0130] Антитела против AXL или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы, описанные в настоящем документе, можно вводить отдельно или в комбинации с одним или несколькими другими лекарственными средствами или антителами (или в виде
любой их комбинации). Фармацевтические композиции, способы и применения, описанные в настоящем документе, таким образом, также охватывают варианты комбинаций (совместного введения) с другими активными агентами, как
20 подробно описано ниже.

[0131] Используемые в настоящей заявке термины «совместное введение», «совместно введенный» и «в сочетании с» относятся к антителам против AXL и их антигенсвязывающим частям, композициям антител и биспецифическим связывающим молекулам согласно настоящему изобретению с одним или несколькими другими терапевтическими средствами, означают и действительно относятся к и включают в себя следующее:

а) одновременное введение такой комбинации антител/
30 антигенсвязывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы согласно настоящему изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты объединены в одну дозированную форму, которая высвобождает указанные компоненты по существу в одно и то же время указанному пациенту,

б) по существу одновременное введение такой комбинации антител/антигенсвязывающей части/композиции антител/биспецифически связывающей молекулы согласно настоящему изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты
5 составлены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые принимаются указанным пациентом по существу в одно и то же время, после чего указанные компоненты высвобождаются указанному пациенту по существу в одно и то же время,

в) последовательное введение такой комбинации антител/
10 антигенсвязывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты составлены отдельно друг от друга в отдельные лекарственные формы, которые последовательно принимаются указанным пациентом со значительным
15 временным интервалом между каждым введением, после чего указанные компоненты высвобождаются указанному пациенту в существенно разное время;
и

г) последовательное введение такой комбинации антитела/
20 антигенсвязывающей части/композиции антител/биспецифической связывающей молекулы по настоящему изобретению и терапевтического средства (средств) пациенту, нуждающемуся в лечении, когда такие компоненты составлены вместе в одной лекарственной форме, которая высвобождает указанные компоненты контролируемым образом, после чего они высвобождаются одновременно,
последовательно и/или перекрывающимся образом в одно и/или разное время
25 указанному пациенту, где каждая часть может быть введена либо одним и тем же, либо другим путем.

[0132] Антитела против AXL или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно вводить без дополнительного терапевтического
30 лечения, то есть в качестве самостоятельной терапии (монотерапии). В качестве альтернативы, лечение антителами против AXL или их антигенсвязывающими частями, композициями антител или биспецифическими связывающими молекулами согласно настоящему изобретению может включать в себя по меньшей мере одно дополнительное терапевтическое лечение

(комбинированную терапию), например, иммуностимулирующее средство, противораковое средство (например, химиотерапевтическое средство, противоопухолевое средство, антиангиогенное средство или ингибитор тирозинкиназы), или вакцину (например, противоопухолевую вакцину).

5 **[0133]** В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифически связывающая молекула могут быть введены совместно или входить в состав с другим лекарственным препаратом/лекарственным средством для лечения рака. Дополнительное терапевтическое лечение может включать в себя, например,
10 иммуностимулирующее средство, вакцину, химиотерапевтическое средство, противоопухолевое средство, средство против ангиогенеза, ингибитор тирозинкиназы и/или лучевую терапию. В некоторых вариантах осуществления дополнительное терапевтическое лечение может включать в себя другое противораковое антитело.

15 **[0134]** Фармацевтические изделия, содержащие антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть, композицию антител или биспецифически связывающую молекулу, описанную в настоящей заявке и по меньшей мере одно другое средство (например, химиотерапевтическое, противоопухолевое или антиангиогенное средство), могут быть использованы в качестве
20 комбинированного лечения для одновременного, отдельного или последовательного введения при лечении рака. Другое средство может представлять собой любое средство, подходящее для лечения конкретного рассматриваемого рака, например, средство, выбранное из группы, включающей в себя алкилирующие средства, например, производные платины, такие как
25 цисплатин, карбоплатин и/или оксалиплатин; растительные алкалоиды, например, паклитаксел, доцетаксел и/или иринотекан; противоопухолевые антибиотики, например, доксорубицин (адриамицин), даунорубицин, эпирубицин, идарубицин, митоксантрон, дактиномицин, блеомицин, актиномицин, лютеомицин и/или митомицин; ингибиторы топоизомеразы, такие как топотекан; антиметаболиты, например, фторурацил и/или другие
30 фторпиримидины; FOLFOX; осимертиниб; циклофосфамид; антрациклин; дакарбазин; гемцитабин; или любую их комбинацию. В некоторых вариантах осуществления антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть,

композиция антител или биспецифическая связывающая молекула, описанные в настоящей заявке, восстанавливают чувствительность к другому средству.

[0135] Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула согласно настоящему изобретению также могут быть использованы в комбинации с другими противораковыми терапевтическими средствами, такими как вакцины, цитокины, ингибиторы ферментов, иммуностимулирующие соединения и Т-клеточная терапия. В случае вакцины это может быть, например, белковая, пептидная или ДНК-вакцина, содержащая один или несколько антигенов, которые имеют отношение к излечиваемому раку, или вакцина, содержащая дендритные клетки вместе с антигеном. Подходящие цитокины включают, например, IL-2, IFN-гамма и GM-CSF. Примером типа ингибитора фермента, обладающего противораковой активностью, является ингибитор индоламин-2,3-диоксигеназы (IDO), например, 1-метил-D-триптофан (1-D-MT). Также рассматривается адоптивная Т-клеточная терапия, которая относится к различным методам иммунотерапии, включающим расширение или создание собственных Т-клеток пациентов для распознавания и атаки их опухолей.

[0136] Также предполагают, что антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула согласно настоящему изобретению могут быть использованы в дополнительной терапии в сочетании с ингибиторами тирозинкиназы. Это синтетические молекулы с низкой молекулярной массой, в основном производные хиназолина, которые взаимодействуют с внутриклеточным тирозинкиназным доменом рецепторов и ингибируют лиганд-индуцированное фосфорилирование рецепторов, например, конкурируя за внутриклеточный участок связывания Mg-АТФ. В некоторых вариантах осуществления ингибитор тирозинкиназы представляет собой ингибитор AXL.

[0137] В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция антител или биспецифическая связывающая молекула могут быть использованы в комбинации с лекарственным препаратом/лекарственным средством, которое опосредует активацию иммунной системы, включая, но не ограничиваясь этим, средство, которое модулирует экспрессию или активность A2AR, A1AR, A2BR, A3AR, ADA, ALP, BTLA, B7-H3, B7-H4, CTLA-4, CD27, CD28, CD39, CD40, CD47,

CD55, CD73, CD122, CD137, CD160, CGEN-15049, CHK1, CHK2, CTLA-3, CEACAM (например, CEACAM-1 и/или CEACAM-5), EGFR, FLT3, FLT3L, GAL9, GITR, HVEM, LAG-3, LILRB1, LY108, LAIR1, ICOS, IDO, KIR, LAIR1, MET, NKG2A, PAP, PD-1/PD-L1/PD-L2, OX40, STING, TIGIT, TIM-3, TGFR-
5 бета, TLR, TNFR2, VEGF, VEGFR, VISTA, LILRB2, CMTM6 и/или 2B4. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой низкомолекулярный ингибитор. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который связывается с одной из вышеуказанных молекул. Также предполагают, что
10 антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, композиция антител, или биспецифическая связывающая молекула согласно настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с цитокином (например, IL-1, IL-2, IL-12, IL-15 или IL-21), ингибитором EGFR, ингибитором VEGF и т.д.

[0138] Настоящее изобретение также предусматривает использование
15 последовательностей (например, шести CDR или последовательностей VH и VL) антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, описанных в настоящей заявке, для получения химерного антигенного рецептора, который может быть использован в технологии CAR-T.

[0139] Понятно, что антитела и их антигенсвязывающие части, композиции
20 антител и биспецифические связывающие молекулы в соответствии с настоящим изобретением могут быть использованы в лечении, как описано в настоящей заявке, и/или могут быть использованы для изготовления лекарственного средства для лечения, описанного в настоящей заявке.

Доза и путь введения

[0140] Антитела или их антигенсвязывающие части, композиции антител
25 или биспецифические связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно вводить в количестве, эффективном для лечения рассматриваемого состояния, т.е. в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого результата. Терапевтически
30 эффективное количество может варьироваться в зависимости от таких факторов, как конкретное состояние, подлежащее лечению, возраст, пол и масса тела пациента, а также от того, вводят ли антитела в качестве самостоятельного лечения или в сочетании с одним или несколькими дополнительными видами противоракового лечения.

[0141] Режимы дозирования могут быть скорректированы для обеспечения оптимального желаемого ответа. Например, можно вводить один болюс, можно вводить несколько разделенных доз с течением времени или доза может быть пропорционально уменьшена или увеличена в соответствии с требованиями терапевтической ситуации. Особенно выгодно составлять парентеральные композиции в виде стандартной лекарственной формы для простоты введения и однородности дозировки. Единичная лекарственная форма, используемая в настоящей заявке, относится к физически дискретным единицам, подходящим в качестве единичных доз для пациентов/субъектов, подлежащих лечению; каждая единица содержит заранее определенное количество активного соединения, рассчитанное для получения желаемого терапевтического эффекта в сочетании с требуемым фармацевтическим носителем. Спецификация стандартных лекарственных форм в соответствии с настоящим изобретением, как правило, диктуется и напрямую зависит от (а) уникальных характеристик терапевтического средства и конкретного терапевтического или профилактического эффекта, который должен быть достигнут, и (б) ограничений, присущих данной области техники, составления такого активного соединения для лечения чувствительности у индивидуумов.

[0142] Таким образом, специалисту в данной области техники будет понятно, на основании представленного в настоящей заявке раскрытия, что доза и режим дозирования корректируют в соответствии со способами, хорошо известными в терапевтической области. То есть максимально переносимая доза может быть легко установлена, а также может быть определено эффективное количество, обеспечивающее поддающийся обнаружению терапевтический эффект у пациента, а также временные требования для введения каждого средства для обеспечения поддающегося обнаружению терапевтического эффекта у пациента. Соответственно несмотря на то, что в настоящей заявке приведены примеры определенных доз и режимов введения, эти примеры никоим образом не ограничивают дозы и режимы введения, которые могут быть предоставлены пациенту при использовании настоящего изобретения.

