

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044092**

(13) **B1**

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

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.07.21

(21) Номер заявки
201890158

(22) Дата подачи заявки
2016.06.30

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

(54) **АНТИ-NTВ-А АНТИТЕЛА И ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЕ КОМПОЗИЦИИ, ИХ
СОДЕРЖАЩИЕ**

(31) **62/186,596; 62/321,849**

(32) **2015.06.30; 2016.04.13**

(33) **US**

(43) **2018.06.29**

(86) **PCT/US2016/040307**

(87) **WO 2017/004330 2017.01.05**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
**Льюис Тимоти, Вестендорф Лори,
Сассман Джанго, Ло Чэ-Леунг (US)**

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

(56) WO-A1-2014100740
CA-A1-2905597
WO-A1-2015095002

(57) В изобретении раскрыты антитела, а также конъюгаты антитело-лекарственное средство, которые специфически связываются с NTВ-А. Также раскрыты способы применения указанных антител для диагностики или лечения NTВ-А-связанных заболеваний или нарушений, таких как множественная миелома, неходжкинская лимфома и острый миелоидный лейкоз.

B1

044092

044092

B1

Перечень последовательностей

Перечень последовательностей, обозначенный NTBА-00303PR_ST25.txt, и имеющий размер 29 килобайт, включен в качестве ссылки.

Уровень техники

NTB-A - однопроходный мембранный гликопротеин I типа, также называемый SLAMF6, является членом суперсемейства иммуноглобулинов (Ig-SF), относящийся к подсемейству CD2/SLAM. См., например, Bottino et al., J. Exp. Med. 194:235-246, 2001. В своей внеклеточной части NTB-A характеризуется N-концевым доменом V-типа, за которым следует домен C2-типа, тогда как внутрицитоплазматическая часть содержит три мотива на основе тирозина: два иммунорецепторных мотива-переключателя на основе тирозина (ITSM; T_xY_{xx}V/I) и классический иммунорецепторный мотив ингибирования на основе тирозина (ITIM, I/V/L/S_xY_{xx}L). См. id. Благодаря своим мотивам ITSM NTB-A связывается с SH2-доменом SLAM-ассоциированного белка SH2D1A и связанного с ним активированного транскрипта саркомы Эвинга (EAT) 2. См. Bottino et al., выше; Falco et al., Eur. J. Immunol. 34: 1663-1672, 2004; Flaig et al., Immunol. 172:6524-6527, 2004.

NTB-A экспрессируется на клетках естественных киллерах (NK), NK-подобных Т-клетках, Т-клетках, моноцитах, дендритных клетках, В-клетках и эозинофилах. См. Salort JD. et al., Immunology Letters 129-136, 2011; Matesanz-Isabel et al., Immunology Letters 104-112, 2011; Munitz et al., Journal of Immunology 174: 110-118, 2005; Bottino et al., Journal of Experimental Medicine 194(3) :235-246; 2001. NTB-A может функционировать посредством гомотипических взаимодействий (то есть в качестве самолиганда) и, как было показано, действует как положительный регулятор функций NK-клеток посредством передачи сигналов, индуцируя цитотоксичность NK-клеток. См., например, Bottino et al., выше; Falco et al., выше; Flaig et al., выше. Было также показано, что NTB-A экспрессируется на В-клетках пациентов с хроническим лимфоцитарным лейкозом (CLL) и В-клеточной лимфомой. См. Korver et al., British Journal of Haematology 137:307-318, 2007.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показано выравнивание последовательностей варибельной области тяжелой цепи 20F3 мыши, гуманизированной последовательности с CDR мыши (в рамочках) в акцепторе человека без обратных мутаций и гуманизированных вариантов - HA-HE. CDR обозначены по Kabat.

На фиг. 2 показано выравнивание последовательностей варибельной области легкой цепи 20F3 мыши, гуманизированной последовательности с CDR мыши (в рамочках) в акцепторе человека без обратных мутаций и гуманизированных вариантов - LA-LD. CDR обозначены по Kabat.

На фиг. 3 представлены результаты исследования рассеянного ксенотрансплантата множественной миеломы в линии клеток MM.1R у мышей NSG (NOD (диабет без ожирения) ТКИД (тяжелый комбинированный иммунодефицит) гамма). Доза указана на фигуре. ADC (конъюгат лекарственного средства с антителом) представляет собой конъюгат лекарственного средства с антителом гуманизированное 20F3-PBD (пирролбенздиазепин).

На фиг. 4 представлены результаты исследования рассеянного ксенотрансплантата множественной миеломы в линии клеток U-266 у мышей NSG. Доза указана на фигуре. ADC (конъюгат лекарственного средства с антителом) представляет собой конъюгат лекарственного средства с антителом гуманизированное 20F3-PBD (пирролбенздиазепин).

На фиг. 5 представлены результаты исследования рассеянного ксенотрансплантата множественной миеломы в линии клеток EJM у мышей NSG. Доза указана на фигуре. ADC (конъюгат лекарственного средства с антителом) представляет собой конъюгат лекарственного средства с антителом гуманизированное 20F3-PBD (пирролбенздиазепин).

На фиг. 6 представлены результаты исследования подкожного ксенотрансплантата ОМЛ (острый миелоидный лейкоз) на линии клеток HNT-34 у мышей ТКИД. Доза указана на фигуре. ADC (конъюгат лекарственного средства с антителом) представляет собой конъюгат лекарственного средства с антителом гуманизированное 20F3-PBD (пирролбенздиазепин).

На фиг. 7 представлены результаты исследования рассеянного ксенотрансплантата множественной миеломы в линии клеток MM.1R у мышей NSG. Доза указана на фигуре. ADC представляет собой конъюгат лекарственного средства с антителом гуманизированное 20F3-ауристатин.

На фиг. 8 представлены результаты исследования рассеянного ксенотрансплантата множественной миеломы в линии клеток U-266 у мышей NSG. Доза указана на фигуре. Оба ADC представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное гуманизированное 20F3-ауристатин.

На фиг. 9 представлены результаты исследования рассеянного ксенотрансплантата множественной миеломы в линии клеток EJM у мышей NSG. Доза указана на фигуре. Оба ADC представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное гуманизированное 20F3-ауристатин.

На фиг. 10 представлены результаты исследования подкожного ксенотрансплантата ОМЛ (острый миелоидный лейкоз) на линии клеток HNT-34 у мышей ТКИД. Доза указана на фигуре. Оба ADC представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное гуманизированное 20F3-ауристатин.

На фиг. 11 представлены результаты исследования подкожного ксенотрансплантата неходжкинской лимфомы на линии клеток Raji у мышей ТКИД. Доза указана на фигуре. Оба ADC представляют собой

конъюгаты антитело-лекарственное гуманизованное 20F3-ауристатин.

На фиг. 12 представлены результаты исследования подкожного ксенотрансплантата неходжкинской лимфомы на линии клеток WSU-DLCL2 у мышей ТКИД. Доза указана на фигуре. Оба ADC представляют собой конъюгаты антитело-лекарственное гуманизованное 20F3-ауристатин.

Определения

Конъюгат "лекарственного средства с антителом" относится к антителу, конъюгированному с цитотоксическим агентом или цитостатическим агентом. Обычно конъюгаты лекарственного средства с антителом связываются с целевым антигеном (например, NTB-A) на поверхности клетки, с последующей интернализацией конъюгата лекарственного средства с антителом в клетку и высвобождением лекарственного средства.

"Полипептид" или "полипептидная цепь" представляет собой полимер аминокислотных остатков, соединенных пептидными связями, независимо от того, получен ли он естественным путем или синтетически. Полипептиды менее 10 аминокислотных остатков обычно называют "пептидами".

"Белок" представляет собой макромолекулу, содержащую одну или более полипептидных цепей. Белок может также содержать непептидные компоненты, такие как углеводные группы.

Углеводы и другие непептидные заместители могут быть добавлены к белку клеткой, в которой образуется белок, и будут варьировать в зависимости от типа клетки. Белки определяются в данном документе в терминах их основных аминокислотных структур; заместители, такие как углеводные группы, обычно не указаны, но могут, тем не менее, присутствовать.

Термины "аминоконцевой" и "карбоксиконцевой" обозначают положения в границах полипептидов. Когда контекст позволяет, эти термины используются со ссылкой на конкретную последовательность или часть полипептида для обозначения близости или относительного положения. Например, определенная последовательность, позиционированная карбоксильным концом к эталонной последовательности внутри полипептида, расположена проксимально к карбоксильному концу эталонной последовательности, но необязательно находится на карбоксильном конце полного полипептида.

Термин "антитело" обозначает белки иммуноглобулины, продуцируемые организмом, в ответ на присутствие антигена и связывающиеся с антигеном, а также с антигенсвязывающие фрагменты и их модифицированные варианты. Следовательно, термин "антитело" включает, например, интактные моноклональные антитела (например, антитела, полученные с использованием гибридомной технологии) и антигенсвязывающие фрагменты антитела, такие как фрагменты F(ab')₂ и Fab. Также включены генетически сконструированные интактные антитела и фрагменты, такие как химерные антитела, гуманизованные антитела, одноцепочечные Fv-фрагменты, одноцепочечные антитела, диатела, мини-антитела, линейные антитела, мультивалентные или мультиспецифические (например, биспецифические) гибридные антитела и тому подобные. Таким образом, термин "антитело" используется экспансивно, чтобы включать любой белок, который содержит антигенсвязывающий сайт антитела и способен специфически связываться с его антигеном. Термин "антитело" также включает само антитело ("голые антитела") или антитело, конъюгированное с цитостатическим или цитотоксическим лекарственным средством.

Термин "генетически сконструированные антитела" означает антитела, в которых аминокислотная последовательность отличается от аминокислотной последовательности нативного антитела. Из-за значимости методик рекомбинантной ДНК при создании антител не следует ограничиваться последовательностями аминокислот, обнаруженными в естественных антителах; антитела могут быть переконструированы для получения желаемых характеристик. Возможные вариации многочисленны и варьируются от изменения только одной или более аминокислот до полной реорганизации, например, варибельной или константной области. Изменения в константной области, в общем, сделаны для улучшения или изменения характеристик, таких как, например, фиксация комплемента, взаимодействие с клетками и другие эффекторные функции. Как правило, изменения в варибельной области производят для улучшения антигенсвязывающих характеристик, улучшения стабильности варибельной области или снижения риска иммуногенности.

"Антигенсвязывающий сайт антитела" представляет собой ту часть антитела, которая является достаточной для связывания с его антигеном. Минимальная такая область обычно представляет собой варибельный домен или его генетически модифицированный вариант. Однодоменные сайты связывания могут быть получены из антител верблюдов (см. Muyldermans and Lauwereys, J. Mol. Recog. 12: 131-140, 1999; Nguyen et al., EMBO J. 19:921-930, 2000) или из доменов VH других видов для получения однодоменных антител ("dAbs"; см. Ward et al., Nature 341:544-546, 1989; Патент США № 6248516 Winter et al.). Обычно антигенсвязывающий сайт антитела содержит и варибельный домен тяжелой цепи (VH), и варибельный домен легкой цепи (VL), которые связываются с общим эпитопом. В контексте данного изобретения антитело может содержать один или более компонентов в дополнение к сайту связывания антигена, например, к другому антигенсвязывающему сайту антитела (который может связываться с тем же или другим эпитопом или с тем же или другим антигеном), пептидный линкер, константную область иммуноглобулина, шарнир иммуноглобулина, амфипатическую спираль (см. Pack и Pluckthun, Biochem. 31: 1579- 1584, 1992), непептидный линкер, олигонуклеотид (см. Chaudri et al., FEBS Letters 450:23-26, 1999), цитостатическое или цитотоксическое лекарственное средство и тому подобное, и может представлять

собой мономерный или мультимерный белок. Примеры молекул, содержащих антигенсвязывающий сайт антитела, известны в данной области техники и включают, например, Fv, одноцепочечный Fv (scFv), Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂, диатела, минитела, нанотела, слитые Fab-scFv, биспецифические (scFv)₄-IgG and биспецифические (scFv)₂-Fab. (См., например, Ni et al., *Cancer Res.* 56:3055-3061, 1996; Atwell et al., *Molecular Immunology* 33: 1301-1312, 1996; Carter and Merchant, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:449-454, 1997; Zuo et al., *Protein Engineering* 13:361-367, 2000; и Lu et al., *J. Immunol. Methods* 267:213-226, 2002.)

Термин "иммуноглобулин" относится к белку, состоящему из одного или более полипептидов, по существу кодированных геном(ами) иммуноглобулина. Одна из форм иммуноглобулина составляет основную структурную единицу нативных (то есть естественных) антител у позвоночных. Эта форма представляет собой тетрамер и состоит из двух идентичных пар цепей иммуноглобулина, каждая пара имеет одну легкую цепь и одну тяжелую цепь. В каждой паре переменные области легкой и тяжелой цепи (VL и VH) вместе ответственны за связывание с антигеном, а константные области в основном ответственны за эффекторные функции антитела. Пять классов белка иммуноглобулина (IgG, IgA, IgM, IgD и IgE) были идентифицированы у высших позвоночных животных. IgG включает основной класс; он обычно существует как второй наиболее распространенный белок, обнаруженный в плазме. У людей IgG состоит из четырех подклассов, обозначенных IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Каждая тяжелая цепь иммуноглобулина обладает константной областью, которая состоит из белковых доменов константной области (CH1, шарнир, CH2 и CH3, IgG3 также содержит домен CH4), которые по существу являются инвариантными для данного подкласса у вида. Последовательности ДНК, кодирующие цепи человеческие и отличные от человеческих иммуноглобулинов, известны в данной области техники. (См., например, Ellison et al., *DNA* 1: 11-18, 1981; Ellison et al., *Nucleic Acids Res.* 10:4071-4079, 1982; Kenten et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:6661-6665, 1982; Seno et al., *Nuc. Acids Res.* 11:719-726, 1983; Riechmann et al., *Nature* 332:323-327, 1988; Amster et al., *Nuc. Acids Res.* 8:2055-2065, 1980; Rusconi and Kohler, *Nature* 314:330-334, 1985; Boss et al., *Nuc. Acids Res.* 12:3791-3806, 1984; Bothwell et al., *Nature* 298:380-382, 1982; van der Loo et al., *Immuno genetics* 42:333-341, 1995; Karlin et al., *J. Mol. Evol.* 22: 195-208, 1985; Kindsvogel et al., *DNA* 1:335-343, 1982; Breiner et al., *Gene* 18: 165-174, 1982; Kondo et al., *Eur. J. Immunol.* 23:245-249, 1993 и номер доступа GenBank J00228.) Для обзора структуры и функции иммуноглобулинов см. Putnam, *The Plasma Proteins*, Vol V, Academic Press, Inc., 49-140, 1987 и Padlan, *Mol. Immunol.* 31: 169-217, 1994. Термин "иммуноглобулин" используется в данном документе в своем обычном значении, обозначая интактное антитело, его составные цепи или фрагменты цепей, в зависимости от контекста.