[0143] Следует отметить, что значения дозировки могут варьироваться в зависимости от типа и тяжести состояния, подлежащего облегчению, и могут включать в себя однократные или многократные дозы. Кроме того, следует понимать, что для любого конкретного субъекта конкретные режимы

дозирования должны корректироваться с течением времени в соответствии с индивидуальными потребностями и профессиональным мнением лица, вводящего или контролирующего введение композиций, и что диапазоны дозировок, указанные в настоящей заявке, являются примерными. только и не
5 предназначены для ограничения объема или применения воплощенной композиции. Кроме того, режим дозирования композиций согласно настоящему изобретению может основываться на множестве факторов, включая тип заболевания, возраст, массу тела, пол, состояние здоровья пациента, тяжесть состояния, способ введения и конкретное используемое антитело. Таким
10 образом, режим дозирования может варьироваться в широких пределах, но его можно определить рутинно с использованием стандартных методов. Например, дозы можно корректировать на основе фармакокинетических или фармакодинамических параметров, которые могут включать в себя клинические эффекты, такие как токсические эффекты и/или лабораторные показатели. Таким
15 образом, настоящее изобретение охватывает повышение дозы внутри пациента, как определено специалистом в данной области. Определение подходящих дозировок и схем хорошо известно в соответствующей области техники, и специалисту в данной области будет понятно, что они охватываются, как только будут предоставлены решения, раскрытые в настоящей заявке.

20 [0144] Эффективное количество для противоопухолевой терапии может быть измерено по его способности стабилизировать прогрессирующее заболевание и/или ослаблять симптомы у пациента и предпочтительно обращать вспять прогрессирующее заболевание, например, путем уменьшения размера опухоли. Способность антитела, антигенсвязывающей части, композиции
25 антитела или биспецифической связывающей молекулы в соответствии с настоящим изобретением ингибировать рак можно оценить с помощью анализов *in vitro*, например, например, как описано в примерах, а также на подходящих животных моделях, которые предсказывают эффективность при опухолях человека. Подходящие режимы дозирования будут выбраны для обеспечения
30 оптимального терапевтического ответа в каждой конкретной ситуации, например, при введении в виде однократного болюса или непрерывной инфузии с возможной корректировкой дозировки в зависимости от потребностей каждого случая.

[0145] Антитела или их антигенсвязывающие части, композиции антител или биспецифические связывающие молекулы согласно настоящему изобретению можно вводить любым способом введения пептидов, белков или антител, принятым в данной области, и обычно они подходят для парентерального введения. Используемый в настоящей заявке термин «парентеральное введение» включает любой способ введения, характеризующийся физическим повреждением ткани субъекта и введением через повреждение в ткань, что обычно приводит к прямому введению в кровотока, в мышцу или в внутренний орган. Таким образом, парентеральное введение включает в себя, но не ограничивается этим, введение путем инъекции, введение через хирургический разрез, введение через проникающую в ткань нехирургическую рану и т.п. В частности, предполагается, что парентеральное введение включает подкожную, внутрибрюшинную, внутримышечную, интрастернальную, внутрицистернальную, внутривенную, внутриартериальную, подоболочечную, внутриуретральную, внутричерепную, внутриопухолевую и интрасиновиальную инъекцию или инфузию, но не ограничивается ими. Конкретные варианты осуществления включают в себя внутривенный и подкожный пути введения.

Диагностические применения и композиции

[0146] Антитела и антигенсвязывающие части в соответствии с настоящим изобретением также можно использовать в диагностических способах (например, *in vitro*, *ex vivo*). Например, антитела и антигенсвязывающие части можно использовать для обнаружения и/или измерения уровня AXL в образце, взятом у пациента (например, образце ткани или образце жидкости организма, таком как воспалительный экссудат, кровь, сыворотка, кишечная жидкость, слюна или моча). Подходящие методы обнаружения и измерения включают иммунологические методы, такие как проточная цитометрия, твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), хемилюминесцентный анализ, радиоиммуноанализ и иммуногистологию. Настоящее изобретение дополнительно охватывает наборы (например, диагностические наборы), содержащие антитела и антигенсвязывающие части, описанные в настоящей заявке.

Производственные изделия и наборы

[0147] Настоящее изобретения также обеспечивает производственные изделия, например, наборы, включающие одну или несколько емкостей (например, одноразовых или многоразовых емкостей), содержащих фармацевтическую композицию антитела против AXL или его антигенсвязывающую часть, композицию или биспецифически связывающую молекулу, описанные в настоящей заявке, необязательно дополнительную биологически активную молекулу (например, другое терапевтическое средство) и инструкции по применению. Антитело или его антигенсвязывающая часть, композиция или биспецифически связывающая молекула, и необязательно дополнительная биологически активная молекула могут быть упакованы отдельно в подходящую упаковку, такую как флакон или ампула, изготовленные из нереакционноспособного стекла или пластика. В некоторых вариантах осуществления флакон или ампула содержат концентрированный раствор (например, 2х, 5х, 10х или более) антитела или антигенсвязывающей части, композиции или биспецифически связывающей молекулы и необязательно, биологически активной молекулы. В некоторых вариантах осуществления производственные изделия, такие как наборы включают в себя медицинское устройство для введения антитела или его антигенсвязывающей части, композиции или биспецифически связывающей молекулы и/или биологически активной молекулы (например, шприц и иглу); и/или подходящий разбавитель (например, стерильная вода и нормальный физиологический раствор). Настоящее изобретение также включает способы изготовления указанных изделий.

[0148] Если иное не определено в данной заявке, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь значения, обычно понятные специалистам в данной области техники. Типичные способы и материалы описаны ниже, хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящей заявке, также могут быть использованы на практике или при тестировании настоящего изобретения. В случае противоречия настоящее описание, включая определения, будет иметь преимущественную силу.

[0149] Как правило, номенклатура, используемая в связи с культурами клеток и тканей, молекулярной биологией, иммунологией, микробиологией,

генетикой, аналитической химией, синтетической органической химией, медицинской и фармацевтической химией, а также химией белков и нуклеиновых кислот и гибридизацией, и описанные в настоящей заявке хорошо известны и широко используются в данной области техники. Ферментативные реакции и методы очистки осуществляют в соответствии со спецификациями производителя, как это обычно делается в данной области или как описано в настоящей заявке.

[0150] Кроме того, если иное не требуется по контексту, термины в единственном числе должны включать множественное число, а термины во множественном числе должны включать единственное число. Во всем данном описании и вариантах осуществления слова «иметь» и «содержать» или варианты, такие как «имеет», «имеющий», «содержит» или «содержащий», будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа или группы целых чисел, но не исключение любого другого целого числа или группы целых чисел.

[0151] Все публикации и другие ссылки, упомянутые в настоящей заявке, полностью включены в качестве ссылки. Хотя здесь процитирован ряд документов, это цитирование не является признанием того, что какой-либо из этих документов составляет часть общеизвестных сведений в данной области техники.

[0152] Для того, чтобы настоящее изобретение могло быть лучше понято, приведены следующие примеры. Эти примеры предназначены только для целей иллюстрации и не должны рассматриваться как ограничивающие каким-либо образом объем настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1: Клонирование антител против AXL из В-клеток крысы

Материалы и способы

[0153] Антитела против AXL человека выделяли из спектра антител, полученных от крыс OmniRat[®] (Osborn и соавт., *J Immunol.* 190(4):1481-90 (2013)), трансгенная линия крыс от Ligand Pharmaceuticals Inc., которая продуцирует антитела с полностью человеческими идиотипами. Клонирование генов антител, полученных от крыс из одноклеточных сортированных В-клеток, секретирующих антитела (ASC), проводили с помощью технологии обнаружения антител Symplex[™] (Meijer и соавт., *J Mol Biol* 358(3):764-72 (2006)).

[0154] Конструкции спектра антител, полностью кодирующие иммуноглобулины человека в формате IgG₁-LALA (см. ниже), трансфицировали в клетки НЕК293. Клеточные супернатанты подвергали скринингу на связывание с AXL, экспрессированным на поверхности клеток CHO, с использованием проточной цитометрии в высокопроизводительном формате. AXL реакционноспособные клоны анализировали с помощью секвенирования ДНК и экстрагировали последовательности ДНК, кодирующие антитела. Выбранные клоны антител экспрессировали и функционально тестировали, как описано ниже.

[0155] Миссенс-мутации в аминоконцах тяжелых и легких цепей, которые были введены с использованием вырожденных праймеров при клонировании кодирующих антитела фрагментов кДНК с помощью Symplex™, корректировали до последовательности зародышевой линии. В таблице 1 показаны нуклеотидные последовательности переменных доменов тяжелой и легкой цепей антител с зародышевой линией, обозначенных 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883. Процесс коррекции включал коррекцию аминоконцевой последовательности до зародышевой линии, а также оптимизацию использования кодонов. Мишени для сопоставления с последовательностями зародышевой линии человека идентифицировали путем поиска гомологии кластеров для переменных областей тяжелой цепи и легкой цепи.

[0156] Антитела 23203_1, 23203_2, 23203_3 и 23203_4 представляют собой четыре варианта одного родительского переменного домена тяжелой цепи, которые были сконструированы для снижения потенциальных рисков, связанных с последовательностью IGHV4-34 зародышевой линии (т.е. мотивом AVY HFR1 и участком Nglyc в HCDR2).

[0157] Белковые последовательности переменных доменов, константных областей и определяющих комплементарность областей (CDR) антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883 показаны в Таблице 2, Таблице 3 и Таблице 4, соответственно.

Результаты

[0158] В таблице 1 представлены нуклеотидные последовательности, кодирующие переменные домены антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883.

Таблица 1: Нуклеотидные последовательности переменного домена антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883

Антитело	Последовательность (от 5' к 3')
23203_1 VH SEQ ID NO: 1	CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCAAGCGAGACACTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCTGGCGGCTCTTTTCTGGATATTAAGGAGCTGGATCAGACAGCCACCCGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACGCTGGCTCCACCAATTACAACCCCTCTCTGAAGAGCAGAGTGACCATCTCTGTGGATACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTAGCGTGACAGCCGCTGATACAGCCGTGTAATAATTGCTCTTCCCAGAGTACTCCTCTCGTTGGCACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTCTCGAGT
23203_1 VL SEQ ID NO: 2	GATATCCAGCTGACCCAGTCCCCTAGCTTCCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGATAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGGGCATCTCCTCTTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTATGCTGCCTCTACACTGCAGTCTGGCGTGCCATCCCGTTTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGAGTTCACACTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTCGCTACCTACTATGCCAGCAGCTGAACAGCTACCCTCTGACATTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
23203_2 VH SEQ ID NO: 11	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCTGGCCTGCTGAAGCCTTCTGAGACACTGTCTCTGACCTGTGCCGTGTATGGCGGCTCTTTTTCGGGCTATTAAGGAGCTGGATCAGACAGCCTCCAGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAATCACTCCGGCTCTACCAACTACAATCCATCCCTGAAGAGCAGAGTGACCATCTCCGTGGATACCTCCAAGAATCAGTTTTTCTCTGAAGCTGTCTCTGTGACAGCTGCTGATACCGCCGTGTAATAATTGCTCTAGCAGAGAGTACTCCTCTAGATGGCACTTCGATTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTCTCGAGT
23203_2 VL SEQ ID NO: 12	GATATCCAGCTGACCCAGTCCCCTAGCTTCCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGATAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGGGCATCTCCTCTTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTATGCTGCCTCTACACTGCAGTCTGGCGTGCCATCCCGTTTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGAGTTCACACTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTCGCTACCTACTATGCCAGCAGCTGAACAGCTACCCTCTGACATTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
23203_3 VH SEQ ID NO: 21	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCTGGCCTGCTGAAGCCTTCTGAGACACTGTCTCTGACCTGTACCGTGTCTGGCGGCTCTTTTTCGGGCTATTAAGGAGCTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACGCTGGCTCCACCAACTACAATCCCTTCCCTGAAGTCTAGAGTGACCATCTCCGTGGATACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCTGTGACCGCCGCTGATACAGCCGTGTAATAATTGCTCCAGCAGAGAGTACTCCTCTAGATGGCACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTCTCGAGT
23203_3 VL SEQ ID NO: 22	GATATCCAGCTGACCCAGTCCCCTAGCTTCCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGATAGAGTGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGGGCATCTCCTCTTACCTGGCTTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTATGCTGCCTCTACACTGCAGTCTGGCGTGCCATCCCGTTTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGAGTTCACACTGACCATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTCGCTACCTACTATGCCAGCAGCTGAACAGCTACCCTCTGACATTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
23203_4 VH SEQ ID NO: 31	CAGGTGCAGCTGCAGCAGTGGGGCGCTGGCCTGCTGAAGCCTTCTGAGACACTGTCTCTGACCTGTGCCGTGTATGGCGGCTCTTTTTCGGGCTATTAAGGAGCTGGATCAGGCAGCCACCTGGCAAGGGCTGGAGTGGATCGGCGAGATCAACCACGCTGGCTCCACCAACTACAATCCCTTCCCTGAAGTCTAGAGTGACCATCTCCGTGGATACCTCCAAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTGTCTCTGTGACCGCCGCTGATACAGCCGTGTAATAATTGCTCCAGCAGAGAGTACTCCTCTAGATGGCACTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACAGTCTCGAGT

Антитело	Последовательность (от 5' к 3')
23203_4 VL SEQ ID NO: 32	GATATCCAGCTGACCCAGTCCCTAGCTTCCTGTCTGCTTCCGTGGGCGATAGAG TGACCATCACATGTAGAGCCTCTCAGGGCATCTCCTCTTACCTGGCTTGGTATCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCTCCTAAGCTGCTGATCTATGCTGCCTCTACACTGCAG TCTGGCGTGCCATCCCGGTTTCAGCGGCTCTGGCAGCGGCACCGAGTTCACACTGA CCATCTCCTCTCTGCAGCCAGAGGATTTTCGCTACCTACTATTGCCAGCAGCTGAA CAGCTACCCTCTGACATTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
22995 VH SEQ ID NO: 41	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCAGCCTGGTGCAGCCGGCGGCTCTCTGA GACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTTACCTTCTCTTCATCCGCTATGTCTTGGGT GCGCCAAGCCCCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTACCATCTCCGGCAGCGAT TCTTCCACCTACGACGCTGATTCCGTGAAGGGCAGAAGCACAATCTCCAGGGACA ATTCCAAGAACACCCTGTATCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGATGACACCGC CGTGTATTACTGCGCTAAGAAGGGCGCTTATTGTTCCGGCACAATCTGCTACGAT CCCTTCGACTATTGGGGCCAGGGCACACTGGTGACCGTCTCGAGT
22995 VL SEQ ID NO: 42	GATATCGTGCTGACCCAGTCTCCAGTGCTGGCCGTGTCCCTGGGCCAGAGAGCTA CCATCTCTTGCAGAGCTTCTCAGTCCGTGTCTATCAGCTCCATCAACCTGATGCA TTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCAGCCAAAGCTGCTGATCTACAGAGCCAGC AACCTGGCTTCTGGCATCCAGCTAGATTCTCCGGCTCTGGCAGCGGCACAGATT TCACCCTGACAATCGATCCTGTGCAGGCTGACGATATCGCCGCTTATTACTGCCA GCAGTCCAGAGAGTCTCCTCTGACCTTTGGCGGCGGCACAAAGGTGGAGATCAAG
22883 VH SEQ ID NO: 51	GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGCGGCGGCCTGGTGCAGCCAGGCGGCTCTCTGA GACTGTCTTGTGCCGCTTCTGGCTTTACCTTCTCCTCTTACGCCATGTCTTGGGT GCGGCAAGCCCCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCTGCTATCTCCGGCGGCGGC GACTATACCTACTATGCCGACAGCGTGAAGGGCAGATTACCATCAGCAGGGACA ATTCCAAGAACACCCTGTACCTGCAGATGAACTCCCTGAGAGCTGAGGATACAGC CGTGTACTATTGCGCCAAGGAGGAGTGGGAGCTGAGAGGCCCATTTTCGGTATTGG GGCCAGGGCACACTGGTGACAGTCTCGAGT
22883 VL SEQ ID NO: 52	GACATCCAGATGACCCAGAGCCCTTCCACCCTGAGCGCCAGCGTCCGAGATAGAG TGACAATTACTTGCCGTGCCAGCCAGTCCATTTCCCTCTTGGCTGGCCTGGTACCA GCAGAAGCCTGGCAAGGCCCTAAGTTCCCTGATCTATAAAGCTTCTTCCCTGGAG TCTGGAGTCCCATCCAGGTTCTCCGGCTCTGGATCCGGAACCGAGTTTACCCTGA CAATCAGCTCTCTGCAGCCGACGATTTTGCCACATACTATTGTCAGCAGTATAA CGGGTTTAGTTGGACCTTCGGGCAGGGCACAAAAGTGGAGATCAAA

[0159] В Таблице 2 показаны выведенные аминокислотные последовательности антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995, 22883. CDR выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

5 Таблица 2: Аминокислотные последовательности вариабельного домена антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883.

Антитело	Последовательность (от N-конца к C-концу)
23203_1 VH SEQ ID NO: 3	QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGGSFSGYYWSWIRQPPGKGLEWIGE <u>INHAG</u> <u>STN</u> YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <u>CSSREYSSRWHF</u> DYWG QGTLVTVSS
23203_1 VL SEQ ID NO: 4	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCRAS <u>QGISSY</u> LAWYQKPKGKAPKLLIYAAS <u>TLQ</u> SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQLNSYPLTF</u> GGGKVEIK
23203_2 VH SEQ ID NO: 13	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WTWIRQPPGKGLEWIGE <u>INHSG</u> <u>STN</u> YNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <u>CSSREYSSRWHF</u> DYWG QGTLVTVSS

Антитело	Последовательность (от N-конца к C-концу)
23203_2 VL SEQ ID NO: 14	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSY</u> LAWYQQKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> TLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQLNSYPLTF</u> GGGKVEIK
23203_3 VH SEQ ID NO: 23	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCTVSV <u>GGSFSGYY</u> WTWIRQPPGKGLEWIGE <u>INHAG</u> <u>ST</u> NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <u>CSSREYSSRWHFDYWG</u> QGTLVTVSS
23203_3 VL SEQ ID NO: 24	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSY</u> LAWYQQKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> TLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQLNSYPLTF</u> GGGKVEIK
23203_4 VH SEQ ID NO: 33	QVQLQQWGAGLLKPSSETLSLTCAVY <u>GGSFSGYY</u> WTWIRQPPGKGLEWIGE <u>INHAG</u> <u>ST</u> NYNPSLKSRVTISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYY <u>CSSREYSSRWHFDYWG</u> QGTLVTVSS
23203_4 VL SEQ ID NO: 34	DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCRAS <u>QGISSY</u> LAWYQQKPGKAPKLLIY <u>AAS</u> TLQ SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYY <u>CQQLNSYPLTF</u> GGGKVEIK
22995 VH SEQ ID NO: 43	EVQLVESGGSLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSS</u> AMSWVRQAPGKLEWVST <u>ISGSD</u> <u>SST</u> YDADSVKGRSTISRDNKNTLYLQMNSLRADDTAVYY <u>CAKKGAYCSGTICYD</u> <u>PFDYW</u> QGTLVTVSS
22995 VL SEQ ID NO: 44	DIVLTQSPVLAVSLGQRATISCRAS <u>QSVSISSIN</u> LMHWYQQKPGQPKLLIY <u>RAS</u> NLASGIPARFSGSGSGTDFTLTIDPVQADDIAAYY <u>CQQSRESPLTF</u> GGGKVEIK
22883 VH SEQ ID NO: 53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS <u>GFTFSSY</u> AMSWVRQAPGKLEWVSA <u>ISGGG</u> <u>DY</u> TYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYY <u>CAKEEWELRGPFRYW</u> QGTLVTVSS
22883 VL SEQ ID NO: 54	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRAS <u>QSISW</u> LAWYQQKPGKAPKFLIY <u>KAS</u> SLE SGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYY <u>CQQYNGFSWTF</u> GGGKVEIK

[0160] В Таблице 3 показаны аминокислотные последовательности константных областей тяжелой и легкой цепей (CH и CL, соответственно). «IgG₁-LALA» относится к наличию мутаций «LALA» в тяжелой цепи (L234A/L235A, пронумерованы по схеме нумерации Кабата), которые, как известно, снижают эффекторную функцию области Fc антител IgG₁ (Hezareh и соавт., *J Virol.* 75(24):12161-68 (2001); Hessell и соавт., *Nature* 449(7158):101-04 (2007)).

Таблица 3: Аминокислотные последовательности константной области антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883

Фрагмент	Последовательность (от N-конца к C-концу)
IgG ₁ -LALA CH добавлено к VH SEQ ID NO: 61	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVTSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNN YTQKSLSLSPGK
Каппа CL добавлено к VL SEQ ID NO: 62	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE C

5 [0161] В таблице 4 показаны аминокислотные последовательности CDR тяжелой и легкой цепей антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883, где CDR определены в соответствии с системой IMGT[®]. SEQ ID NO последовательностей указаны в скобках.