Полноразмерные "легкие цепи" иммуноглобулина (около 25 кДа или 214 аминокислот) кодируются геном переменной области на амино-конце (кодирующим около 110 аминокислот) и геном константной каппа или лямбда области на карбоксильном конце. Полноразмерные "тяжелые цепи" иммуноглобулина (около 50 кДа или 446 аминокислот) кодируются геном переменной области (кодирующим около 116 аминокислот) и геном константной области гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон (кодирующим около 330 аминокислот), причем последний определяет изотип антитела такой, как IgG, IgM, IgA, IgD или IgE, соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменная и константная области соединяются областью "J" около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит область "D", состоящую из еще около 10 аминокислот. (См. в основном, *Fundamental Immunology* (Paul, ed., Raven Press, N.Y., 2nd ed. 1989), Ch. 7).

Переменная область легкой или тяжелой цепи иммуноглобулина (также называемая в данном документе "переменной областью легкой цепи" ("домен VL") или "переменной областью тяжелой цепи" ("домен VH"), соответственно состоит из "каркасной" области, прерванной тремя "областями, определяющим комплементарность" или "CDR". Каркасные области служат для выравнивания CDR для специфического связывания с эпитопом антигена. Таким образом, термин "CDR" относится к аминокислотным остаткам антитела, которые в первую очередь ответственны за связывание антигена. От аминоконца до карбоксильного конца оба домена VL и VH содержат следующие каркасные (FR) и CDR-области: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Назначение аминокислот для каждого домена переменной области соответствует определениям Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 и 1991). Kabat также предложил широко используемое соглашение о нумерации (нумерация Kabat), в котором соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается одинаковое число. CDR 1, 2 и 3 VL домена также упоминаются в данном документе, соответственно, как CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3; CDR 1, 2 и 3 домена VH также упоминаются в данном документе, соответственно, как CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3. Если это указано, назначение CDR может быть в соответствии с IMGT® (Lefranc et al., *Developmental & Comparative Immunology* 27:55-77; 2003) вместо Kabat.

Если контекст не предполагает иное, термин "моноклональное антитело" не ограничивается антителами, получаемыми с помощью гибридомной технологии. Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, которое получено из одного клона, включая любой эукариотический, прокариотический или фаговый клон, а не способ его получения. Антитела, описанные в данном документе, представляют собой моноклональные антитела.

Термин "гуманизированный домен VH" или "гуманизированный домен VL" относится к домену VH

или VL иммуноглобулина, содержащему некоторые или все CDR полностью или по существу от донорного иммуноглобулина (например, мыши или крысы), отличного от человека, и каркасные последовательности варибельного домена полностью или по существу из последовательностей иммуноглобулина человека. Иммуноглобулин, нечеловеческого происхождения, обеспечивающий CDR, называется "донором", а иммуноглобулин человеческого происхождения, обеспечивающий структуру, называется "акцептором". В некоторых случаях гуманизированные антитела будут удерживать некоторые остатки нечеловеческого происхождения в рамках каркасных областей варибельного домена человека для улучшения надлежащих характеристик связывания (например, мутации в каркасных областях могут потребоваться для сохранения аффинности связывания, когда антитело гуманизировано).

"Гуманизированное антитело" представляет собой антитело, содержащее один или оба из гуманизированного домена VH и гуманизированного домена VL. Константная область (области) иммуноглобулина не обязательно должна присутствовать, но, если они присутствуют, они полностью или существенно представляют собой константные области иммуноглобулина человека.

CDR в гуманизированном антителе происходят "по существу из" соответствующего CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 60%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95 или 100% соответствующих остатков (определенных по Kabat (или IMGT)) являются идентичными между соответствующими CDR. В частности, вариации гуманизированного домена VH или VL, в которых CDR происходят по существу из нечеловеческого иммуноглобулина, CDR гуманизированного домена VH или VL имеют не более шести (например, не более пяти, не более четырех, нет более трех, не более двух или не более одной) аминокислотных замен (предпочтительно консервативных замен) во всех трех CDR по сравнению с соответствующими нечеловеческими CDR VH или VL. Каркасные последовательности варибельной области домена VH или VL антитела, или, если они присутствуют, последовательности константной области иммуноглобулина, происходят "по существу из" каркасной последовательности VH или VL человека, или, соответственно, константой области человека, когда по меньшей мере около 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Kabat, являются идентичными. Следовательно, все части гуманизированного антитела, за исключением CDR, полностью или практически происходят из соответствующих частей естественных последовательностей иммуноглобулина человека.

Антитела обычно предоставляются в выделенной форме. Это означает, что антитело обычно составляет по меньшей мере 50% мас./мас. от вмещающих белков и других загрязнителей, возникающих в результате его получения или очистки, но не исключает возможности сочетания антитела с избытком фармацевтически приемлемого носителя(ей) или другой несущей среды, предназначенной для облегчения его использования. Иногда антитела, являются на по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95 или 99% мас./мас. чистыми от мешающих белков и загрязняющих веществ от производства или очистки. Антитела, включая выделенные антитела, могут быть конъюгированы с цитотоксическими агентами и представлены как конъюгаты лекарственное средство-антитело.

Специфическое связывание антитела с его целевым антигеном означает аффинность, равную по меньшей мере 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 или 10^{10} M^{-1} . Специфическое связывание детектируется значительно выше по величине и различимо от неспецифического связывания, имеющего место по меньшей мере с одной неродственной мишенью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или результатом конкретной пространственной подгонки (например, тип ключ-замок), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом ван-дер-ваальсовых сил.

Термин "эпитоп" относится к сайту на антигене, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сопоставленных третичной укладкой одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой, обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает в себя по меньшей мере 3 и более обычно по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Методы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, в *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).

Антитела, которые распознают одни и те же или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы в простом иммунном анализе, показывающем способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с целевым антигеном. Эпитоп антитела также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактных остатков.

Альтернативно, два антитела имеют один и тот же эпитоп, если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого (при условии, что такие мутации не приводят к глобальному изменению структуры антигена). Два антитела имеют перекрывающиеся эпитопы, если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

Конкуренция между антителами определяется анализом, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans et al., Cancer Res. 50: 1495, 1990). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, если избыток тестируемого антитела ингибирует связывание эталонного антитела.

Конкуренция оценивается в соответствии с форматом, представленным в примерах. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и контрольное антитело, и антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, достаточно проксимальным к эпитопу, связанным эталонным антителом для стерического затруднения. Антитела, идентифицированные конкурентным анализом, также включают те, которые косвенно конкурируют с эталонным антителом, вызывая конформационное изменение в целевом белке, тем самым предотвращая связывание эталонного антитела с другим эпитопом, чем связанное с тестируемым антителом.

Термины "экспрессионная единица" и "экспрессионная кассета" используются в данном документе взаимозаменяемо и обозначают сегмент нуклеиновой кислоты, кодирующий представляющий интерес полипептид, и способный обеспечить экспрессию сегмента нуклеиновой кислоты в клетке-хозяине. Экспрессионная единица обычно содержит транскрипционный промотор, открытую рамку считывания, кодирующую представляющий интерес полипептид, и терминатор транскрипции, все в работоспособной конфигурации. В дополнение к транскрипционному промотору и терминатору экспрессионная единица может дополнительно содержать другие сегменты нуклеиновой кислоты, такие как, например, энхансер или сигнал полиаденилирования.

Используемый в данном документе термин "экспрессионный вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, линейной или кольцевой, содержащей одну или более экспрессионных единиц. В дополнение к одной или более экспрессионным единицам экспрессионный вектор может также содержать дополнительные сегменты нуклеиновой кислоты, такие как, например, один или более источников репликации, или один или более селективных маркеров.

Экспрессионные векторы обычно получают из плазмиды или вирусной ДНК или они могут содержать элементы обоих.

В антителах или других белках, описанных в данном документе, ссылка на аминокислотные остатки, соответствующие тем, которые указаны в SEQ ID NO, включает посттрансляционные модификации таких остатков.

Термин "пациент", включает людей и других субъектов млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

Термин "эффективное количество" в контексте лечения расстройства, специфичного для NTB-A, путем введения антитела против NTB-A, как описано в данном документе, относится к количеству такого антитела, которое является достаточным для ингибирования возникновения или уменьшения интенсивности одного или более симптомов расстройства, вызванного NTB-A. Эффективное количество антитела вводят в "эффективном режиме". Термин "эффективный режим" относится к комбинации количества вводимого антитела и частоты дозы, достаточной для проведения профилактического или терапевтического лечения расстройства.

В целях классификации замещений аминокислот как консервативные или неконсервативные, следующие аминокислотные замещения считаются консервативными замещениями: серии, замещенный треонином, аланином или аспарагином; треонин, замещенный пролином или серином; аспарагин, замещенный аспарагиновой кислотой, гистидином или серином; аспарагиновая кислота, замещенная глутаминовой кислотой или аспарагином; глутаминовая кислота, замещенная глутамином, лизином или аспарагиновой кислотой; глутамин, замещенный аргинином, лизином или глутаминовой кислотой; гистидин, замещенный тирозином или аспарагином; аргинин, замещенный лизином или глутамином; метионин, замещенный изолейцином, лейцином или валином; изолейцин, замещенный лейцином, валином или метионином; лейцин, замещенный валином, изолейцином или метионином; фенилаланин, замещенный тирозином или триптофаном; тирозин, замещенный триптофаном, гистидином или фенилаланином; пролин, замещенный треонином; аланин, замещенный серином; лизин, замещенный глутаминовой кислотой, глутамином или аргинином; валин, замещенный метионином, изолейцином или лейцином; и триптофан, замещенный фенилаланином или тирозином. Консервативные замещения могут также означать замещения между аминокислотами одного класса. Классы являются следующими: Группа I (гидрофобные боковые цепи) : met, ala, val, leu, ile; группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; группа IV (основные боковые цепи): asn, gin, his, lys, arg; группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепей): gly, pro; и группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe.

Две аминокислотные последовательности имеют "100% идентичность аминокислотных последовательностей", если аминокислотные остатки двух аминокислотных последовательностей одинаковы при выравнивании для максимального соответствия. Последовательные сравнения могут быть выполнены с использованием стандартного программного обеспечения, такого как, включенное в комплект биоинформатики LASERGENE, который производится DNASTAR (Мэдисон, Висконсин). Другие способы

сравнения двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей путем определения оптимального выравнивания хорошо известны специалистам в данной области техники. (См., например, Peruski and Peruski, *The Internet and the New Biology: Tools for Genomic and Molecular Research* (ASM Press, Inc. 1997); Wu et al., (eds.), *"Information Superhighway and Computer Databases of Nucleic Acids and Proteins,"* в *Methods в Gene Biotechnology* 123-151 (CRC Press, Inc. 1997); Bishop (ed.), *Guide to Human Genome Computing* (2nd ed., Academic Press, Inc. 1998).) Считается, что две аминокислотные последовательности имеют "существенную идентичность последовательностей", если две последовательности имеют по меньшей мере 80%, по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% идентичности последовательностей друг относительно друга.

Идентичность последовательностей в процентах определяется последовательностями антител, максимально выравненными по соглашению нумерации Kabat. После выравнивания, если предметная область антитела (например, весь вариабельный домен тяжелой или легкой цепи) сравнивается с той же областью контрольного антитела, то процентная идентичность последовательности между областью субъекта и эталонного антитела представляет собой количество позиций занятой той же аминокислотой как в области субъекта, так и в эталонном антителе, деленном на общее количество выровненных позиций двух областей, при этом пробелы не учитываются, умноженные на 100 для преобразования в проценты.

Композиции или способы, содержащие "один" или более элементов, могут содержать другие элементы, не указанные конкретно. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в комбинации с другими ингредиентами.

Обозначение диапазона значений включает все целые числа внутри или определяющие диапазон.

Эффекторная функция антитела относится к функции, вызванной Fc-областью Ig. Такими функциями могут быть, например, антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз или комплементарно-зависимая цитотоксичность. Такая функция может быть осуществлена, например, путем связывания Fc-области с Fc-рецептором в иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью, или путем связывания Fc-области с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредуемый Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит к ингибированию и/или истощению клетки, нацеленной на NTB-A. Fc-области антител могут рекрутировать Fc-рецептор (FcR)-экспрессирующие клетки и сопоставлять их с клетками-мишенями, покрытыми антителами. Клетки, экспрессирующие поверхностные FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD64), могут действовать как эффекторные клетки для уничтожения IgG-покрытых клеток. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, клетки естественные киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Взаимодействие FcγR с помощью IgG активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). АЗКЦ опосредуется эффекторными клетками CD16⁺ посредством секреции мембранных порообразующих белков и протеаз, тогда как фагоцитоз опосредуется CD32⁺ и CD64⁺ эффекторными клетками (см. *Fundamental Immunology*, 4th ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 и 30; Uchida et al., *J. Exp. Med.* 199: 1659-69, 2004; Akewanlop et al., *Cancer Res.* 61:4061-65, 2001; Watanabe et al., *Breast Cancer Res. Treat.* 53: 199-207, 1999). В дополнение к АЗКЦ и АЗКФ Fc-области антител, связанных с клеткой, также могут активировать классический путь комплемента, чтобы вызвать комплементзависимую цитотоксичность (CDC). C1q системы комплемента связывается с Fc-областями антител при их комплексообразовании с антигенами. Связывание C1q с клеточно-связанными антителами может инициировать каскад событий, связанных с протеолитической активацией C4 и C2, с образованием C3-конвертазы. Расщепление C3 на C3b C3-конвертазой позволяет активировать терминальные компоненты комплемента, включая C5b, C6, C7, C8 и C9.

В совокупности эти белки образуют мембранно-атакующие комплексные поры на клетках, покрытых антителом. Эти поры нарушают целостность клеточной мембраны, убивая клетку-мишень (см. *Immunobiology*, 6th ed., Janeway et al., Garland Science, N.Y., 2005, Chapter 2).

Термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность" или "АЗКЦ" представляет собой механизм индуцирования гибели клеток, который зависит от взаимодействия клеток-мишеней, покрытых антителом, с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки включают естественные клетки киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки присоединяются к Fc-области Ig, связанного с клетками-мишенями, через их сайты, связывающие антиген. Гибель покрытой антителом клетки-мишени происходит в результате активности эффекторных клеток.

Термин "антителозависимый клеточный фагоцитоз" или "АЗКФ" относится к процессу, посредством которого клетки, покрытые антителом, интернализуются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связывают с Fc-областью Ig.

Термин "комплементзависимая цитотоксичность" или "CDC" относится к механизму индуцирования гибели клеток, при котором Fc-область связанного с мишенью антитела активирует серию ферментативных реакций, кульминацией которых является образование отверстий в мембране клетки-мишени.

Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как расположенные на покрытых антителами клетках-мишенях, связывают и активируют компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента может также приводить к осаждению компонентов комплемента на поверхность клетки-мишени, которые облегчают АЗКЦ путем связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

"Цитотоксический эффект" относится к истощению, элиминации и/или к гибели клетки-мишени. "Цитотоксический агент" относится к агенту, который оказывает цитотоксический эффект на клетку. Цитотоксические агенты могут быть конъюгированы с антителом или введены в комбинации с антителом.

"Цитостатический эффект" относится к ингибированию клеточной пролиферации. "Цитостатический агент" относится к агенту, который оказывает цитостатический эффект на клетку, тем самым ингибируя рост и/или деление определенного подмножества клеток. Цитостатические агенты могут быть конъюгированы с антителом или введены в комбинации с антителом.

Термин "фармацевтически приемлемый" означает одобренный или одобряемый регулирующим органом федерального правительства или правительства штата, или указанный в "Фармакопее США" или другой общепризнанной фармакопее для применения к животным и, более конкретно, к людям. Термин "фармацевтически совместимый ингредиент" относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адьюванту, эксципиенту или носителю, с которым смешано антитело против НТВ-А.

Фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям. Примеры солей включают следующие соли: сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, fumarат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат и памоат (т.е. 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтаат)). Фармацевтически приемлемая соль может иметь включение другой молекулы, такой как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Противоион может представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд в исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. В случае, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, она может иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Если иначе не видно из контекста, когда значение выражается как "около" X или "приблизительно" X, заявленное значение X будет считаться точным до $\pm 10\%$.

Гликозилирование зависит от клетки-хозяина, используемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клеток, используемых для экспрессии рекомбинантных антител в качестве потенциальных терапевтических средств, редко является нативным типом клеток, существенные изменения в паттерне гликозилирования антител могут происходить между рекомбинантно экспрессируемыми антителами в ненативных клетках и антителами тех же последовательностей первичных тяжелых и легких цепей, которые экспрессируются в их нативных клетках. Линии клеток млекопитающих происходящие от грызунов (такие как SP2/0, CHO или ВНК) способны обеспечить гликозилирование, которое имеет некоторое сходство с гликозилированием человека. Однако некоторые компоненты человека могут отсутствовать (например, 2,6-связанное сиалилирование), и может присутствовать ряд других компонентов, обычно не встречающихся у людей, таких как концевые сиаловые кислоты, которые обычно не существуют в клетках человека (NeuGc, например) или концевая галактоза, связанная с другой галактозой, обычно отсутствующая в клетках человека (структуры Gal-Gal). Рекомбинантные IgG, экспрессируемые в клетках CHO, обычно менее галактозилированы по сравнению с рекомбинантными иммуноглобулинами, экспрессируемыми в клетках миеломы мыши. Соответственно, рекомбинантные IgG, продуцируемые в клетках CHO, могут содержать более высокие уровни G0-гликанов по сравнению с gIgG, продуцируемыми в линиях клеток миеломы мыши.

Гликозилированную структуру антител можно проанализировать с помощью обычных методов анализа углеводов, включая лектиновую хроматографию, ЯМР, масс-спектрометрию, ВЭЖХ, гелипроницающую хроматографию, моносахаридный композиционный анализ, последовательное ферментативное расщепление и высокоэффективную анион-обменную хроматографию с импульсным амперометрическим обнаружением, в котором используется анионообменная хроматография высокого pH для разделения олигосахаридов на основе заряда. Способы высвобождения олигосахаридов в аналитических целях включают ферментативную обработку (обычно выполняемую с использованием пептид-N-гликозидазы F/эндо-бета-галактозидазы), устранение с использованием жестких щелочных условий для высвобождения главным образом O-связанных структур и химических методов с использованием безводного гидрамина для высвобождения и N- и O-связанных олигосахаридов.

Таким образом, паттерн гликозилирования рекомбинантно экспрессированного антитела может быть характерна для типа клеток, в которых выполняется экспрессия (например, CHO), и различается любым из вышеуказанных методов от других типов клеток, в частности клеток других видов, таких как

мышь и человек.

Сольваты в контексте изобретения представляют собой такие формы соединений по изобретению, которые образуют комплекс в твердом или жидком состоянии путем координации с молекулами растворителя. Гидраты представляют собой одну конкретную форму сольватов, в которой координация происходит с водой. Предпочтительными сольватами в контексте данного изобретения являются гидраты.

Подробное описание изобретения

I. Общая информация

В данном изобретении предложены, среди прочего, антитела 20F3, которые специфически связываются с NTB-A, а также их химерные, венеризованные и гуманизированные формы. Также предложены антитела, которые конкурируют за связывание с антителами 20F3 или связываются с тем же эпитопом, что и антитело 20F3. Антитела пригодны, например, для лечения и диагностики различных видов NTB-A-экспрессирующего рака, а также для обнаружения NTB-A (например, обнаружения экспрессии NTB-A в клетках). Также предложены способы такого лечения, диагностики и обнаружения NTB-A с использованием антител по изобретению, включая обнаженные антитела и конъюгированные антитела.

II. Молекулы-мишени

Если не указано иное, NTB-A означает NTB-A человека. Типичная последовательность человека обозначена как SEQ ID NO: 1 (Swiss Prot Q96DU3). Известны четыре сплайс-вариантных изоформы. Зрелая внеклеточная область ограничена остатками 22-226 Q96DU3. Более короткий внеклеточный домен в изоформе 4 имеет домен C2 и два мотива ITSM и не содержит остатков 18-121, которые включают иммуноглобулиновый домен.

Если из контекста не указано иное, ссылка на NTB-A означает по меньшей мере внеклеточный домен белка в соответствии с полным белком, отличным от расщепляемого сигнального пептида (аминокислоты 1-21 Q96DU3).

NTB-A яванского макака (SEQ ID NO: 2) (супо-NTB-A) имеет 84,6% идентичности аминокислот и 93,3% сходства аминокислот с NTB-A человека (SEQ ID NO: 1).

III. Антитела

A. Специфичность связывания и функциональные свойства

Данное раскрытие относится, среди прочего, к антителу мыши, обозначенному как 20F3, и к химерным, венеризованным и гуманизированным формам антитела 20F3, а также к антителам, которые конкурируют с антителом 20F3 за связывание с NTB-A и антителами, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитело 20F3. Антитело 20F3 связывается с канонической формой NTB-A человека (SEQ ID NO: 1), изоформой 4 человека и NTB-A яванского макака. Эти связывающие характеристики предполагают, что его эпитоп лежит за пределами сегмента NTB-A, отсутствующего в изоформе 4 (в пределах остатков 128-226) и у эпитопа, который полностью или практически сохраняется между формами NTB-A человека и яванского макака.

Гуманизированное антитело HDLD 20F3 имеет Kd для изоформы 1 NTB-A человека на клетках Ramos, равную около 2 нМ. Другие гуманизированные формы антитела 20F3 предпочтительно имеют Kd, по существу, одинаковые или в пределах 2, 3 или 5 раз по сравнению с антителом HDLD 20F3. Гуманизированное антитело HDLD имеет EC50 для NTB-A человека на клетках Ramos, равную около 12 нМ в антигенсвязывающем конкурентном анализе. Некоторые гуманизированные антитела имеют EC50 в пределах 2, 3 или 6% от HDLD гуманизированного антитела 20F3.

Предпочтительные гуманизированные антитела 20F3 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с 20F3 мыши за связывание с NTB-A человека. В данном случае, как и везде в данной заявке, EC₅₀ и Kd могут быть измерены в соответствии со способами из примеров.

B. Гуманизированные антитела

Гуманизированное антитело представляет собой генетически модифицированное антитело, в котором CDR от нечеловеческого "донорного" антитела прививают в человеческие "акцепторные" последовательности антител (см., например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205 и Foote, US 6881557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антитела человека, композицию таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательности антитела человека или последовательность области зародышевой линии. Последовательности акцептора человека могут быть выбраны для высокой степени идентичности последовательности в каркасах варибельной области с донорскими последовательностями, чтобы соответствовать каноническим формам между акцепторными и донорскими CDR среди других критериев. Пригодная акцепторная последовательность для тяжелых цепей 20F3 включает IGHV7-4-1-IGHJ6. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее CDR, полученные полностью или по существу из донорных антител и каркасных последовательностей варибельной области и константных областей, если они присутствуют, полученную полностью или по существу из последовательностей антител человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь обычно имеет все три CDR, полученные полностью или существенно из тяжелой цепи донорного антитела и каркасную последовательность варибельной области тяжелой цепи, и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, полученную по существу, из каркаса варибельной области тяжелой цепи

человека и последовательностей константной области. Аналогично, гуманизированная легкая цепь обычно имеет все три CDR, полученные полностью или существенно из легкой цепи донорного антитела и каркасную последовательность варибельной области легкой цепи, и константную область легкой цепи, если она присутствует, полученную по существу, из каркаса варибельной области легкой цепи человека и последовательностей константной области. CDR в гуманизированном антителе происходят "по существу из" соответствующего CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (определенных по Kabat) являются идентичными между соответствующими CDR. Каркасные последовательности варибельной области цепи антитела или константной области цепи антитела являются по существу полученными из каркасной последовательности варибельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Kabat, являются идентичными.

Хотя гуманизированные антитела часто содержат все шесть CDR (предпочтительно, определенных по Kabat или IMGT®) из антитела мыши, они также могут быть созданы с меньшим количеством CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR из антитела мыши (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164: 1432- 1441, 2000).

Определенные аминокислоты из каркасных остатков варибельной области человека могут быть выбраны для замещения в зависимости от их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний заключается в моделировании, изучении характеристик аминокислот в определенных местах или эмпирическом наблюдении эффектов замещения или мутагенеза определенных аминокислот.

Например, когда аминокислота отличается в каркасном остатке варибельной области мыши и выбранным каркасным остатком варибельной области человека, каркасная аминокислота человека может быть замещена эквивалентной каркасной аминокислотой из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота:

- (1) непосредственно нековалентно связывает антиген,
- (2) является смежной с областью CDR,
- (3) в противном случае взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 А от области CDR);
- (4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями или
- (5) является результатом соматической мутации в цепи мыши.
- (6) является сайтом гликозилирования.

Каркасные остатки классов (1)-(3) иногда поочередно упоминаются как канонические и верньерные остатки. Каркасные остатки, определяющие канонический класс донорных петель CDR, определяющих конформацию петли CDR, иногда называются каноническими остатками (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin *J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996). Слой каркасных остатков, которые поддерживают антигенсвязывающие петлевые конформации, играя определенную роль в тонкой настройке подгонки антитела к антигену, иногда называют верньерными остатками (Foote & Winter, 1992, *J Mol Bio.* 224, 487-499).

В данном изобретении предложено антитело 20F3 и его гуманизированные, химерные и верньерные формы. В данном изобретении предложены гуманизированные формы антитела 20F3 мыши, содержащие пять типичных гуманизированных зрелых варибельных областей тяжелой цепи (HA, HB, HC, HD и HE) (SEQ ID NO: 5-9) и четыре типичные гуманизированные легкие цепи (LA, LB, LC и LD) (SEQ ID NO: 15-18), которые можно комбинировать в разных перестановках с адекватным связыванием. Из этих перестановок предпочтительнее использовать HDLD, поскольку он обладает наилучшей комбинацией свойств связывания и приемлемого числа обратных мутаций. HDLD также сохранил привязку к супо-NTB-A. HDLD также имеет хороший выход в культуре клеток и демонстрирует небольшую агрегацию. Другие комбинации с EC50 в пределах фактора 20F3 мыши и меньшие обратные мутации, чем у HDLD, включают HCLB, HCLD, HDLB и HELB.

В данном изобретении предложены гуманизированные формы антитела 20F3 мыши, в котором антитело содержит 3 CDR тяжелой цепи SEQ ID NO:3 и 3 CDR легкой цепи SEQ ID NO:13, где CDR обозначены по Kabat. В данном изобретении также предложены гуманизированные формы антитела 20F3 мыши, в котором антитело содержит 3 CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 3 и 3 CDR легкой цепи SEQ ID NO:13, где CDR определены по IMGT. CDR тяжелой цепи Kabat, как указано в SEQ ID NO: 10-12, и CDR легкой цепи Kabat, как указано в SEQ ID NO: 19-21. CDR тяжелой цепи IMGT®, как указано в SEQ ID NO: 22-24, и CDR легкой цепи IMGT®, как указано в SEQ ID NO: 25-27.