Таблица 4: Аминокислотные последовательности CDR антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995, 22883

Ант	Последовательность (от N-конца к C-концу)					
	H-CDR1	H-CDR2	H-CDR3	L-CDR1	L-CDR2	L-CDR3
23203_1	GGSFSGYY (5)	INHAGST (6)	CSSREYSSRWHFDYW (7)	QGISSY (8)	AAS (9)	CQQLNSYPLTF (10)
23203_2	GGSFSGYY (15)	INHSGST (16)	CSSREYSSRWHFDYW (17)	QGISSY (18)	AAS (19)	CQQLNSYPLTF (20)
23203_3	GGSFSGYY (25)	INHAGST (26)	CSSREYSSRWHFDYW (27)	QGISSY (28)	AAS (29)	CQQLNSYPLTF (30)
23203_4	GGSFSGYY (35)	INHAGST (36)	CSSREYSSRWHFDYW (37)	QGISSY (38)	AAS (39)	CQQLNSYPLTF (40)
22995	GFTFSSSA (45)	ISGSDSST (46)	CAKKGAYCSGTICYDPFDYW (47)	QSVSISIN (48)	RAS (49)	CQQSRESPLTF (50)
22883	GFTFSSYA (55)	ISGGDYT (56)	CAKEEWELRGPFYRW (57)	QSISW (58)	KAS (59)	CQQYNGFSWTF (60)

10

[0162] В таблице 5 показана информация SEQ ID NO для антител 23203_1, 23203_2, 23203_3, 23203_4, 22995 и 22883. Если не указано иное, последовательности представляют собой аминокислотные последовательности.

Таблица 5: SEQ ID NO для антител 17303, 16040, 15833, 16154, 15888 и 15948

Название	VH нт	VL нт	VH ак	VL ак	H- CDR1	H- CDR2	H- CDR3	L- CDR1	L- CDR2	L- CDR3
23203_1	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
23203_2	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
23203_3	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
23203_4	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
22995	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50
22883	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60

нт: нуклеотид

ак: аминокислота

5

Пример 2: Измерение аффинности антител к AXL человека и яванского макака

[0163] Этот пример показывает связывание антител против AXL с рекомбинантными внеклеточными доменами (ECD) AXL человека и яванского макака, что измеряется с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

Материалы и способы

[0164] Анализ кинетического связывания проводили методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR) с использованием микроспоттера с непрерывным потоком (CFM, Wasatch Microfluidics, Солт-Лейк-Сити, США) в сочетании с прибором IBIS MX96 SPR (IBIS Technologies, Нидерланды).

[0165] Меченый His ECD AXL человека и яванского макака экспрессировали в клетках Expi293F и очищали с помощью хроматографии Ni-NTA. Кинетику связывания измеряли в условиях одновалентного антигена путем иммобилизации антител против AXL и выдерживания одновалентного антигена AXL в растворе. Антитела захватывали на G-a-hu-IgG Fc SensEye® (Ssens BV, Нидерланды) в течение 15 минут с использованием микроспоттера с непрерывным потоком Continuous Flow Microspotter (CFM, Wasatch Microfluidics, Солт-Лейк-Сити, США). После нанесения SensEye® помещали в биосенсор IBIS MX96, а захваченные белки фиксировали на поверхности с помощью набора FixIT (Ssens BV, Нидерланды). Кинетический анализ выполняли, применяя серию кинетического титрования (Karlsson и соавт., Anal Biochem. 349(1):136-47 (2006)) с инъекциями антигена при возрастающих

20

25

концентрациях от 0,14 нМ до 100 нМ. Ассоциацию и диссоциацию антигена проводили в течение 15 минут. После каждой серии инъекций антигена поверхность регенерировали посредством 100 мМ H₃PO₄, буфера для регенерации pH 3. Зарегистрированные реакции связывания были

5 приспособлены к простой модели связывания Ленгмюра 1:1 с программным обеспечением Scrubber 2 для расчета констант скорости включения (k_{on} или k_a), скорости диссоциации (k_{off} или k_d) и аффинности (K_D).

Результаты

10 [0166] Результаты измерений аффинности демонстрируют, что все антитела 22995, 22883 и 23203 и их версии связывают ECD AXL человека и яванского макака с различной аффинностью. Подробная кинетика связывания представлена в Таблице 6 ниже.

Таблица 6: Кинетика связывания mAb против AXL с ECD AXL человека и яванского макака, измеренная с помощью SPR

Антитело	AXL ECD	k_{on} (M ⁻¹ s ⁻¹)	k_{off} (s ⁻¹)	K_D (M)
22995	Человек	8.2E+05	5.7E-04	6.9E-10
22995	Яванский макак	1.4E+04	1.1E-03	8.0E-08
22883	Человек	3.2E+04	3.1E-04	9.6E-09
22883	Яванский макак	2.8E+04	2.0E-04	7.2E-09
23203_1	Человек	1.4E+05	2.1E-03	1.5E-08
23203_1	Яванский макак	1.8E+05	2.4E-03	1.3E-08
23203_2	Человек	1.4E+05	1.6E-03	1.1E-08
23203_2	Яванский макак	1.1E+05	1.6E-03	1.5E-08
23203_3	Человек	1.1E+05	1.6E-03	1.5E-08
23203_3	Яванский макак	1.4E+05	1.8E-03	1.3E-08
23203_4	Человек	9.0E+04	2.3E-03	2.5E-08
23203_4	Яванский макак	1.5E+05	2.1E-03	1.5E-08

15 **Пример 3: Клонирование аналогов эталонных антител против AXL**

[0167] В Таблице 7 представлена информация о трех антителах против AXL, использованных в качестве эталонов в примерах. Аналог 10G5 (BerGenBio) продуцировался как в IgG₁, так и в IgG₁-LALA, поэтому он указан в двух строках таблицы.

20

Материалы и способы

[0168] Аминокислотные последовательности, кодирующие вариабельные домены тяжелой и легкой цепей аналогов антител в Таблице 6, были получены из перечисленных патентов или патентных заявок. Белковые последовательности
5 были обратно транслированы в последовательности ДНК с использованием кодонов человека. Соответствующие последовательности ДНК синтезировали и клонировали в экспрессионные векторы, содержащие константные области тяжелой или легкой цепи человека, что приводило к экспрессии полноразмерных цепей антител. Изотип человеческого антитела, выбранный для экспрессии,
10 указан в столбце формата антитела. Клетки CHO трансфицировали полученными экспрессионными плазидами с использованием стандартной системы экспрессии белка. Соответствующие супернатанты антител очищали с использованием стандартной колоночной хроматографии для очистки белка А.

Таблица 7: Перечень аналогов генно-синтезированных антител и
15 соответствующий формат антител

Антитело (Разработчик)	Формат антитела	Источник
Аналог Ax225 IgG ₁ -LALA (Chugai)	IgG ₁ -LALA	Публикация патента США 2015/9175091B2 (SEQ ID NO: 3 и 7)
Аналог YW327.6S2 IgG ₁ -LALA (Genentech)	IgG ₁ -LALA	Публикация патента США 2014/8853369B2 (SEQ ID NO: 103 и 104)
Аналог 10G5 (BerGenBio)	IgG ₁	Публикация патента США 2017/0349658A1 (SEQ ID NO: 22 и 45)
Аналог 10G5 (BerGenBio)	IgG ₁ -LALA	Публикация патента США 2017/0349658A1 (SEQ ID NO: 22 и 45)

Пример 4: Связывание *in vitro* антител против AXL с клетками CHO-S, временно трансфицированными посредством AXL человека или яванского макака

20 Материалы и способы

[0169] Шесть антител против AXL человека и аналогов эталонных антител оценивали с помощью проточной цитометрии на связывание *in vitro* с
внеклеточным доменом AXL человека или яванского макака, временно экспрессированным на клетках CHO-S. Для сравнения в оценку были включены
25 эталонные аналоги антител. Все антитела инкубировали в серийных разведениях вместе с временно трансфицированными клетками CHO-S в течение 30 мин. при 4°C. После двух стадий промывки клетки инкубировали с конъюгированным

AF647 вторичным антителом против человеческого IgG (H+L) в течение 30 мин. при 4°C. Заключительный этап промывки был выполнен перед получением клеток на скринере iQue Plus. Результаты были рассчитаны с помощью программного обеспечения GrafPad Prism.

5 Результаты

10 [0170] Кривые доза-реакция связывания антитела с ECD AXL человека или яванского макака, экспрессированными на временно трансфицированных клетках CHO-S, показаны на Фиг. 1А - 1С. Все шесть антител против AXL человека связывают AXL как человека (Фиг. 1А), так и яванского макака (Фиг. 1В) с различной активностью и эффективностью. Для сравнения показаны два эталонных антитела. Ни одно из антител не связывается с псевдотрансфицированными клетками (Фиг. 1С).

Пример 5: Скрининг функциональной активности антител против AXL *in vitro* в анализе пролиферации H1299

15 [0171] В этом примере описан функциональный скрининг *in vitro* панели моноклональных антител против AXL с целью характеристики их функциональности в отсутствие или в присутствии лиганда GAS6. Антитела оценивали на их способность ингибировать индуцированную GAS6 пролиферацию, а также на их агонистическую активность в отсутствие GAS6 в 20 экспрессирующей AXL линии раковых клеток H1299. Аналоги эталонных антител были включены для сравнения.

Материалы и способы

25 [0172] Отобранные антитела против AXL оценивали *in vitro* на их способность ингибировать пролиферацию экспрессирующей AXL линии раковых клеток H1299. Клетки H1299 высевали по 2500 клеток/лунку в 384-луночный планшет в среде RPMI 1640 GlutaMax с добавлением 2% FBS и 1% P/S, и инкубировали в течение шести дней во влажном инкубаторе при 37°C с антителами в концентрации до 25 мкг/мл, без GAS6 или в присутствии GAS6 (RnD Systems) при 1 мкг/мл. Пролиферацию клеток количественно определяли с 30 использованием реагента для пролиферации клеток WST-1 (Roche) в соответствии с инструкциями производителя. Для сравнения были включены несколько конкурирующих аналогов (аналог Ax225 IgG₁-LALA (Chugai), аналог YW327.6S2 IgG₁-LALA (Genentech) и аналог 10G5 IgG₁-LALA (BerGenBio)).

Результаты

[0173] Результаты скрининга пролиферации показаны на Фиг. 2. Очевидно, что антитела можно разделить на основе функционального считывания. Из исследованных аналогов-конкурентов 10G5 IgG₁-LALA (BerGenBio) и YW327.6S2 IgG₁-LALA (Genentech) проявляли явную агонистическую активность, в то время как Ax225 IgG₁-LALA (Chugai) не проявлял активности ни в отсутствие, ни в присутствии GAS6.

[0174] Антитела, не проявляющие агонизма при отсутствии GAS6, были отобраны для дальнейшей функциональной характеристики с упором на редкие антитела, обладающие либо выраженным противодействием, либо усилением вызванной GAS6 пролиферации (обозначены пунктирной линией на фигуре).