В данном изобретении предложены гуманизированные формы антитела 20F3 мыши, в котором каркасная область легкой цепи получена из донорной последовательности зародышей линии человека vHIGRV3-11 и экзона hIGRJ4, а тяжелая цепь получена из донорной последовательности зародышей линии человека hIGHV7-4-1 и экзона hIGHJ6. Соответственно, гуманизированные антитела, описанные в

данном документе, могут быть гуманизированы с использованием донорной последовательности зародышей линии человека hIGKV3-11 и экзона hIGKJ4 для вариабельной области легкой цепи и донорной последовательности зародышей линии человека IGHV7-4-1 и экзона hIGHJ6 для вариабельной области тяжелой цепи. CDR могут быть определенными по Kabat или IMGT.

В данном изобретении предложены варианты гуманизованного антитела HDLD, в котором гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности к SEQ ID NO: 8, а зрелая вариабельная область гуманизованной легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности SEQ ID NO:18. Предпочтительно в таких антителах сохраняются некоторые или все обратные мутации в HDLD. В некоторых антителах по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или все 12 из следующих каркасных положений вариабельной области занимают, как указано: H2 занимает I, H44 занимает D, H46 занимает K, H73 занимает K, H76 занимает N, L1 занимает Q, L5 занимает S, L21 занимает M, L46 занимает P, L47 занимает W, L58 занимает V, L71 занимает Y; нумерация осуществляется согласно системе нумерации Kabat. Области CDR таких гуманизованных антител предпочтительно являются по существу идентичными областям CDR HDLD, определенными по Kabat, которые являются такими же, как и у донорного антитела мыши. В одном варианте осуществления изобретения гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8 и каркасные последовательности вариабельной области с идентичностью, равной по меньшей мере 95% каркасной последовательности вариабельной области SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления изобретения гуманизованное антитело содержит легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO:18 и каркасные последовательности вариабельной области с идентичностью, равной по меньшей мере 95% каркасной последовательности вариабельной области SEQ ID NO: 18.

В данном изобретении предложены варианты гуманизованного антитела HDLD, в котором гуманизованная зрелая вариабельная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 8, а зрелая вариабельная область гуманизованной легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности SEQ ID NO: 18. В некоторых антителах следующие каркасные положения вариабельной области занимают, как указано: H2 занимает I, H38 занимает R или K, H44 занимает D или G, H46 занимает K или E, H68 занимает V или A, H73 занимает K, H76 занимает N или S, H91 занимает Y или F, L1 занимает Q или E, L5 занимает S или T, L21 занимает M или L, L46 занимает P, L47 занимает W, L58 занимает V или I и L71 занимает Y; нумерация осуществляется согласно системе нумерации Kabat. Области CDR таких гуманизованных антител предпочтительно являются по существу идентичными областям CDR HDLD, определенными по Kabat, которые являются такими же, как и у донорного антитела мыши. В одном варианте осуществления изобретения гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8 и каркасные последовательности вариабельной области с идентичностью, равной по меньшей мере 95% каркасной последовательности вариабельной области SEQ ID NO: 8. В другом варианте осуществления изобретения гуманизованное антитело содержит легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 18 и каркасные последовательности вариабельной области с идентичностью, равной по меньшей мере 95% каркасной последовательности вариабельной области SEQ ID NO: 18.

Поскольку гуманизованные антитела 20F3 демонстрируют любое отклонение от представленного в качестве примера гуманизованного антитела HDLD, одна из возможностей такого дополнительного изменения - дополнительные обратные мутации в каркасных последовательностях вариабельной области. Любые или все позиции, подвергнутые обратной мутации в других примерах гуманизованной зрелой вариабельной области тяжелой или легкой цепи, могут быть осуществлены (т.е. 1, 2 или все 3 из H38, занимает K, H68 занимает A, H91 занимает F). Однако такие дополнительные обратные мутации не являются предпочтительными, поскольку они в целом не улучшают аффинность, а введение большего количества остатков мыши может привести к повышенному риску иммуногенности. Варианты включают HALA, HALB, HALC, HALD, HBLA, HBLB, HBLC, HBLD, HCLA, HCLB, HCLC, HCLD, HDLA, HDLB, HDLC, HELA, HELB, HELC и HELD.

Другое возможное изменение заключается в замещении некоторых остатков в CDR антитела мыши соответствующими остатками последовательностей CDR человека, как правило, из CDR акцепторных последовательностей человека, применяемых при конструировании типичных гуманизованных антител. В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизованном антителе необходима только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном, а не входящие в SDR, могут быть идентифицированы на основе предыдущих исследований с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически. В таких гуманизованных антителах в положениях, в которых отсутствует один или более донорных остатков CDR, аминокислота, занимающая положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замещений акцептора для донорных аминокислот, содержащихся в CDR, отражает баланс конкурирующих соображений. Такие замещения потенциально выгодны для уменьшения количества аминокислот мыши

в гуманизованном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замещения также могут вызывать изменения аффинности, а значительного снижения сродства предпочтительно избегать.

Хотя могут быть осуществлены другие неpreferred аминокислотные замещения, например, в каркасных остатках, не контактирующих с CDR, или даже в некоторых потенциальных CDR-контактирующих остатках аминокислот в пределах CDR. Часто замены, сделанные в вариантах гуманизованной последовательности, являются консервативными относительно замещенных аминокислот HDLD. Предпочтительно замены относительно HDLD (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизованного mAb, то есть его способность связывать NTB-A человека и ингибировать рост раковых клеток.

Варианты обычно отличаются от последовательностей зрелой варибельной области тяжелой и легкой цепей HLD небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5 или 10 в зрелой варибельной области легкой цепи или тяжелой цепи, или в обеих) замен, делеций или вставок. Антитела могут быть проанализированы на специфическое связывание обычными способами, включая иммунологический анализ, который включает аналитические системы, использующие такие методики, как вестерн-блоттинг, радиоиммуноанализ, твердофазный ИФА, "сэндвич-иммунологический анализ", иммунопреципитационный анализ, анализ на основе преципитинов, анализ на гель-диффузионных преципитинах, иммунорадиометрический анализ, флуоресцентный иммуноанализ, иммуноанализ белка А и тесты фиксации комплекса. Такой анализ является обычным и хорошо известен в данной области техники (см., например, Ausubel et al., eds, 1994, *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 1, John Wiley & sons, Inc., New York). Протокол насыщения связывания в примерах может использоваться для определения конкретного связывания.

Любое из антител может быть выбрано так, чтобы иметь такую же или перекрывающуюся специфичность эпитопа, как и типичное антитело, такое как антитело 20F3 мыши, путем конкурентного анализа связывания или иным образом. Конкуренция между антителами оценивается по способности тестируемого антитела конкурировать с эталонным антителом, в данном случае -20F3 мыши, за специфическое связывание с NTB-A человека. Типичное антитело 20F3 мыши имеет зрелые варибельные области тяжелой и легкой цепи SEQ ID NO: 3 и 13, и имеет изотип IgG1 каппа. Предпочтительные антитела обладают той же специфичностью эпитопа, что и антитело 20F3. Специалисты в данной области техники способны идентифицировать эпитоп, связанный антителом, используя множество методов. Например, олигопептидное сканирование на основе массива или анализ пепскана используют библиотеку олигопептидных последовательностей из перекрывающихся и непересекающихся сегментов целевого антигена и тестируют их способность связывать интересующее антитело. См., например, Geysen et al., *PNAS* 81:3998-4002 (1984). Нелинейные эпитопы можно идентифицировать, используя, например, технологию CLIPS™ -вариацию олигопептидного сканирования на основе массивов. См., например, Timmerman et al., *Open Vaccine J.* 2:56-67 (2009). Белок-антиген также может быть подвергнут мутагенезу, а затем использоваться для оценки связывания с представляющим интерес антителом. Может быть использован белковый систематический сайт-направленный мутагенез или может быть создана библиотека мутаций и использована для скрининга связывания антитела. Мутационные библиотеки могут быть приобретены, например, в Integral Molecular. Для идентификации эпитопов можно использовать МС на основе амидного обмена водород/дейтерий. Интересующие антигены помещают в дейтерированную воду и маркируют дейтронами. Затем белок расщепляют протеазой и полученные фрагменты пептида подвергают масс-спектрометрическому анализу. Антиген также оценивают в присутствии антитела, и различия в мечении пептидных фрагментов указывают области связывания антитела.

IV. Выбор константной области

Антитела против NTBA, содержащие домен VH и/или VL, могут быть связаны по меньшей мере с частью константной области иммуноглобулина (например, константной области иммуноглобулина человека). Например, некоторые антитела против NTB-A содержат первую и вторую полипептидные цепи, где первая полипептидная цепь содержит домен VH, как описано в данном документе, связанный по меньшей мере с частью константной области тяжелой цепи иммуноглобулина, а вторая полипептидная цепь содержит домен VL, как описано в данном документе, связанный, по меньшей мере, с частью константной области легкой цепи иммуноглобулина. Как правило, домен VH или VL связан с аминоконца с константной областью иммуноглобулина или ее частью. В частности, вариации антитела, содержащие первую и вторую полипептидные цепи, причем первая и вторая полипептидные цепи имеют доменную структуру, соответствующую тяжелой и легкой цепям интактного нативного антитела, например, первую полипептидную (тяжелую) цепь, имеющую в направлении с аминоконца к карбоксильному концу доменную структуру VH-CH1-шарнир-CH2-CH3 и вторую полипептидную (легкую) цепь, имеющую в направлении с аминоконца к карбоксильному концу доменную структуру VL-CL.

Некоторые антитела против NTB-A представляют собой одноцепочечные антитела, содержащие домен VH, домен VL и по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (например, константную область тяжелой цепи без домена CH1), соединенную в пределах одной полипептидной цепи. Например, домены VH и VL могут быть сконструированы в виде одноцепочечного Fv (scFv) в ориентации VH/VL

или VL/VH (аминоконец/карбоксильный конец), причем scFv связан (как правило, с amino-конца) с константной областью тяжелой цепи, такой как, например, константная область, содержащая домены CH2 и CH3, но без домена CH1. ScFv обычно связывается с константной областью посредством линкера, такого как, например, линкер, полученный из шарнирной области иммуноглобулина.

Выбор константной области может частично зависеть от того, требуется ли антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изотопы IgG1 и IgG3 человека обладают сильной комплементзависимой цитотоксичностью, IgG2 человека обладает слабой комплементзависимой цитотоксичностью, а IgG4 человека не обладают комплементзависимой цитотоксичностью. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные эффекторные функции, опосредованные клетками, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные области легкой цепи могут представлять собой лямбда или каппа. Типичные константные области тяжелой и легкой цепей представлены в SEQ ID NOS: 27, 28 и 29. Антитела могут быть экспрессированы, например, в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, таких как Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv или в виде одноцепочечных антител, в которых вариабельные домены тяжелой и легкой цепи связаны через спейсер. Кроме того, при необходимости константные области могут быть подвергнуты мутации. В некоторых аспектах мутантная форма естественной константной области человека будет уменьшать связывание с рецептором Fcγ относительно естественной константной области человека.

Константные области человека демонстрируют аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между разными индивидуумами, то есть константные области могут различаться у разных индивидуумов в одном или более полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью одного или более других изотипов.

Одна или более аминокислот на amino или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как C-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или дериватизироваться в пропорции или во всех молекулах. Замещения могут быть осуществлены в константных областях для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как комплементопосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597 и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для продления периода полувыведения у людей (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

Типичная замена включает аминокислотную замену нативной аминокислоты на остаток цистеина, вводимый в аминокислотное положение 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутация S239C в изоформе IgG1 человека (US 20100158909; нумерация области Fc соответствует индексу EU). В некоторых аспектах присутствие дополнительного остатка цистеина позволяет образовывать межцепочечные дисульфидные связи. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызвать стерическое несоответствие, тем самым уменьшая аффинность связывающего взаимодействия область Fc-FcγR. Остаток (остатки) цистеина, введенный в близости к области Fc константной области IgG или непосредственно в нее, может также служить в качестве сайтов для конъюгации с терапевтическими агентами (то есть связывание цитотоксических лекарственных средств с использованием тиоловых специфических реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств). Наличие терапевтического агента вызывает стерическое несоответствие, тем самым дополнительно уменьшая аффинность связывающего взаимодействия область Fc-FcγR. Другие замещения в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 уменьшают аффинность с рецепторами Fcγ, в частности с рецептором FcγRI (см., например, US 6624821, US 5624821).

Период полувыведения антитела *in vivo* также может влиять на его эффекторные функции. Период полувыведения антитела можно увеличить или уменьшить, чтобы изменить его терапевтическую активность. FcRn представляет собой рецептор, который структурно подобен антигену ГКГС (главного комплекса гистосовместимости) класса I, который нековалентно ассоциируется с 2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз через ткани (Ghetie and Ward, Annu. Rev. Immunol. 18:739-766, 2000; Ghetie and Ward, Immunol. Res. 25:97-113, 2002). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6,0 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет вернуть IgG обратно в кровотока (Ghetie and Ward, 2000, выше; Ghetie and Ward, 2002, выше). Область IgG1 человека, участвующая в связывании FcRn была картирована (Shields et al., J. Biol. Chem. 276:6591-604, 2001). Аланиновые замещения в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 IgG1 человека усиливают связывание FcRn (Shields et al., выше). Молекулы IgG1, содержащие эти замещения, имеют более длительный период полувыведения в сыворотке. Следовательно, эти модифицированные молекулы IgG1 могут выполнять свои эффекторные функции и, следовательно, оказывать свою терапевтическую эффективность в течение более длительного периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие типичные замещения для увеличения связывания с FcRn включают Gin в положении 250 и/или Leu в положении 428. Нумерация EU используется для всех позиций в константной области.

Олигосахариды, ковалентно присоединенные к консервативному Asn297, участвуют в способности области Fc IgG связывать FcγR (Lund et al., *J. Immunol.* 157:4963-69, 1996; Wright and Morrison, *Trends Biotechnol.* 15:26-31, 1997). Модификация данной гликоформы на IgG может значительно улучшить IgG-опосредованную АЗКЦ. Добавление биссектирующих модификаций N-ацетилглюкозамина (Umaña et al., *Nat. Biotechnol.* 17: 176-180, 1999; Davies et al., *Biotech. Bioeng.* 74:288-94, 2001) к данной гликоформе или удаление фукозы (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 277:26733-40, 2002; Shinkawa et al., *J. Biol. Chem.* 278:6591-604, 2003; Niwa et al., *Cancer Res.* 64:2127-33, 2004) из этой гликоформы являются двумя мерами модификации Fc IgG, которые улучшает связывание между Fc IgG и FcγR, тем самым усиливая активность Ig-опосредованной АЗКЦ.

Системное замещение доступных для растворителя аминокислот области Fc IgG1 человека породило варианты IgG с измененной аффинностью связывания FcγR (Shields et al., *J. Biol. Chem.* 276:6591-604, 2001). По сравнению с родительским IgG1 подмножество этих вариантов, содержащих замещения в Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333/Lys334 на Ala, демонстрирует увеличение как сродства связывания с FcγR, так и активности АЗКЦ (Shields et al., 2001, выше; Okazaki et al., *J. Mol. Biol.* 336:1239-49, 2004).

Активность фиксации комплемента антител (как связывание Clq, так и активность CDC) может быть улучшена путем замещений в Lys326 и Glu333 (Idusogie et al., *J. Immunol.* 166:2571-2575, 2001). Те же самые замещения в основной цепи IgG2 человека могут превращать изотип антитела, который плохо связывается с Clq и обладает сильно уменьшенной активностью активации комплемента в тот, который может связывать Clq и опосредовать CDC (Idusogie et al., выше). Несколько других методов также были применены для улучшения активности фиксации комплемента антител. Например, пересадка 18-аминокислотной карбоксильной концевой части IgM на карбоксильные концы IgG значительно усиливает их CDC-активность. Это наблюдается даже с IgG4, который обычно не проявляет CDC-активности (Smith et al., *J. Immunol.* 154:2226-36, 1995). Также, замещая Ser444, расположенный близко к карбоксильному концу тяжелой цепи IgG1 с Cys-индуцированной димеризацией IgG1хвост-к-хвосту с 200-кратным увеличением активности CDC по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes et al., *J. Immunol.* 148:2918-22, 1992). Кроме того, биспецифическая конструкция диатела со специфичностью к Clq также обеспечивает активность CDC (Kontermann et al., *Nat. Biotech.* 15:629-31, 1997).

Активность комплемента может быть уменьшена путем мутации по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи с остатком, имеющим другую боковую цепь, таким как Ala. Другие алкилзамещенные неионогенные остатки, такие как Gly, He, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки как Phe, Tyr, Trp и Pro вместо любого из трех остатков также уменьшают или устраняют связывание Clq. Ser, Thr, Cys и Met могут быть использованы на остатках 320 и 322, но не 318, для уменьшения или устранения активности связывания Clq. Замещение остатка 318 (Glu) полярным остатком может изменять, но не устранять активность связывания Clq. Замещение остатка 297 (Asn) на Ala приводит к удалению литической активности, но лишь незначительно уменьшает (примерно в три раза слабее) сродство с Clq. Это изменение разрушает сайт гликозилирования и присутствие углеводов, которое требуется для активации комплемента. Любое другое замещение на этом участке также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также уменьшают связывание Clq: D270A, K322A, P329A и P311S (см. WO 06/036291).

Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую перестановку остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах. Кроме того, может присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций относительно естественной константной области человека, такой как указанные выше, для снижения связывания Fc гамма-рецептора или увеличения связывания с FcRn.

V. Нуклеиновые кислоты и способы получения

В данном изобретении также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие любой из доменов VH и/или VL, описанных выше, включая полипептиды, содержащие домены VH и/или VL, связанные с дополнительными полипептидными сегментами, такими как, например, полипептидные сегменты, соответствующие константной области иммуноглобулина. Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый аминоконцом, с зрелым полипептидом, содержащим домены VH и/или VL. Кодирующие последовательности на нуклеиновых кислотах могут находиться в функциональной связи с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, сигнал терминации транскрипции и тому подобное. Нуклеиновые кислоты могут встречаться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, путем твердофазного синтеза или ПЦР с перекрывающимися олигонуклеотидами. Нуклеиновые кислоты, кодирующие как домен VH, так и домен VL (например, в контексте антител, содержащих отдельные тяжелые и легкие цепи), могут быть соединены в виде одной смежной нуклеиновой кислоты, например, внутри экспрессионного вектора или могут быть отдельными, например, каждый клонируется в свой собственный вектор экспрессии.

Антитела против NTB-A обычно продуцируются путем рекомбинантной экспрессии одной или более нуклеиновых кислот, кодирующих одну или более цепей антител. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно содержат последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями одной или более полипептидных цепей, содержащих VH и/или VL-домены, включая природно-ассоциированные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно контролирующая экспрессию последовательности представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. Как только вектор был включен в соответствующего хозяина, хозяин поддерживается в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей на высоком уровне, а также для сбора и очистки перекрестно реагирующих антител.

Для экспрессии антител, содержащих первую и вторую полипептидные цепи (например, тяжелые и легкие цепи), две полипептидные цепи могут быть совместно экспрессированы из отдельных векторов в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы антитела. Альтернативно, две полипептидные цепи могут быть совместно экспрессированы из отдельных экспрессирующих единиц в одном и том же векторе в клетке-хозяине для экспрессии всей молекулы антитела.

Клетки млекопитающих являются предпочтительным хозяином для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Ряд пригодных линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, был разработан в данной области техники и включает линии клеток CHO (например, DG44), различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки НЕК293, L-клетки и непродуцирующие антитело миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки не являются клетками человека.

Экспрессирующие векторы для этих клеток могут содержать последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49, 1986) и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, папилломавируса быка и тому подобного. См. Co et al., *J. Immunol.* 148: 1149, 1992.

После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными способами в данной области техники, включая очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и тому подобное (см., в основном, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

VI. Конъюгаты лекарственного средства с антителом

Антитела против NTB-A могут быть конъюгированы с цитотоксическими или цитостатическими фрагментами с образованием конъюгатов лекарственного средства с антителом (ADC). Особенно пригодными фрагментами для конъюгации с антителами являются цитотоксические агенты (например, химиотерапевтические агенты), ферменты, превращающие пролекарство, радиоактивные изотопы или соединения, или токсины (эти фрагменты в совокупности называются терапевтическим агентом). Например, антитело против NTB-A можно конъюгировать с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, или токсином (например, цитостатическим или цитотоксическим агентом, таким как, например, абрин, рицин А, экзотоксин псевдомонасы или токсин дифтерии). Примеры пригодных классов цитотоксических агентов включают, например, связывающие вещества малой бороздки ДНК, алкилирующие агенты ДНК и ингибиторы тубулина. Типичные цитотоксические агенты включают, например, ауристатины, камптотецины, калихеамицины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды (например, DM1, DM2, DM3, DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пиррол[1,4]бензодиазепины, индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины, включая пиррол[1,4]бензодиазепиновые димеры, димеры индолинобензодиазепина и димеры оксазолидинобензодиазепина) и алкалоиды вьюнка.

Антитело против NTB-A можно конъюгировать с ферментом, способствующим превращению пролекарства. Фермент, способствующий превращению пролекарства может быть рекомбинантно слит с антителом или химически конъюгирован с ним с использованием известных способов. Типичные ферменты, способствующие превращению пролекарства представляют собой карбоксипептидазу G2, бета-глюкуронидазу, пенициллин-V-амидазу, пенициллин-G-амидазу, β -лактамазу, β -глюкозидазу, нитроредуктазу и карбоксипептидазу А.

Хорошо известны методики конъюгирования терапевтических агентов с белками и, в частности, с антителами. (См., например, Alley et al., *Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14: 1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14(3): 154-169.) Терапевтический агент может быть конъюгирован таким образом, который уменьшает его активность, если только он не отщепляется от антитела (например, путем гидролиза, путем протеолитической деградации или расщепляющего агента). В некоторых аспектах терапевтический агент присоединен к антителу с расщепляемым линкером, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде NTB-A-экспрессирующей раковой клетки, но не является существенно чувствительным к внеклеточной среде, так что конъюгат расщепляется от антитела, когда оно интернализуется с помощью NTB-A-экспрессирующей раковой клетки (например, в эндосомальной или, например, в силу чувствительности к pH или чувствительности к протеазе, в лизосомальной среде или в кавеоларной сре-

де). В некоторых аспектах терапевтический агент также может быть присоединен к антителу с нерасщепляемым линкером.

Обычно ADC содержит линкерную область между цитотоксическим или цитостатическим агентом и антителом против NTB-A. Как отмечено выше, обычно, линкер может быть расщепляемым во внутриклеточных условиях, так что расщепление линкера высвобождает терапевтический агент из антитела во внутриклеточной среде (например, в лизосоме или эндосоме или кавеоле). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или протеазным ферментом, включая лизосомальную или эндосомную протеазу. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999). Наиболее типичными являются пептидильные линкеры, которые расщепляются ферментами, которые присутствуют в клетках, экспрессирующих NTB-A. Например, можно использовать пептидильный линкер, который расщепляется тиолозависимым протеазным катепсином-В, который на высоком уровне экспрессируется в раковой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Val-Cit).

Расщепляемый линкер может быть чувствительным к pH, то есть чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер гидролизуются в кислых условиях. Например, может быть использован кислотно-лабильный линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т.п.). (См., например, патенты США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999; Neville et al., Biol. Chem. 264: 14653-14661, 1989.) Такие линкеры относительно стабильны при нейтральных условиях pH, например, в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительно значении pH лизосомы.

Другие линкеры расщепляются в щелочных условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают те, которые могут быть образованы с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридил-дитио)толуол), SPDB и SMPT. (См., например, Thorpe et al., Cancer Res. 47:5924-5931, 1987; Wawrzynczak et al., In Immunconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4880935.)

Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al., Anticancer Res. 15: 1387- 93, 1995), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3: 1299-1304, 1995), или 3"-N-амидный аналог (Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3: 1305-12, 1995).

Линкер также может быть нерасщепляемым линкером, таким как малеимидаоалкилен- или малеимид-арильный линкер, который непосредственно присоединен к терапевтическому агенту и высвобождается путем протеолитической деградации антитела.

Как правило, линкер не является существенно чувствительным к внеклеточной среде, а это означает, что не более около 20%, типично не более около 15%, более типично не более около 10% и даже более типично не более около 5% не более около 3% или не более около 1% линкеров в образце ADC расщепляется, когда ADC присутствует во внеклеточной среде (например, в плазме). Является ли линкер по существу нечувствительным к внеклеточной среде или нет, можно определить, например, путем инкубации независимо от плазмы как (а) ADC ("образец ADC"), так и (б) равного молярного количества неконъюгированного антитела или терапевтического агента ("контрольный образец") в течение заданного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 ч), а затем сравнивая количество неконъюгированного антитела или терапевтического агента, присутствующего в образце АЦП, с присутствующим в контрольном образце, измеренном, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Линкер также может способствовать клеточной интернализации. Линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгировании с терапевтическим агентом (то есть в среде линкер-фрагмент терапевтического агента ADC или производного ADC, как описано в данном документе). Альтернативно, линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгировании как с терапевтическим агентом, так и с антителом против NTB-A (то есть в среде ADC, как описано в данном документе).

Антитело против NTB-A можно конъюгировать с линкером через гетероатом антитела. Эти гетероатомы могут присутствовать на антителе в его естественном состоянии или могут быть введены в антитело. В некоторых аспектах антитело против NTB-A будет конъюгировано с линкером через атом азота остатка лизина. В других аспектах антитело против NTB-A будет конъюгировано с линкером через атом серы остатка цистеина. Способы конъюгирования линкера и линкера лекарственного средства с антителами известны в данной области техники.

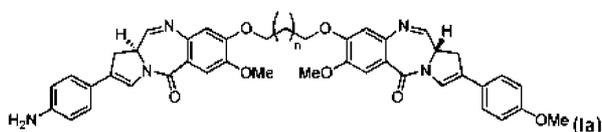
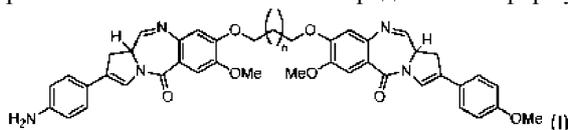
Типичные конъюгаты лекарственного средства с антителом включают конъюгаты лекарственного средства с антителом на основе ауристатиона, что означает, что лекарственным компонентом является препарат ауристатиона. Показано, что ауристатины, связывающие тубулин, влияют на динамику микротрубочек и ядерное и клеточное деление и обладают противоопухолевой активностью. Обычно конъюгат лекарственного средства с антителом на основе ауристатиона содержит линкер между лекарственным средством ауристатин и антителом против NTB-A. Линкер может быть, например, расщепляемым линке-

ром (например, пептидным линкером) или нерасщепляемым линкером (например, линкером, высвобождаемым путем деградации антитела). Ауристатинны включают MMAF и MMAE. Синтез и структура типичных ауристатиннов описаны в публикациях США № 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждый из которых включен в настоящий документ посредством ссылки во всей его полноте и для всех целей.

Другие типичные конъюгаты лекарственного средства с антителом включают конъюгаты лекарственного средства с антителом майтанзиноид, что означает, что лекарственный компонент представляет собой лекарственное средство майтанзиноид, и конъюгаты лекарственного средства с антителом бензодиазепин, что означает, что лекарственный компонент представляет собой бензодиазепин (например, димеры пиррол[1,4]бензодиазепина, димеры индолинобензодиазепина и димеры оксазолидинобензодиазепина).