Пример 6: Функциональная активность *in vitro* антител против AXL в анализе пролиферации H1299

[0175] В этом примере описана функциональная оценка *in vitro* шести моноклональных антител против AXL с целью демонстрации дозозависимой антагонистической активности. Антитела оценивали на их способность ингибировать индуцированную GAS6 пролиферацию, а также на их агонистическую активность в отсутствие GAS6 в клеточной линии H1299, экспрессирующей AXL. Аналоги эталонных антител были включены для сравнения.

Материалы и способы

[0176] Отобранные антитела против AXL более подробно оценивали *in vitro* на их способность индуцировать пролиферацию экспрессирующей AXL линии раковых клеток H1299. Клетки H1299 высевали в среду RPMI 1640 GlutaMax с добавлением 2% FBS и 1% P/S, и инкубировали в течение шести дней с двукратным титрованием указанных антител, начиная с 25 мкг/мл, или без GAS6, или в присутствии GAS6 (RnD Systems) при 1 мкг/мл. Пролиферацию клеток количественно определяли с использованием реагента для пролиферации клеток WST-1 (Roche) в соответствии с инструкциями производителя.

Результаты

[0177] Шесть антител против AXL оценивали на их способность ингибировать индуцированную GAS6 пролиферацию клеток линии H1299, экспрессирующих AXL, а также на их агонистическую активность при отсутствии GAS6 (Фиг. 3). Четыре антитела (23203_1, 23203_2, 23203_3 и

23203_4) проявляли дозозависимую антагонистическую активность, о чем свидетельствует их способность эффективно блокировать индуцированную GAS6 пролиферацию клеток H1299 (верхняя панель) и отсутствие у них агонистической активности при отсутствии GAS6 (нижняя панель). Ни одно из других протестированных антител не было способно блокировать индуцированную GAS6 пролиферацию (верхняя панель). Аналог YW327.6S2 IgG₁-LALA и аналоги Ax225 IgG₁-LALA были агонистами при отсутствии GAS6, о чем свидетельствует сильная индукция пролиферации (нижняя панель).

10 **Пример 7: Функциональная активность *in vitro* антител против AXL в анализе поглощения липосом**

[0178] В этом примере описывается функциональная оценка *in vitro* шести моноклональных антител против AXL с целью демонстрации дозозависимой антагонистической активности.

Материалы и способы

15 [0179] Отобранные антитела против AXL и аналоги эталонных антител были более подробно оценены *in vitro* на их способность ингибировать индуцированное GAS6 поглощение фосфатидилсеринсодержащих липосом в клетках MDA-MB-468-AXL, стабильно экспрессирующих экзогенный AXL. Липосомы готовили путем смешивания и гидратации молярных соотношений липидов POPC (1-пальмитоил-2-олеил-sn-глицеро-3-фосфохолин; 43%), DOPS (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфо-L-серин (натриевая соль); 11%), DOPE (1,2-диолеил-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин; 5%), холестерин (40%), DOPE-NBD (1,2-диолеил--{ 12-[(7-нитро-2-1,3-бензоксадиазол-4-ил)амино]додеканоил}-sn-глицеро-3-фосфоэтаноламин; 1%) (Avanti Polar Lipids) с последующими циклами замораживания/оттаивания и экструзией через нуклеопорные фильтры (400 нм, Millipore), по существу, как описано (Ishimoto, Biochem. 127(3):411-7 (2000)). Клетки MDA-MB-468-AXL высевали в среду DMEM с 2% FBS и 1% P/S за день до анализа. На следующий день к клеткам добавляли GAS6 (R&D systems, 1 мкг/мл), липосомы (25 мкМ), антитела против AXL и эталонные антитела, а также контрольные антитела. Антитела титровали 4-кратно от 6 мкг/мл. Поглощение измеряли и анализировали с использованием платформы автоматизированного микроскопа IncuCyte.

Результаты

[0180] Результаты анализа поглощения липосом показаны на Фиг. 4.

Очевидно, что ингибирующая функция антител зависит от концентрации и что все антитела ингибируют индуцированное GAS6 поглощение липосом, содержащих фосфатидилсерин, хотя и с различной активностью и эффективностью. Аналог YW327.6S2 IgG₁-LALA (Genentech) проявляет антагонистическую активность, в то время как аналоги Ax225 IgG₁-LALA (Chugai) и 10G5 IgG₁-LALA (BerGenBio) не проявляют функциональности.

Пример 8: Эффективность *in vivo* антител против AXL в модели ксеногенной опухоли

[0181] Этот пример демонстрирует эффективность *in vivo* антител 22995 и 23203_2 в модели ксеногенной опухоли.

Материалы и способы

[0182] 1×10^7 клеток рака молочной железы человека MDA-MB-231 инокулировали подкожно вместе с матригелем в бока 6-8-недельных самок мышей NOD.Scid. Опухоли измеряли штангенциркулем три раза в неделю в двух измерениях, и объем опухоли в мм³ рассчитывали по формуле: (ширина)² x длина x 0,5. При среднем размере опухоли 40 мм³ мышей рандомизировали и начинали лечение. Мышей лечили три раза в неделю, всего шесть раз путем внутрибрюшинной инъекции буфера-лекарственной основы или одного из двух моноклональных антител 22995 или 23203_2 с последующим периодом наблюдения. Лечение антителами проводили в дозе 10 мг/кг или 50 мг/кг. Двусторонний ANOVA с тестом множественных сравнений Бонферрони был применен для сравнения объемов опухоли в каждый момент времени между группами лечения. Статистический анализ проводили с использованием GraphPad Prism версии 5.0 (GraphPad Software, Inc.).

Результаты

[0183] На 20-й день после инокуляции при среднем размере опухоли 40 мм³, мышей рандомизировали на пять групп по десять животных и начинали лечение. Результаты показали сильное противоопухолевое ингибирующее действие обоих моноклональных антител против AXL (22995 и 23203_2) в тестируемой модели опухоли (**** P<0,0001) (Фиг. 5A и 5B).

Пример 9: Биннинг эпитопов антител против AXL

[0184] В этом примере описан анализ перекрестной конкуренции антител против AXL 23203-1, 22995 и 22883 и аналогов 10G5 и YW327.6S2 IgG1-LALA, измеренной с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

5 Неблокирующие отношения между антителами указывают на то, что они распознают разные эпитопы AXL.

Материалы и способы

[0185] Изучение конкуренции парных антител проводили методом SPR на приборе IBIS-MX96 (IBIS, Нидерланды). Антитела против AXL наносили на G-a-hu-IgG Fc SensEye[®] путем захвата в течение 15 минут с помощью микроспоттера с непрерывным потоком, с последующим блокированием остаточных сайтов связывания герцептином (трастузумаб) и химическим перекрестным связыванием с помощью набора SensEye FixIt (IBIS, Нидерланды). После подготовки сенсора был проведен анализ конкуренции антител с

15 использованием классического сэндвич-анализа. Рекомбинантный антиген AXL-His ECD вводили в концентрации 100 нМ и захватывали массивом конъюгированных антител против AXL. Затем выполняли отдельные инъекции каждого из антител AXL, разведенных до 100 нМ в рабочем буфере, для установления паттернов конкуренции антител. Рекомбинантный лиганд AXL,

20 GAS6 (100 нМ), был включен в качестве аналита для характеристики антител, блокирующих лиганд. Данные анализировали с помощью программы Epitope Binning 2.0 (Wasatch, США).

Результаты

[0186] На фиг. показаны нормализованные значения связывания указанных

25 антител или лиганда AXL, GAS6, с ECD AXL, предварительно связанным с массивом иммобилизованных антител против AXL на поверхности биосенсора. Иммобилизованные антитела представлены в виде строк, а антитела в растворе - в виде столбцов. Неплокирующие (слоистые) антитела показаны белым цветом, а блокирующие антитела — серым.

30 **[0187]** Аналоги 10G5 и YW327.6S2, испытанные в обоих направлениях, оказались самоблокирующимися. Все протестированные антитела блокировали GAS6, за исключением контрольного антитела, о котором известно, что он не блокирует лиганд. Ни одно из протестированных антител 22995, 23203-1 и 22883

не конкурировало с аналогом YW327.6S2 IgG1-LALA, и только одно антитело, 22883, конкурировало с аналогом 10G5.

[0188] В заключение, данные показывают, что антитела 22995 и 23203-1 распознают другие эпитопы на ECD AXL, чем аналоги 10G5 и YW327.6S2 IgG1-LALA.

Пример 10: Антитело против AXL, связывающееся с мутантами химерного домена AXL

[0189] В этом примере описано связывание антител против AXL с рекомбинантным химерным ECD AXL, где домены последовательности мышинового AXL были заменены на последовательность AXL человека. Связывание антител против AXL с химерными белками измеряли с помощью интерферометрии биослоев (BLI) для определения доменов AXL, связанных с антителами 23203-1, 22995, аналогом 10G5 и аналогом YW327.6S2 IgG1-LALA.

Материалы и способы

[0190] Белковые последовательности AXL человека и мыши загружали с UniProt (регистрационные номера P30530 и Q80YQ3, соответственно). Химерные белки были получены путем замены Ig1-2 и Fn-1-2 в ECD AXL мыши человеческими аналогами, как показано на фиг. 7. Меченые His конструкции AXL дикого типа и мутантные конструкции AXL человека были созданы с помощью стандартных методов синтеза генов, и белки были временно экспрессированы с использованием системы экспрессии ExpiCHO™. Связывание антител с захваченными химерными белками измеряли с помощью BLI с использованием прибора Octet QK384. Меченые His химерные белки улавливали из супернатанта предварительно уравновешенными биосенсорами Anti-Penta-HIS (HIS1K) (Sartorius) в течение 10 мин. Ассоциацию антител против AXL измеряли в течение 10 мин. в условиях насыщения. Сенсоры регенерировали в 10 мМ глицина, pH 1,5, в течение 5 с x 3. Данные анализировали в ForteBio Data Analysis 8.2 путем вычитания эталонных поверхностных уровней, и ответы определяли количественно в конце ассоциации антител.

Результаты

[0191] На Фиг. 7 показаны нормализованные ответы (нм) связывания указанных антител с захваченными химерными белками ECD AXL человека/мыши.