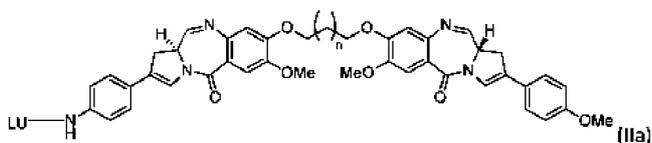
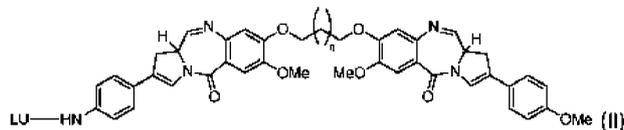
Авторы данного изобретения обнаружили, что ADC, нацеленный на гуманизированный NTB-A, содержащий лекарственное средство PBD-линкер, является особенно эффективным.

Предпочтительный PBD для применения в данном изобретении представлен формулой I. Предпочтительная стереохимия лекарственного компонента PBD представлена формулой 1a



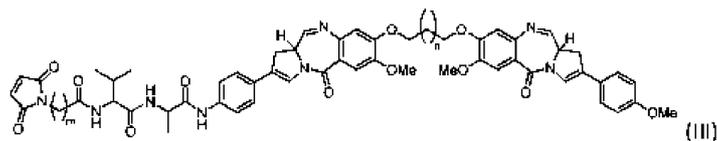
или фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где индекс n равен 1 или 3.

Димер PBD формулы I (или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват соли) обычно связывают с антителом через линкерную единицу - LU. Линкерная единица используется для высвобождения димера PBD формулы I (или его фармацевтической соли, сольвата или сольвата соли) в целевом сайте (например, внутри раковой клетки). Соединение лекарственное средство PBD-линкер для применения в данном изобретении представлено ниже формулой II (предпочтительная стереохимия, как показано в IIa), где LU представляет собой линкерную единицу. Линкерная единица может представлять собой, например, расщепляемую пептидную линкерную единицу (например, линкер, содержащий валин-аланиновый пептид) или расщепляемую дисульфидную линкерную единицу



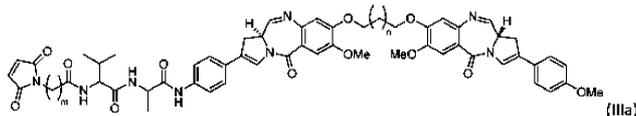
или фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где индекс n равен 1 или 3.

Предпочтительное соединение лекарственное средство PBD-линкер для применения в данном изобретении представлено формулой III ниже:

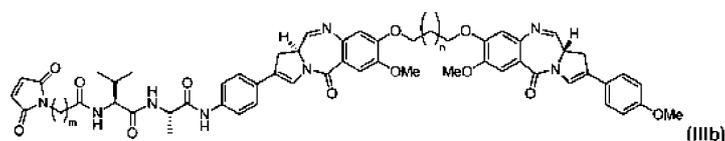


или фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где индекс n равен 1 или 3, а индекс m равен целому числу 2-5.

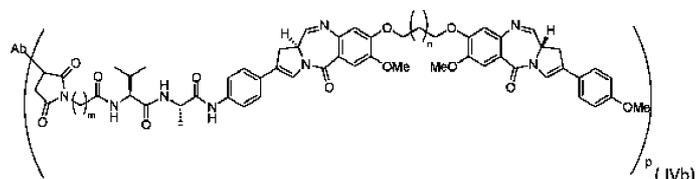
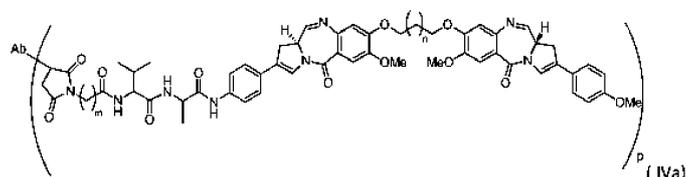
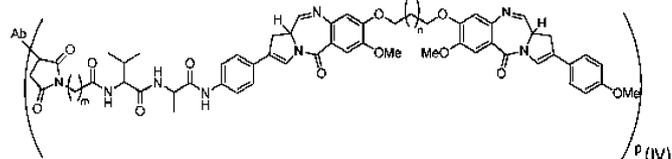
Предпочтительная стереохимия лекарственного компонента PBD лекарственного средства-линкера представлена ниже формулой IIIa



Предпочтительная стереохимия лекарственного компонента PBD и линкерных компонентов лекарственного средства-линкера SGD-1910 представлена ниже формулой IIIb



Лекарственное средство PBD-линкер конъюгируют с антителом 20F3, включая верньерные, химерные и гуманизированные формы, для получения конъюгата лекарственного средства с антителом, нацеленного на NTB-A. Например, антитело может быть конъюгировано с лекарственным средством-линкером формулы II или формулы III. Типичный целевой конъюгат антитело-лекарственного средства типа NTB-A представлен ниже на формулах IV, IVa и IVb



или фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где индекс p равен 1 или 3, индекс m равен целому числу 2-5, а индекс r равен целому числу 1-4.

В данном изобретении предложены композиции, включая фармацевтические композиции, содержащие конъюгаты лекарственного средства с антителом против NTB-A, включая те, которые в частности приведены в данном документе. Композиции обычно включают популяцию молекул конъюгата лекарственного средства с антителом.

Лекарственная нагрузка - "p"

Ссылаясь на конъюгаты лекарственного средства с антителом, нацеленные на NTB-A, имеющие формулы IV, IVa и IVb, индекс p представляет собой нагрузку лекарственного средства для молекулы антитела (количество молекул лекарственного средства, присоединенного к молекуле антитела) и представляет собой целочисленное значение. В композиции, содержащей популяцию молекул конъюгата лекарственного средства с антителом, средняя нагрузка лекарственного средства (например, среднее число молекул лекарственного средства с антителом в популяции) является важным атрибутом качества, поскольку он определяет количество лекарственного средства, которое может быть доставлено к клетке-мишени. Средняя нагрузка лекарственного средства может быть целочисленным или нецелочисленным значением, но обычно является нецелочисленным значением.

Неоднородность композиции конъюгата лекарственного средства с антителом в некоторых аспектах будет зависеть от технологии конъюгации, используемой для конъюгации молекул-лекарственного средства с молекулами антител. Например, в некоторых аспектах технология конъюгации, используемая для конъюгации молекул лекарственного средства-линкер с молекулами антитела, приведет к композиции конъюгата лекарственного средства с антителом, которая является гетерогенной по отношению к распределению молекул лекарственного средства-линкер на антителах и/или относительно количества лекарственных средств-линкеров на молекулах антител (например, при конъюгировании через межцепочечные дисульфиды с использованием не сайт-специфической технологии). Например, в некоторых аспектах технология конъюгации, используемая для конъюгации молекул лекарственного средства-линкер с молекулами антитела, приведет к композиции конъюгата лекарственного средства с антителом, которая по существу является гомогенной по отношению к распределению молекул лекарственного средства-линкер на молекулах-лигандах и/или относительно количества лекарственных средств-линкеров на молекулах антител (например, при использовании сайт-специфической технологии конъюгации). Как при

использовании сайт-специфических, так и не сайт-специфических методов также может быть небольшой процент неконъюгированных молекул антител. Процент неконъюгированных молекул антител включен в среднее значение лекарственной нагрузки.

В предпочтительных аспектах данного изобретения средняя нагрузка лекарственного средства, когда речь идет о композиции, содержащей популяцию конъюгата лекарственного средства с антителом, составляет от около 2 до около 14, предпочтительно от около 2 до около 10. Для конъюгатов лекарственного средства PBD-антитело, таких как приведенные в качестве примеров в данном документе, особенно предпочтительная средняя нагрузка лекарственного средства составляет около 2. В некоторых аспектах фактическая нагрузка лекарственного средства для отдельных молекул антител в популяции конъюгата лекарственного средства с антителом составляет от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2 при преобладающей лекарственной нагрузке 2. В предпочтительных аспектах средняя нагрузка лекарственного средства, равная 2 достигается с помощью специфичных для конкретного участка методов конъюгации (например, модифицированных цистеинов, вводимых в антитело в положение 239, в соответствии с системой нумерации оснований EU).

В других аспектах данного изобретения средняя нагрузка лекарственного средства, относящаяся к композиции, содержащей популяцию конъюгата PBD лекарственного средства с антителом, составляет около 3 или около 4, а фактическая нагрузка лекарственного средства для отдельных молекул антител в популяции конъюгата лекарственного средства с антителом составляет 1-6, 1-5, 1-4 или 1-3.

Среднее количество единиц лекарственное средство-линкер на единицу лиганда в препарате от реакции конъюгации может быть охарактеризовано обычными способами, такими как масс-спектрометрия, твердофазный ИФА, НИС (гидрофобная интерактивная хроматография) и ВЭЖХ. Кроме того, можно определить количественное распределение конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство по отношению к р. В некоторых случаях путем таких средств, как обращенно-фазная ВЭЖХ или электрофорез, можно достичь отделения, очистки и оценки характеристик гомогенных конъюгатов лиганд-линкер-лекарственное средство, в котором р представляет собой определенное значение, от конъюгата лиганд-линкер-лекарственное средство с другими значениями лекарственной нагрузки.

VII. Применения

Антитела против NTBA, описанные в данном документе, в виде голых антител или в виде конъюгатов лекарственного средства с антителом, могут быть применены в способах лечения заболевания или расстройства, связанных с клеткой, экспрессирующей NTB-A.

Например, антитела против NTBA, описанные в данном документе, в виде голых антител или в виде конъюгатов лекарственного средства с антителом, могут быть применены для лечения рака, экспрессирующего NTB-A. Некоторые из таких видов рака демонстрируют обнаруживаемые уровни NTB-A, измеренные либо на уровне белка (например, с помощью иммуноанализа с использованием одного из типичных антител), либо на уровне мРНК. Некоторые из таких видов рака демонстрируют повышенные уровни NTB-A относительно тканей того же типа, не пораженных раком, предпочтительно от одного и того же пациента. Примерный уровень NTB-A в раковых клетках, пригодный для лечения, составляет 5000-150000 молекул NTB-A на клетку, хотя можно лечить более высокие или более низкие уровни. Обязательно, уровень NTB-A в раке измеряется перед проведением лечения.

Примеры раков, связанных с экспрессией NTB-A и поддающиеся лечению голыми антителами или конъюгатами антитело-лекарственное средства, описанными в данном документе, включают гематологические злокачественные опухоли, включая злокачественные В-клетки, Т-клетки и НК-клетки. В одном варианте осуществления изобретения голые антитела или конъюгаты лекарственного средства с антителом, описанные в данном документе, связывают рецепторы на НК-клетках, вызывая цитолитическую активность и пролиферацию, что стимулирует противоопухолевую активность иммунной системы пациента. В некоторых способах лечения пациент страдает от рака, который представляет собой множественную миелому, острый миелоидный лейкоз (ОМЛ), хронический лимфоцитарный лейкоз (ХЛЛ), лейкоз Т-клеток, Т-клеточную или В-клеточную лимфому, такую как, например, неходжкинская лимфома (НХЛ), или связанные с миеломой злокачественные опухоли, такие как первичный амилоидоз, макроглобулинемия Вальденстрема или MGUS с высоким риском (моноклональная гаммапатия неопределенного значения). Лечение может быть применено к пациентам с первичными или метастатическими опухолями этих видов. Лечение может также применяться к пациентам, для которых не подходят традиционные способы лечения или которые рецидивируют после ответа на такие способы лечения.

Антитела против NTBA, описанные в данном документе, в виде голых антител или в виде конъюгатов лекарственного средства с антителом, могут быть применены для лечения аутоиммунных заболеваний и воспалительных заболеваний. Заболевания и нарушения, поддающиеся лечению с помощью настоящих способов, включают те, которые связаны с В-клетками, например, с теми заболеваниями, которые характеризуются чрезмерным количеством В-клеток, сверхактивностью В-клеток или дисфункцией В-клеток. Эти заболевания включают воспалительные заболевания и аутоиммунное заболевание. Типичные заболевания, поддающиеся лечению настоящими способами, включают ревматоидный артрит, системную красную волчанку, рассеянный склероз, воспалительное заболевание кишечника, астму, аллергию, целиакию, реакцию трансплантат против хозяина и отторжение трансплантата.

Настоящие антитела против NTB-A, как голые антитела или конъюгаты антител, могут быть применены в качестве монотерапии или комбинированной терапии, например, стандартом лечения для лечения таких заболеваний и/или расстройств. Соответственно, способы лечения рака включают введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества голого антитела или конъюгата лекарственного средства с антителом, как описано в данном документе, в качестве монотерапии или в сочетании с дополнительным противораковым средством или другим средством для облегчения симптомов рака. Способы лечения аутоиммунного заболевания включают введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества голого антитела или конъюгата лекарственного средства с антителом, как описано в данном документе, в качестве монотерапии или в сочетании с дополнительным терапевтическим средством для лечения аутоиммунного заболевания. Способы лечения воспалительного заболевания включают введение пациенту, нуждающемуся в этом, эффективного количества голого антитела или конъюгата лекарственного средства с антителом, как описано в данном документе, в качестве монотерапии или в сочетании с дополнительным терапевтическим средством для лечения воспалительного заболевания.

Типичным средством для комбинированной терапии является карфилзомиб (например, KYPROLIS®), ингибитор протеасом, используемый для лечения множественной миеломы (см. Siegel DS et al., исследование фазы 2 одноагентного карфилзомиба (PX-171-003-A1) у пациентов с рецидивирующей и рефрактерной множественной миеломой. *Blood* 2012; 120:2817-2825). Карфилзомиб можно вводить в виде внутривенной (в/в) инфузии. В одном варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Карфилзомиб также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Карфилзомиб был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, карфилзомиб был объединен с леналидомидом и дексаметазоном (см. Stewart KA et al., Carfilzomib, lenalidomide, and dexamethasone for relapsed multiple myeloma. *N Engl. J Med.* 2015; 372: 142-152). В одном варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Карфилзомиб также был объединен с дексаметазоном (см. Dimopoulos MD et al., Carfilzomib and dexamethasone versus bortezomib and dexamethasone for patients with relapsed or refractory multiple myeloma (ENDEAVOR): a randomised, phase 3, open-label, multicentre study. *Lancet Oncology* 2016; 17:27-38). В одном варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Карфилзомиб также был объединен с панобиностатом (см. Berdeja JG et al., Phase I/II study of the combination of panobinostat and carfilzomib in patients with relapsed/refractory multiple myeloma. *Haematologica* 2015; 100:670-676). В одном варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом и конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Карфилзомиб также был объединен с помалидомидом и дексаметазоном (см. Shah J et al., Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2015; 126: 2284-2290). В одном варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с помалидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с помалидомидом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления карфилзомиб вводят в комбинированной терапии с помалидомидом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным агентом для комбинированной терапии является даратумумаб (например, DAR-

ZALEX™), моноклональное антитело человека, которое связывает CD38 (гликопротеин, в больших количествах экспрессируемый на множестве клеток миеломы). Даратумумаб можно вводить пациентам путем внутривенной инфузии для лечения множественной миеломы (см. Lokhorst HM et al., Targeting CD38 with daratumumab monotherapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:1207-1219). В одном варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Даратумумаб также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом.