[0192] Все антитела связывали полноразмерный ECD AXL человека (HuAxl_ECD), состоящий из двух доменов, подобных иммуноглобулинам (Ig1 и Ig2), за которыми следуют два домена, подобных фибронектину типа 3 (Fn1 и Fn2). Аналог YW327.6S2 перекрестно реагирует с мышинным AXL и связывает
5 все химерные белки, демонстрируя, что белковые конструкции в целом функциональны (Ye и соавт., *Oncogene* 29:5254–5264 (2010)). И антитело 22995, и аналог 10G5 связывались с доменом Ig1 AXL, тогда как антитело 23203-1 связывалось с доменом Ig2.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, при этом антитело связывается с тем же эпитопом AXL человека, что и антитело,

5 содержащее:

а) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62; или

10 б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

в) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61 и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

15 г) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

20 д) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62;

е) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

25 2. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

30 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 45-47, соответственно;

ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 43;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;
или

iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные
последовательности SEQ ID NO: 43 и 61; и

5 б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 48-50,
соответственно;

10 ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную
последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной
последовательности SEQ ID NO: 44;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44;
или

15 iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности
SEQ ID NO: 44 и 62.

3. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 1, в
котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

20 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 15-17,
соответственно;

25 ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий
аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 13;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
или

iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные
последовательности SEQ ID NO: 13 и 61; и

30 б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 18-20,
соответственно;

ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
5 или

iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62.

4. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 1, в
10 котором

a) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 5-7,
соответственно;

ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий
15 аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3;
или

iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные
20 последовательности SEQ ID NO: 3 и 61; и

б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 8-10,
25 соответственно;

ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
30 или

iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62.

5. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

5 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 25-27, соответственно;

 ii) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23;

10 iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23; или

 iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61; и

 б) легкая цепь указанного антитела содержит:

15 i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 28-30, соответственно;

 ii) вариабельный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 24;

20 iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 24; или

 iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62.

25 6. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 1, в котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

30 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3 содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 35-37, соответственно;

 ii) вариабельный домен тяжелой цепи (VH), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 33;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33;
или

iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные
последовательности SEQ ID NO: 33 и 61; и

5 б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 38-40,
соответственно;

10 ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную
последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной
последовательности SEQ ID NO: 34;

iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;
или

15 iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности
SEQ ID NO: 34 и 62.

7. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 1, в
котором

а) тяжелая цепь указанного антитела содержит:

20 i) определяющие комплементарность области тяжелой цепи (H-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 55-57,
соответственно;

25 ii) переменный домен тяжелой цепи (VH), содержащий
аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную
аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 53;

iii) VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 53;
или

iv) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные
последовательности SEQ ID NO: 53 и 61; и

30 б) легкая цепь указанного антитела содержит:

i) определяющие комплементарность области легкой цепи (L-CDR)-1-3
содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 58-60,
соответственно;

ii) переменный домен легкой цепи (VL), содержащий аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54;

5 или
iii) VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54;

iv) легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

10 8. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть, где указанное антитело содержит аминокислотные последовательности H-CDR1-3 и L-CDR1-3:

- 15 а) SEQ ID NO: 45-50, соответственно;
б) SEQ ID NO: 15-20, соответственно;
в) SEQ ID NO: 5-10, соответственно;
г) SEQ ID NO: 25-30, соответственно;
д) SEQ ID NO: 35-40, соответственно; или
е) SEQ ID NO: 55-60, соответственно.

20 9. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 8, где указанное антитело содержит аминокислотную последовательность переменного домена тяжелой цепи и аминокислотную последовательность переменного домена легкой цепи, которые по меньшей мере на 90% идентичны аминокислотным последовательностям:

- 25 а) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно;
б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
в) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
г) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
д) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно; или
е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

30 10. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 8, где указанное антитело содержит переменный домен тяжелой цепи и переменный домен легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности:

- а) SEQ ID NO: 43 и 44, соответственно;
б) SEQ ID NO: 13 и 14, соответственно;
в) SEQ ID NO: 3 и 4, соответственно;
г) SEQ ID NO: 23 и 24, соответственно;
5 д) SEQ ID NO: 33 и 34, соответственно; или
е) SEQ ID NO: 53 и 54, соответственно.

11. Антитело против AXL по одному из пп. 1 - 10, где антитело представляет собой IgG.

10

12. Антитело против AXL по п. 11, где антитело представляет собой IgG₁.

13. Антитело против AXL по одному из пп. 1-12, при этом антитело содержит по меньшей мере одну мутацию в области F_C.

15

14. Антитело против AXL по одному из пп. 1 - 10, где антитело представляет собой IgG₁ и содержит мутацию в одном или обоих положениях 234 и 235 аминокислот, которые пронумерованы в соответствии со схемой нумерации IMGT[®].

20

15. Антитело против AXL по п. 14, в котором один или оба аминокислотных остатка в положениях 234 и 235 заменены с Leu на Ala.

16. Антитело против AXL, которое содержит:

25

а) тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 43 и 61 и легкую цепь (LC), содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 44 и 62;

30

б) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 13 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 14 и 62;

в) HC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 3 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 4 и 62;

г) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 23 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 24 и 62;

д) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 33 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 34 и 62; или

е) НС, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 53 и 61 и LC, содержащую аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 54 и 62.

10

17. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по одному из пп. 1 - 16, при этом антитело или его антигенсвязывающая часть обладают по меньшей мере одним свойством, выбранным из следующих:

а) связывается с AXL человека с K_D 3×10^{-8} М или менее;

б) связывается с AXL яванского макака с K_D 8×10^{-8} М или менее;

в) не связывается с AXL мыши;

г) связывается с доменом Ig1 или Ig2 AXL человека;

д) ингибирует связывание GAS6 с AXL человека;

е) ингибирует пролиферацию клеток H1299 *in vitro* в присутствии GAS6;

ж) не проявляет агонистической активности в отсутствие GAS6;

з) ингибирует индуцированное GAS6 поглощение

фосфатидилсеринсодержащих липосом в клетках MDA-MB-468-AXL, стабильно экспрессирующих экзогенный AXL; и

и) ингибирует рост опухоли *in vivo*.

25

18. Антитело против AXL или его антигенсвязывающая часть по п. 17, при этом антитело или антигенсвязывающая часть обладает по меньшей мере двумя, тремя, четырьмя, пятью, шестью, семью, восемью или всеми указанными свойствами.

30

19. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело против AXL или его антигенсвязывающую часть по одному из пп. 1 - 18 и фармацевтически приемлемый носитель.

20. Фармацевтическая композиция по п. 19, дополнительно содержащая иммуностимулирующее средство, вакцину, химиотерапевтическое средство, противоопухолевое средство, антиангиогенное средство или ингибитор тирозинкиназы.

5

21. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты, содержащая нуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или нуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, или и то и другое, антитела против AXL по одному из пп. 1 - 18.

10

22. Выделенная молекула нуклеиновой кислоты по п. 21, при этом указанная молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность любой из ID NO: 41, 42, 11, 12, 1, 2, 21, 22, 31, 32, 51 и 52.

15

23. Вектор, содержащий выделенную молекулу нуклеиновой кислоты по п. 21 или 22, при этом указанный вектор дополнительно содержит последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с нуклеотидной последовательностью.

20

24. Клетка-хозяин, содержащая нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь или ее антигенсвязывающую часть, и нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь или ее антигенсвязывающую часть, антитела против AXL по одному из пп. 1 - 18.

25

25. Способ получения антитела против AXL или его антигенсвязывающей части, включающий в себя получение клетки-хозяина по п. 24, культивирование указанной клетки-хозяина в условиях, подходящих для экспрессии антитела или его части, и выделение полученного антитела или его части.

30

26. Биспецифически связывающая молекула, содержащая антигенсвязывающую часть одного или двух различных антител против AXL по одному из пп. 1 - 18.

27. Способ лечения рака у пациента, включающий в себя введение
указанному пациенту терапевтически эффективного количества антитела против
AXL или его антигенсвязывающей части по одному из пп. 1 - 18,
фармацевтической композиции по п. 19 или 20 или биспецифически
5 связывающей молекулы по п. 26.

28. Способ по п. 27, отличающийся тем, что рак находится в ткани,
выбранной из группы, включающей в себя кожу, легкие, кишечник, толстую
кишку, яичник, головной мозг, предстательную железу, почки, мягкие ткани,
10 систему кроветворения, голову и шею, печень, кости, мочевого пузыря,
молочную железу, желудок, матку, шейку матки и поджелудочную железу.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что рак представляет собой
меланому, рак головы и шеи, глиобластому, рак щитовидной железы,
15 немелкоклеточный рак легкого, рак молочной железы (например, трижды
негативный рак молочной железы), рак поджелудочной железы, рак яичников,
рак шейки матки, карциному фаллопиевых труб, первичную перитонеальную
карциному, рак эндометрия, уротелиальную карциному, почечно-клеточную
карциному, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак предстательной железы,
20 мезотелиому, плоскоклеточный рак, саркому, хронический миелоидный лейкоз,
острый миелоидный лейкоз, хронический лимфолейкоз, малый лимфоцитарный
лейкоз, миелодиспластический синдром или лимфому Ходжкина.

30. Способ по одному из пп. 27 - 29, дополнительно включающий себя
25 введение пациенту иммуностимулирующего средства, вакцины,
химиотерапевтического средства, противоопухолевого средства,
антиангиогенного средства, ингибитора тирозинкиназы или лучевую терапию.

31. Применение антитела против AXL или его антигенсвязывающей части
30 по одному из пп. 1 - 18, фармацевтическая композиция по п. 19 или 20, или
биспецифически связывающая молекула по п. 26 для изготовления
лекарственного средства для лечения рака у пациента в способе по одному из пп.
27 - 30.