Даратумумаб был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, даратумумаб был объединен с бортезомибом и леналидомидом (см. Phipps C et al., Daratumumab and its potential in the treatment of multiple myeloma: overview of the preclinical and clinical development. *Ther Adv Hematol* 2015; 6: 120-127). В одном варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, леналидомидом и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, леналидомидом и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, леналидомидом и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Даратумумаб также был объединен с бортезомибом и дексаметазоном (см. Phipps C et al.,). В одном варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления даратумумаб вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является элотузумаб (например, EMLICIT™), моноклональное антитело, которое связывает CD319 или сигнальную лимфоцитарную молекулу активации F7 (SLAMF7)-клеточный маркер злокачественной множественной миеломы. Элотузумаб можно вводить пациентам путем внутривенной инфузии для лечения множественной миеломы (см. Zonder JA et al., A phase 1, multicenter, open-label, dose escalation study of elotuzumab in patients with advanced multiple myeloma. *Blood* 2012; 120: 552-559). В одном варианте осуществления элотузумаб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления элотузумаб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления элотузумаб вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Элотузумаб также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Элотузумаб был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, элотузумаб был объединен с леналидомидом и дексаметазоном (см. Lonial S et al., Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:621-631). В одном варианте осуществления элотузумаб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления элотузумаб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления элотузумаб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным агентом для комбинированной терапии является леналидомид (например, REV-LIMID®), иммуномодулирующий агент, назначаемый пациентам для лечения множественной миеломы (см. Richardson PG, A randomized phase 2 study of lenalidomide therapy for patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *Blood* 2006, 108: 3458-3464). Леналидомид можно поставлять в форме капсулы, пилюли или таблетки для перорального введения. В одном варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Леналидомид также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против

NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Леналидомид был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, леналидомид был объединен с бортезомибом и дексаметазоном (см. Richardson PG et al., Lenalidomide, bortezomib, and dexamethasone combination therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Blood* 2010; 116:679-686). В одном варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Леналидомид также был объединен с карфилзомибом и дексаметазоном (см. Stewart KA et al.). В одном варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Леналидомид также был объединен с даратумумабом и бортезомибом (см. Phipps C et al.). В одном варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, бортезомибом и конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, бортезомибом и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, бортезомибом и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Леналидомид также был объединен с элотузумабом и дексаметазоном (см. Lonial S et al., Elotuzumab therapy for relapsed or refractory multiple myeloma. *N Engl J Med* 2015; 373:621-631). В одном варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с элотузумабом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с элотузумабом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления леналидомид вводят в комбинированной терапии с элотузумабом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является бортезомиб (например, VELCADE®), ингибитор протеасом, назначаемый пациентам для лечения множественной миеломы и лимфомы мантийных клеток (см. Richardson PG et al., A phase 2 study of bortezomib in relapsed, refractory myeloma. *N Engl J Med* 2003; 348:2609-2617). Бортезомиб можно вводить пациентам путем внутривенной инъекции. В одном варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Бортезомиб также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Бортезомиб был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, бортезомиб был объединен с талидомидом и дексаметазоном (см. Kapoor P et al., Bortezomib combination therapy in multiple myeloma. *Semin Hematol* 2012; 3:228-242). В одном варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с талидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с талидомидом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с талидомидом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Бортезомиб также сочетался с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом и этопозидом (см. Kapoor P et al.). В одном варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и конъюгатом антитела против NTV-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и конъюгатом гуманизованное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном, талидомидом, цисплатином, доксорубицином, циклофосфамидом, этопозидом и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Бортезомиб также был объединен с даратумумабом и леналидомидом (см. Phipps C et al.). В одном варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, леналидомидом и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, леналидомидом и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с даратумумабом, леналидомидом и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Бортезомиб также сочетается с леналидомидом и дексаметазоном (см. Richardson PG et al., 2010). В одном варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Бортезомиб также сочетался с панобиностатом и дексаметазоном (см. Richardson P et al., PANO-RAMA 2: panobinostat in combination with bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed and bortezomib-refractory myeloma. Blood 2013: 122:2331-2337). В одном варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом, дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления бортезомиб вводят в комбинированной терапии с панобиностатом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является дексаметазон (например, DECADRON®), глюкокортикостероид, применяемый для лечения рака (включая множественную миелому, лейкоз и лимфому), воспаления, аллергии и тошноты. Дексаметазон можно вводить в виде таблетки, пилюли или капсулы для перорального введения или путем внутривенной инфузии. В одном варианте осуществления дексаметазон вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления дексаметазон вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления дексаметазон вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению. Дексаметазон также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является циклофосфамид (например, CYTOXAN®), алкилирующий агент, применяемый для лечения рака (включая, среди прочего, множественную миелому, острый миелоцитарный лейкоз, лимфому Ходжкина и неходжкинскую лимфому, рак молочной железы и рак легкого). Циклофосфамид можно вводить путем инъекции, инфузии в виде таблетки, пилюли или капсулы для перорального введения или путем инъекции в мышцу, в брюшину или в плевру. В одном варианте осуществления циклофосфамид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления циклофосфамид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления циклофосфамид вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению. Циклофосфамид также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является мелфалан - алкилирующий агент, применяемый для лечения рака (включая множественную миелому и рак яичника). Мелфалан можно вводить перорально, в виде инъекции или инфузии. В одном варианте осуществления мелфалан вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления мелфалан вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления мелфалан вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению. Мелфалан также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является помалидомид (например, POMALYST®), иммуномодулирующий агент, применяемый для лечения множественной миеломы. Помалидомид можно вводить в форме капсулы, пилюли или таблетки для перорального введения. В одном варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-

лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Помалидомид также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Помалидомид был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Помалидомид был объединен с дексаметазоном (см. Richardson P et al., Pomalidomide alone or in combination with low-dose dexamethasone in relapsed and refractory multiple myeloma: a randomized phase 2 study. *Blood* 2014; 123: 1826-1832). В одном варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Помалидомид также был объединен с карфилзомибом и дексаметазоном (см. Shah J et al., Carfilzomib, pomalidomide, and dexamethasone (CPD) in patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma. *Blood* 2015; 126: 2284-2290). В одном варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления помалидомид вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является панобиностат (например, FARYDAK®), ингибитор гистондеацетилазы (HDAC), применяемый для лечения рака (включая множественную миелому) (см. Wolf JL et al., A phase II study of oral panobinostat (LBH589) in adult patients with advanced refractory multiple myeloma. *ASH Annual Meeting Abstracts*, 2008). Панобиностат можно вводить в форме пилюли, капсулы или таблетки для перорального введения. В одном варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Панобиностат также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Панобиностат был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, панобиностат был объединен с карфилзомибом (см. Berdeja JG et al.). В одном варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с карфилзомибом и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Панобиностат также был объединен с бортезомибом и дексаметазоном (см. Richardson P et al., 2013). В одном варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления панобиностат вводят в комбинированной терапии с бортезомибом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другим типичным средством для комбинированной терапии является иксазомиб (NINLARO®), ингибитор протеасом, применяемый для лечения рака (включая множественную миелому). Иксазомиб можно вводить перорально. В одном варианте осуществления иксазомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления иксазомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления иксазомиб вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Иксазомиб также можно вводить в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению и дополнительным агентом. Иксазомиб был объединен с различными дополнительными агентами для лечения множественной миеломы. Например, иксазомиб был объединен с леналидомидом и дексаметазоном (см. Moreau P et al., Ixazomib, an investigational oral proteasome inhibitor, in combination with lenalidomide and dexamethasone, significantly extends progression-free survival for patients with relapsed and/or refractory multiple myeloma: the phase 3 tourmaline-MM1

study. ASH Annual Meeting Abstracts, 2015). В одном варианте осуществления иксазомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом антитела против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления иксазомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления иксазомиб вводят в комбинированной терапии с леналидомидом, дексаметазоном и h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Другие типичные агенты для комбинированной терапии (особенно при лечении неходжкинской лимфомы) включают антитела против CD20 (включая ритуксимаб, ибритумомаб тиуксетан, тоситумомаб, офатумумаб, велтузумаб и обинутузумаб), антитела против CD52 (в том числе алектумумаб), антитела против PD1 (включая ниволумаб, пидилизумаб и пембролизумаб), антитела против PDL1 (включая дурвалумаб и атезолизумаб), брентуксимаб ведотин, бендамустин и бортезомиб. В одном варианте осуществления антитело против CD20, антитело против CD52, антитело против PD1, антитело против PD1, брентуксимаб ведотин, бендамустин и бортезомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В одном варианте осуществления антитело против CD20, антитело против CD52, антитело против PD1, антитело против PD1, брентуксимаб ведотин, бендамустин и бортезомиб вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В одном варианте осуществления антитело против CD20, антитело против CD52, антитело против PD1, антитело против PD1, брентуксимаб ведотин, бендамустин и бортезомиб вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Кроме того, другие средства для комбинированной терапии включают химиотерапевтические схемы лечения, такие как CHOP (циклофосфамид, доксорубин, винкристин и преднизон); CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизон); RCVP (ритуксимаб+CVP); RCHOP (ритуксимаб+CHOP); RCHP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубин и преднизон); RICE (ритуксимаб+ифозамид, карбоплатин, этопозид); RDHAP, (ритуксимаб+дексаметазон, цитарабин, цисплатин); RESHAP (ритуксимаб+этопозид, метилпреднизолон, цитарабин, цисплатин); R-BENDA (ритуксимаб и бендамустин), RGDP (ритуксимаб, гемцитабин, дексаметазон, цисплатин). В одном варианте осуществления один из CHOP, CVP, RCVP, RCHOP, RCHP, RICE, RDHAP, RESHAP, R-BENDA и RGDP вводят в комбинированной терапии с конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления один из CHOP, CVP, RCVP, RCHOP, RCHP, RICE, RDHAP, RESHAP, R-BENDA и RGDP вводят в комбинированной терапии с конъюгатом гуманизированное антитело против 20F3-лекарственное средство по данному изобретению. В другом варианте осуществления один из CHOP, CVP, RCVP, RCHOP, RCHP, RICE, RDHAP, RESHAP, R-BENDA и RGDP вводят в комбинированной терапии с h20F3ec-1910(2) по данному изобретению.

Антитела против NTB-A в виде голых антител или в виде конъюгатов лекарственного средства с антителом вводят в эффективном режиме, что означает дозировку, способ введения и частоту введения, которая задерживает начало, уменьшает тяжесть, ингибирует дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один признак или симптом рака. В некоторых случаях терапевтическая эффективность может наблюдаться у отдельного пациента по сравнению с историческим контролем или прошлым опытом у одного и того же пациента. В других случаях терапевтическая эффективность может быть продемонстрирована в доклинических или клинических испытаниях у популяции пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольной популяцией нелеченых пациентов.

Типичные дозы для голого антитела против NTB-A представляют собой от 0,1 до 50 мг/кг массы тела пациента, более типично от 1 до 30 мг/кг, от 1 до 20 мг/кг, от 1 до 15 мг/кг, от 1 до 12 мг/кг, или от 1 до 10 мг/кг, или от 2 до 30 мг/кг, от 2 до 20 мг/кг, от 2 до 15 мг/кг, от 2 до 12 мг/кг, или от 2 до 10 мг/кг, или от 3 до 30 мг/кг, от 3 до 20 мг/кг, от 3 до 15 мг/кг, от 3 до 12 мг/кг или от 3 до 10 мг/кг.

Типичные дозы для конъюгатов антитело против NTB-A-лекарственное средство представляют собой от 1,0 мкг/кг до около 10 мг/кг, от 1,0 мкг/кг до около 5 мг/кг, от 1,0 мкг/кг до около 5 мг/кг, от около 1,0 мкг/кг до около 1,0 мг/кг, от около 10 мкг/кг до около 3 мг/кг, от около 10 мкг/кг до около 2 мг/кг, от около 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг или от около 1,0 мкг/кг до 500,0 мкг/кг, или от около 0 мкг/кг до 80,0, 100,0, или 200,0 мкг/кг.

Типичные дозы для конъюгатов PBD направленных на NTB-A, как правило, составляют примерно от 1,0 до 1,0 мг/кг или от около 1,0 до 500,0 мкг/кг, или от около 0 до 80,0, 100,0 или 200,0 мкг/кг, хотя предусматриваются альтернативные дозы.

Введение обычно осуществляют парентерально. Введение также можно локализовать непосредственно в опухоль. Предпочтительным является введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение можно осуществлять, например, путем инфузии в течение периода, такого как 30-90 мин или путем одной болюсной инъекции.

Частота введения зависит от периода полувыведения антитела или конъюгата в кровообращении, состояния пациента и пути введения среди других факторов. Частота может являться ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения со-

стояния пациента или прогрессирования лечения рака. Типичная частота внутривенного введения составляет два раза в неделю и ежеквартально в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно большая или меньшая частота дозирования. Другие типичные частоты для внутривенного введения составляют от между еженедельного до трех раз каждые четыре недели в течение непрерывного курса лечения, хотя возможно более или менее частые дозирование. Для подкожного введения типичная частота дозирования является от ежедневной до ежемесячной, хотя возможно более или менее частое дозирование.