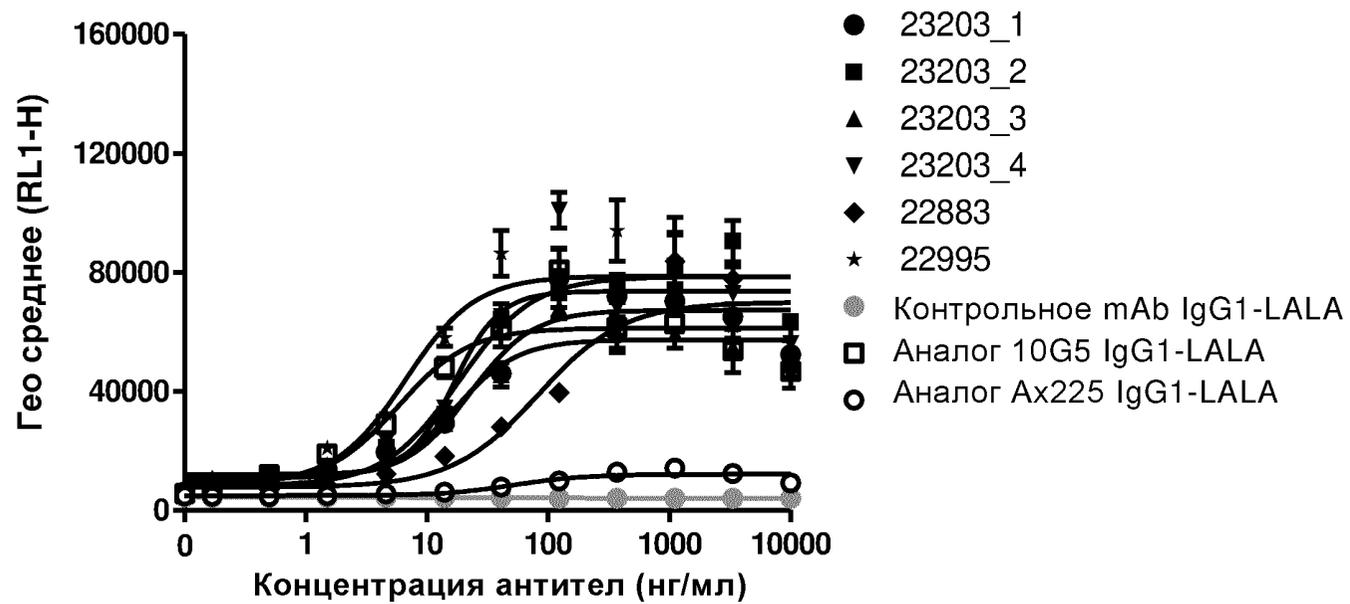
32. Антитело или его антигенсвязывающая часть по одному из пп. 1 - 18, фармацевтическая композиция по п. 19 или 20, или биспецифически связывающая молекула по п. 26, для применения в лечении рака у пациента способом по одному из пп. 27-30.

5

33. Способ по одному из пп. 27-30, применение по п. 31, или антитело или его антигенсвязывающая часть для применения, фармацевтическая композиция для применения, или биспецифически связывающая молекула для применения по п. 32, при этом пациентом является человек.

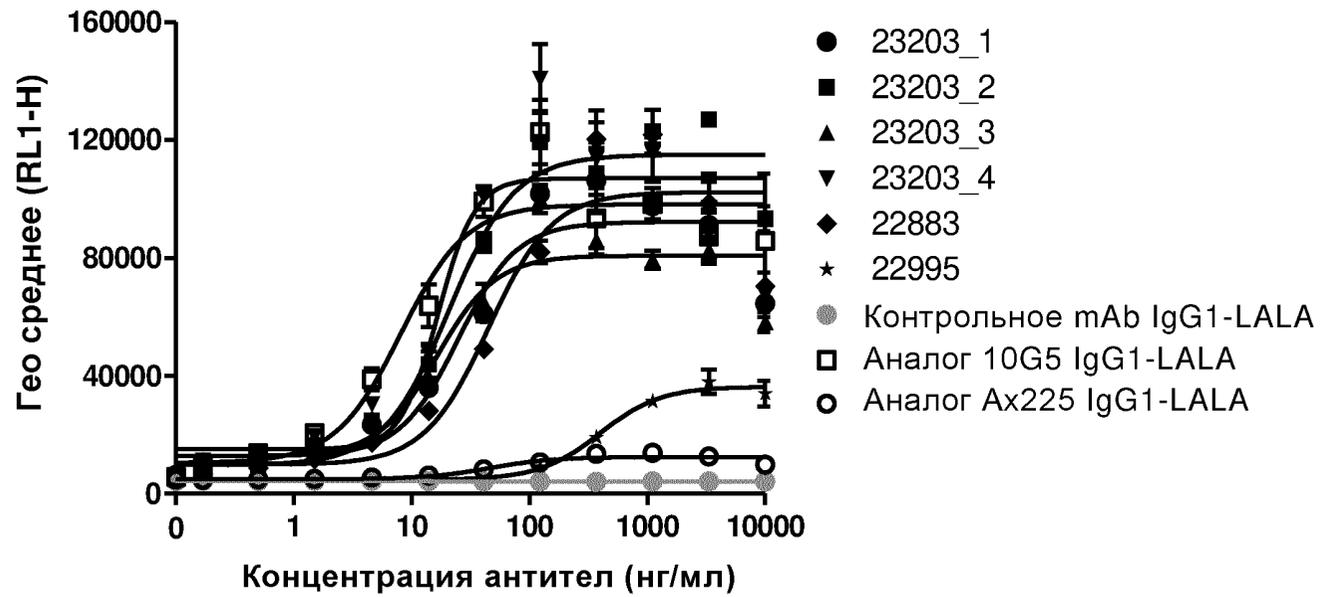
10

AXL человека



ФИГ. 1А

АХЛ яванского макака

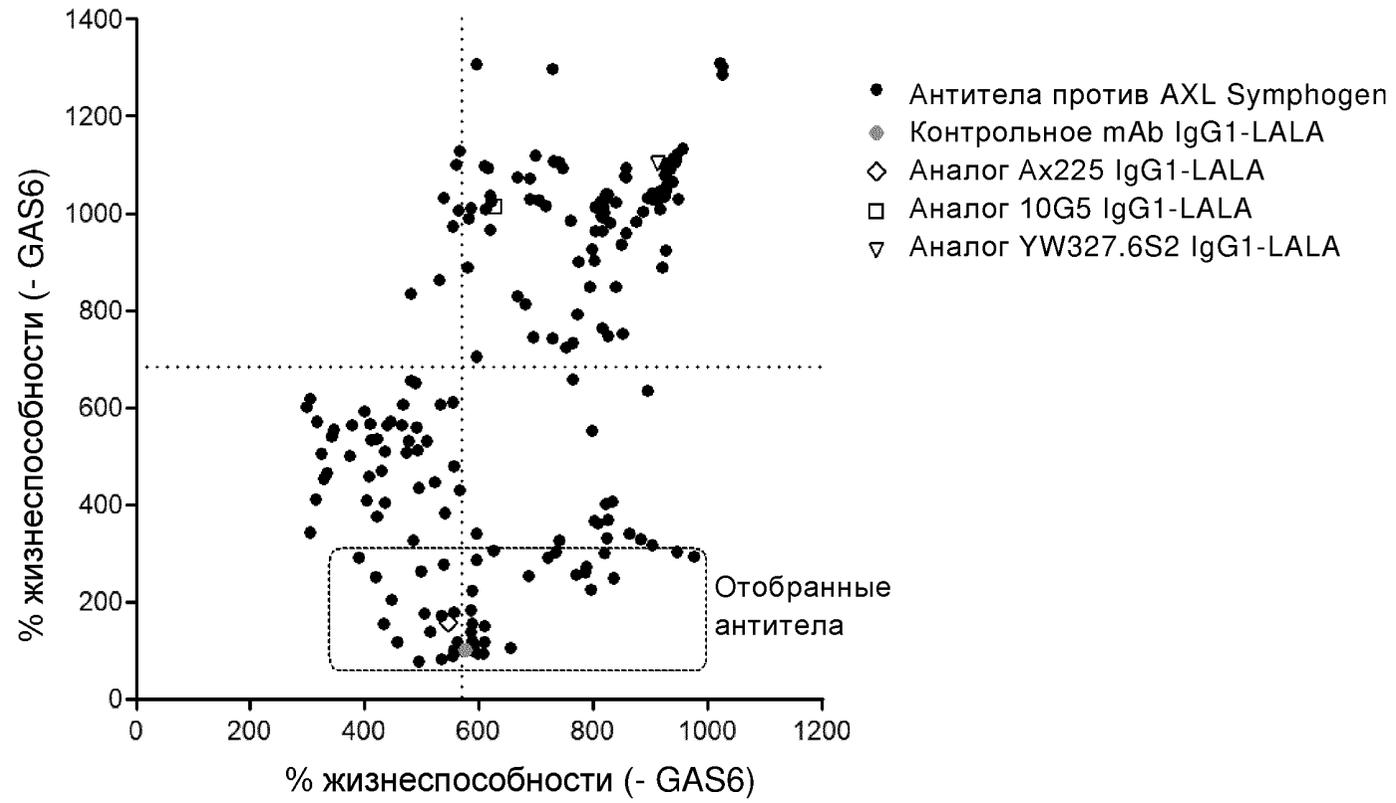


ФИГ. 1В

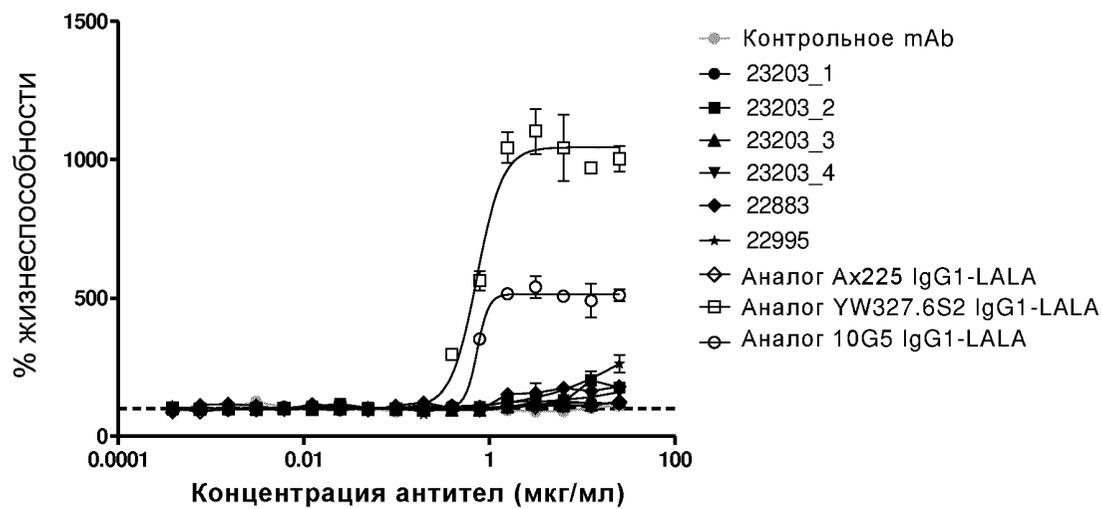
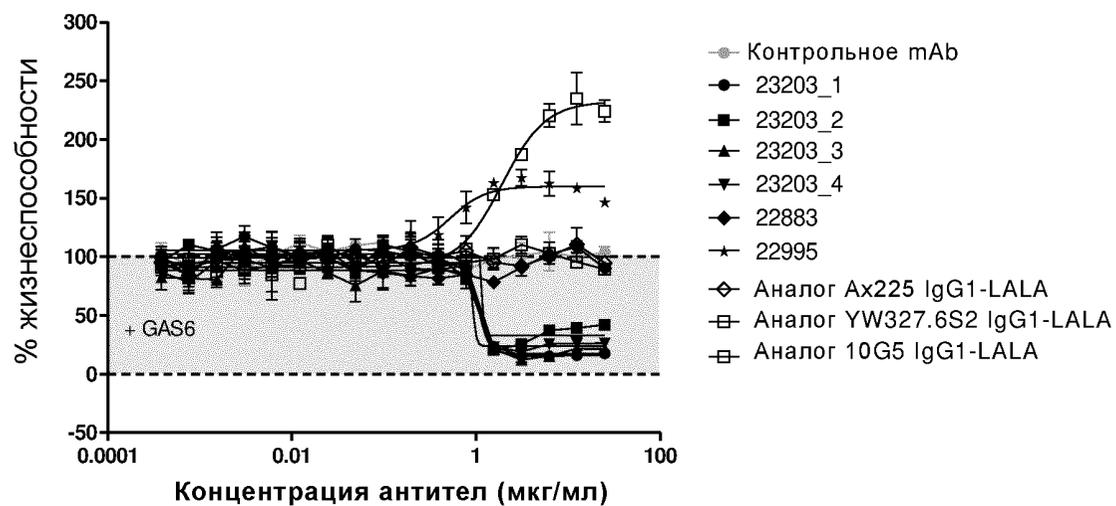
Псевдо



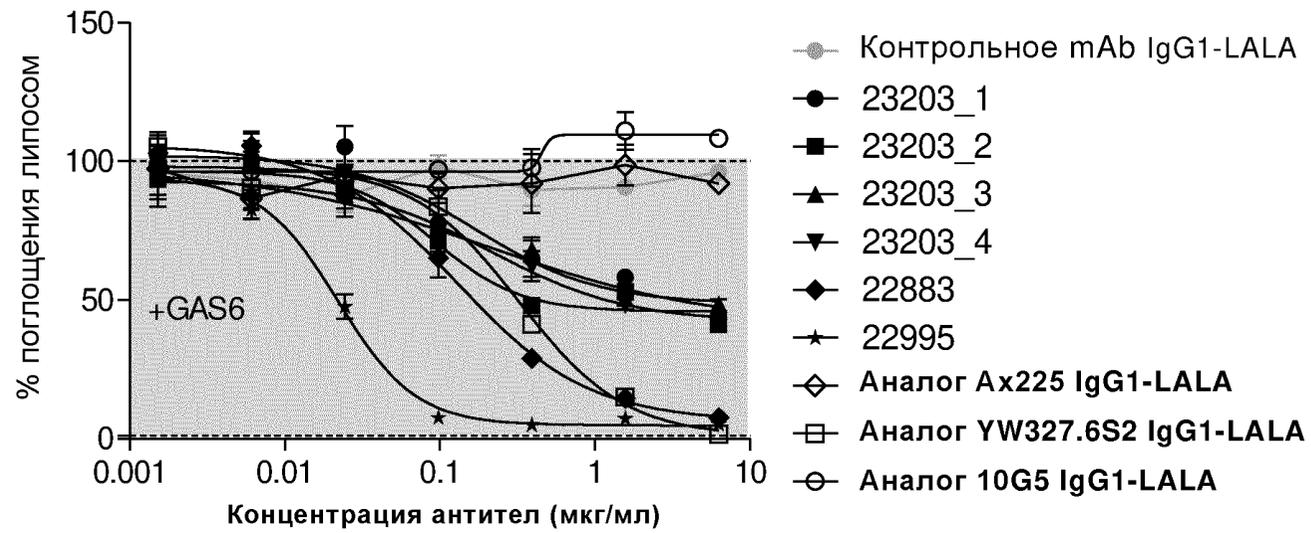
ФИГ. 1С



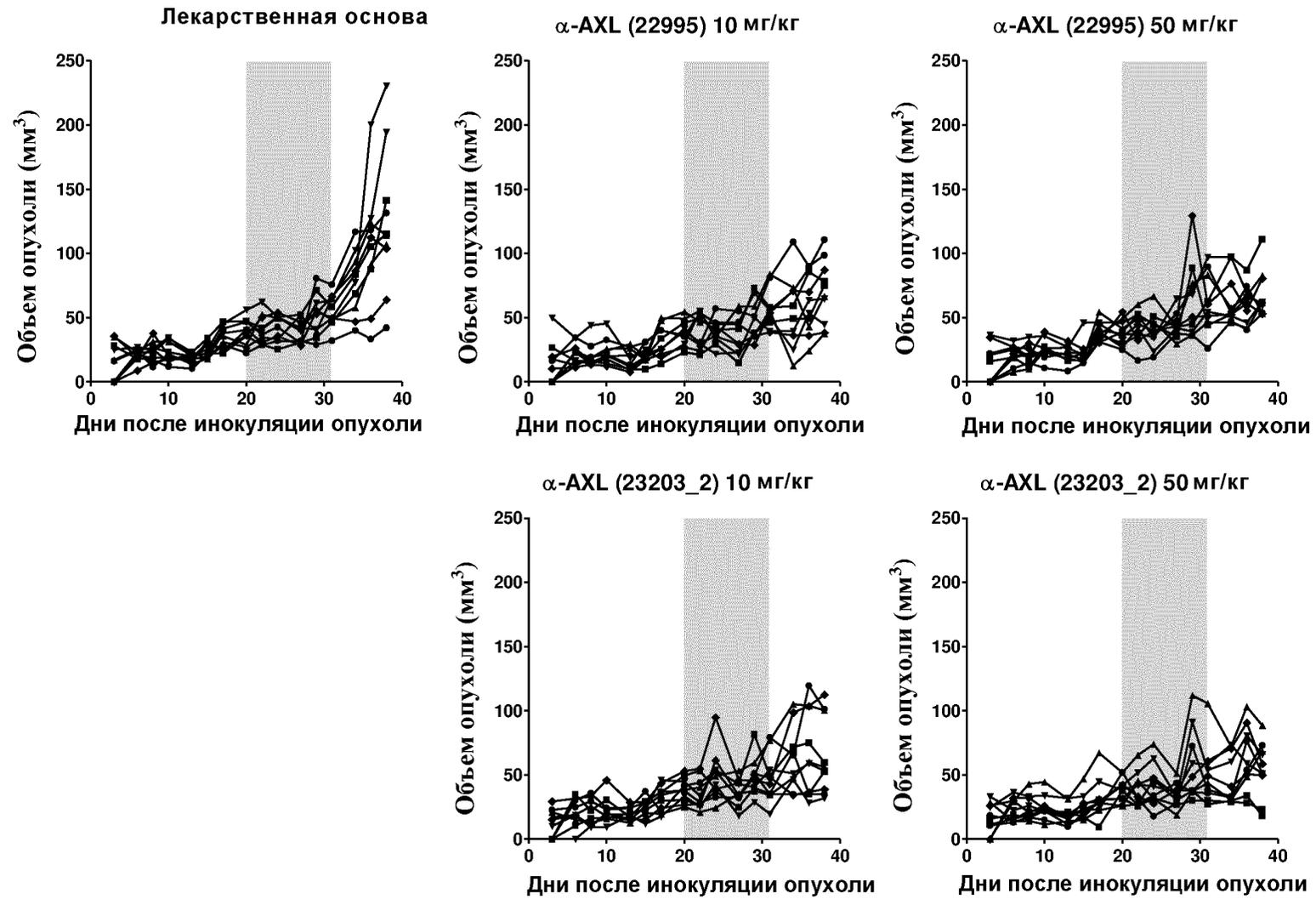
ФИГ. 2



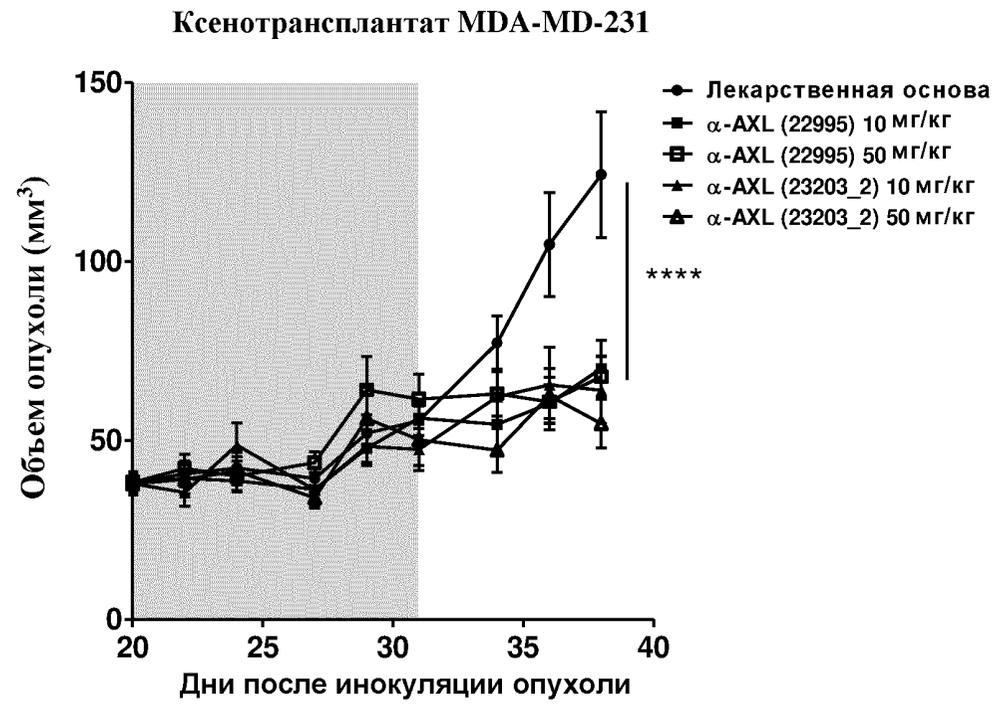
ФИГ. 3



ФИГ. 4



ФИГ. 5А



ФИГ. 5В

Антитела в растворе

Поверхность захваченных антител	ID	Аналог YW327.6S2 IgG1-LALA	Аналог 10G5	Gas-6
	22995	1.1	1.3	0.0
	23203-1	1.1	1.2	0.1
	Аналог YW327.6S2 IgG1-LALA	0.0	1.6	-0.2
	Аналог 10G5	1.2	-0.2	-0.2
	22883	3.9	-0.1	-2.7
	Контрольное антитело	1.3	1.2	0.8

ФИГ. 6

Белок	23203-1	22995	Аналог 10G5	Аналог YW327.6S2 IgG1-LALA
MoAXL ECD HuIg1	-0.3	0.6	0.9	1.0
MoAXL ECD HuIg2	1.0	-0.1	-0.3	0.9
MoAXL ECD HuFn1	-0.2	-0.1	-0.2	0.5
MoAXL ECD HuFn2	-0.2	-0.2	-0.3	0.8
HuAXL_ECD	1.0	1.0	1.0	1.0

ФИГ. 7