Количество вводимых доз зависит, в частности, от характера расстройства (например, присутствуют ли острые или хронические симптомы) и ответа расстройства на лечение. Для острых расстройств или острых обострений хронического расстройства часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда единичная болюсная доза, необязательно в виде разделенной формы, достаточна для острого расстройства или острого обострения хронического расстройства. Лечение может повторяться для повторения острого расстройства или острого обострения. Для хронических расстройств антитело можно вводить через регулярные интервалы, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или в течение жизни пациента.

Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и, по существу, изотоническими и производятся в условиях GMP (правила организации производства и контроля качества лекарственных средств). Фармацевтические композиции могут быть представлены в стандартной дозированной форме (то есть дозе для единичного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций антитела могут быть смешаны в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (чтобы уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно, конъюгаты лекарственного средства с антителом могут быть в лиофилизированной форме для разведения с пригодным носителем, например, апиrogenной стерильной воды, перед применением. Концентрация антитела в жидкой композиции может составлять, например, 1-100 мг/мл, такая как 10 мг/мл.

Лечение голыми антителами или конъюгатами лекарственного средства с антителом, описанными в данном документе, можно комбинировать с химиотерапией, лучевой терапией, обработкой стволовыми клетками, другими способами лечения, эффективными против расстройства, которое лечится. Пригодные классы других агентов, которые можно вводить с антителом против NTB-A или конъюгатом лекарственного средства с антителом, включают, например, антитела к другим рецепторам, экспрессируемым на раковых клетках, анти tubулиновым агентам (например, ауристатинам), агентам, связывающимися с малой бороздкой ДНК, ингибиторам репликации ДНК, алкилирующим агентам (например, комплексам платины, таким как ds-платин, моно(платина), бис(платина)) и трехъядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антимаетаболиты, сенсibilизаторы химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, производные нитрозомочевины, платиноны, предварительно образующиеся соединения, пуриновые антимаетаболиты, пурамицины, сенсibilизаторы излучения, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и тому подобное.

Лечение голыми антителами или конъюгатом антитело против NTB-A-лекарственное средство, обязательно в сочетании с любым из других агентов или режимов, описанных выше, отдельно или в качестве конъюгата антитело против NTB-A-лекарственное средство, может увеличить медианную выживаемость без прогрессирования или общее время выживания пациентов, имеющих рак, экспрессирующий NTB-A (например, множественная миелома, ОМЛ, НХЛ (неходжскинская лимфома)), особенно когда является рецидивирующей или устойчивой по меньшей мере на 30 или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60 до 70% или даже на 100% или более, по сравнению с тем же самым лечением (например, химиотерапией), но без антитела против NTB-A в отдельности или в виде конъюгата. Кроме того, или, альтернативно, лечение (например, стандартная химиотерапия), включая конъюгат против NTB-A, может увеличить коэффициент с полным ответом, коэффициент с частичным ответом или коэффициент с объективным ответом (полный+частичный) пациентов, имеющих NTB-A-экспрессирующий рак по меньшей мере на 30 или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% по сравнению с тем же самым лечением (например, химиотерапией), но без антитела против NTB-A.

Как правило, в клиническом исследовании (например, испытаниях на фазе II, на фазе II-III или на фазе III) вышеупомянутое увеличивает медианную выживаемость без прогрессирования и/или коэффициент ответа пациентов, получавших стандартную терапию, плюс анти-NTB-A антитела по сравнению с контрольной группой пациентов, получающих стандартную терапию самостоятельно (или плюс плацебо), являются статистически значимыми, например, на уровне $p=0,05$ или $0,01$ или даже $0,001$. Полные и частичные коэффициенты ответа определяются объективными критериями, обычно используемыми в клинических испытаниях для лечения рака, например, перечисленными или принятыми Национальным

институтом рака и/или Управлением по контролю за продуктами и лекарствами.

В других применениях антитела против NTB-A, раскрытые в данном документе, могут быть применены для обнаружения NTB-A в контексте клинического диагноза или лечения, или в исследованиях. Экспрессия NTB-A в раке свидетельствует о том, что рак поддается лечению антителами по данному изобретению. Антитела также могут быть проданы в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований при обнаружении клеток, несущих NTB-A, и их реакции на различные раздражители. В таких применениях антитело против NTB-A может быть помечено флуоресцентной молекулой, спин-меченной молекулой, ферментом или радиоизотопом и может быть предоставлено в виде набора со всеми необходимыми реагентами для проведения анализа для NTB-A. Антитела также могут быть использованы для очистки NTB-A, например, с помощью аффинной хроматографии.

Все патентные заявки, другие публикации, номера доступа и тому подобное, упомянутые выше или ниже, включены в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный пункт был конкретно и индивидуально указан, чтобы быть включенным посредством ссылки. Если разные версии последовательности связаны с номером доступа в разное время, подразумевается версия, связанная с номером доступа, в эффективную дату подачи данной заявки. Эффективная дата подачи означает более раннюю дату фактической подачи или дату подачи приоритетной заявки, относящейся к номеру доступа, если это применимо. Аналогичным образом, если разные версии публикации публикуются в разное время, версия, которая была недавно опубликована в эффективную дату подачи заявки, подразумевается, если не указано иное. Любая функция, шаг, элемент, вариант осуществления или аспект изобретения могут использоваться в сочетании с любым другим, если специально не указано иное. Хотя данное изобретение было описано более подробно с помощью иллюстрации и примера для ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения.

Примеры

Линии клеток, описанные в следующих примерах, поддерживали в культуре в соответствии с условиями, установленными Американской коллекцией типовых культур (ATCC) или Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Брауншвейг, Германия (DMSZ) или, как еще известно.

Пример 1. Выбор антитела

Лимфоциты, собранные из селезенки и лимфатических узлов мышей, продуцирующих антитела NTB-A, сливали с клетками миеломы. Слитые клетки восстанавливали в течение ночи в среде для роста гибридомы. После восстановления клетки центрифугировали и затем помещали на полутвердые среды. Гибридомы инкубировали и собирали гибридомные клоны IgG. Антитело против 20F3 было одним из немногих антител, которые демонстрировали сильную цитотоксичность в качестве ADC и связывалось с NTB-A яванского макака.

Пример 2. Конструирование гуманизованных антител

Гуманизованные антитела были получены из антитела 20F3 мыши. Пять гуманизованных тяжелых цепей (HA-HE) и четыре гуманизованных легких цепи (LA-LD) были созданы с включением обратных мутаций в разных положениях. В некоторых случаях обратные мутации будут соответствовать зародышевой линии мыши, но в других случаях этого не будет (как в случае соматических мутаций). Гуманизованные тяжелые и легкие цепи были спарены. См. фиг. 1 и 2 для выравнивания последовательностей и табл. 1-4.

Таблица 1. Гуманизирующие мутации в вариантах тяжелой цепи 20F3

Вариант V _H	Акцепторная последовательность экзона V _H	Донорные каркасные остатки
hV _H A	VH7-4-1	Отсутствуют
hV _H B	VH7-4-1	H2 и H73
hV _H C	VH7-4-1	H2, H44, H73и H76
hV _H D	VH7-4-1	H2, H44, H46, H73, H76
hV _H E	VH7-4-1	H2, H38, H44, H46, H68, H73, H76 и H91

Таблица 2. Гуманизирующие мутации в вариантах легкой цепи 20F3

Вариант V _L	Акцепторная последовательность экзона V _L	Донорные каркасные остатки
hV _L A	VK3-11	Отсутствуют
hV _L B	VK3-11	L46, L47, L71
hV _L C	VK3-11	L1, L5, L46, L47, L71
hV _L D	VK3-11	L1, L21, L5, L46, L47, L58, L71

Таблица 3. Специфические мутации в вариантах тяжелой цепи 20F3

Вариант	H2	H38	H44	H46	H68	H73	H76	H91
HA	V	R	G	E	V	T	S	Y
HB	I*	R	G	E	V	K*	S	Y
HC	I*	R	D*	E	V	K*	N*	Y
HD	I*	R	D*	K*	V	K*	N*	Y
HE	I*	K*	D*	K*	A*	K*	N*	F*

*Остатки мыши

*Остатки мыши

Таблица 4. Специфические мутации в вариантах легкой цепи 20F3

Вариант	L1	L5	L21	L46	L47	L58	L71
LA	E	T	L	L	L	I	F
LB	E	T	L	P*	W*	I	Y*
LC	Q*	S*	L	P*	W*	I	Y*
LD	Q*	S*	M*	P*	W*	V*	Y*

*Остатки мыши

Пример 3. Измерения EC50 и Kd

Для определения EC50 трехточечные титрования дозы немеченых гуманизированных антител против NTB-A человека смешивали с постоянной концентрацией (5 нМ окончательная) антитела 20F3 мыши, конъюгированного с Alexa Fluor 647. Антигенные положительные клетки Ramos высевали по 1×10^5 клеток на лунку в 96-луночном планшете с V-образным дном (Thermo Scientific, Рочестер, штат Нью-Йорк). Пятидесятикратные серийные разведения антител были приготовлены в буфере FACs (PBS+2% фетальной бычьей сыворотки) и были добавлены к клеткам в двух параллельных испытаниях. Растворы антител инкубировали с клетками в течение 1 ч на льду, без доступа света. Клетки дважды промывали буфером FACs и анализировали на проточном цитометре LSR II (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Значения EC50 определялись с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (Ла-Хойя, штат Калифорния). Результаты представлены ниже в табл.5.

Таблица 5. Определение связывания EC50 для различных перестановок гуманизированных тяжелых и легких цепей гуманизированного 20F3 по сравнению с 20F3 мыши

	EC50 (нМ)				
	HA	HB	HC	HD	HE
LA	147	71	25	15	31
LB	12	6	5	3	4
LC	27	12	8	6	10
LD	12	4	5	3	2

EC50 для 20F3 мыши составляет 2 нМ.

Для создания кривых насыщения связывания использовали титрование доз антител против NTB-A человека, конъюгированных с Alexa Fluor 647 (h20F3_HDL-D-AF647). Антигенные положительные клетки Ramos высевали по 1×10^5 клеток на лунку в 96-луночном планшете с V-образным дном (Thermo Scientific, Рочестер, штат Нью-Йорк). Трехкратные серийные разведения антител в концентрации 2X были приготовлены в буфере FACs (PBS+2% фетальной бычьей сыворотки) и были добавлены к клеткам в двух параллельных испытаниях. Растворы антител инкубировали с клетками в течение 1 ч на льду, без доступа света. Клетки дважды промывали буфером FACs и анализировали на проточном цитометре LSR II (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Значения KD определялись с помощью программного обеспечения GraphPad Prism (Ла-Хойя, штат Калифорния). Античеловеческие антитела NTB-A h20F3_HDL-D и химерные 20F3 тестировали на связывание с клетками 293-F17, сверхэкспрессирующими NTB-A. 293-F17 яванского макака/NTB-A яванского макака. Клетки высевали по 5×10^5 клеток/лунку в буфере FACs (PBS+2% фетальной бычьей сыворотки+0,02% азида) и инкубировали с 20 мкг/мл антитела в течение 30 мин на льду. Клетки промывали дважды и окрашивали 30 мкг/мл козьим античеловеческим IgG-PE (Jackson ImmunoResearch, Вест-Гроув, штат Пенсильвания) в течение 30 мин на льду и защищали от света. Клетки снова дважды промывали буфером FACs. Окрашенные клетки анализировали на проточном цитометре Calibur FACs (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). Результаты представлены ниже в табл. 6.

Таблица 6. Связывание насыщения для гуманизированного 20F3 варианта антитела HDLD по сравнению с химерным 20F3

Антитело	Ramos	Связывание (яванский макак)
	Kd (нМ)	
Химерное	1,68	Положительное
HDLD	2,2	Положительное

Пример 4. Эффекторная функция

Комплементзависимая цитотоксичность (CDC): Нормальные Т-клетки человека (All Cells, Аламеда, штат Калифорния) или раковые линии клеток (ATCC, Манассас, штат Вирджиния) были помечены 5 мкМ Sytox Green (Life Technologies, Гранд-Айленд, штат Нью-Йорк), а затем были связаны с серийными последовательностями титрования антитела h20F3 против NTB-A человека или PBD-димера ADC (0,02-50 мкг/мл) в среде RPMI1640+1020% сыворотки человека (Complement Technology, Tyler, TX или Solomon Park Research Laboratories, Киркленд, штат Вашингтон). Клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 2 ч, а флуоресценцию от лизированных клеток измеряли с помощью считывателя планшета Envision (Perkin Elmer, Волтем, штат Массачусетс). Данные выражали в процентах от максимального лизиса клеток, определяемого положительным контролем 1% клеток, обработанных Triton X-100 (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури).

Для анализа использовались три типа клеток: нормальные Т-клетки человека, клетки WIL2-S и клетки Raji. Экспрессия соответствующих рецепторов по каждому типу клеток представлена в табл. 7 и указана как количество рецепторов на клетку.

Таблица 7. Экспрессия рецепторов

Тип клеток	NTB-A	CD52	CD20
Т-клетки	6900	115200	0
WIL2S	19900	34200	502700
Raji	39900	29200	394100

Как можно видеть из табл.8 ниже, гуманизированное антитело IgG1 20F3-HDLLDwt и вариант EC (антитела с цистеином в положении 239 несущим обозначение EC) не имеют CDC-активности против нормальных покоящихся Т-лимфоцитов и линий клеток WIL2-S и Raji. Аналогичные результаты наблюдались для ADC h20F3ec-1910(2).

Таблица 8. CDC-активность для гуманизированных антител 20F3 и ADC по сравнению с Кампат и Ритуксимаб

Тип клеток	Максимальный % специфического лизиса клеток				
	h20F3wt	h20F3ec	h20F3ec-1910(2)	Кампат (CD52)	Ритуксим аб (CD20)
Нормальные Т-клетки человека	1,3±2,8	2,2±1,8	2,1±3,0	108±5,2	Не тестировали
Линия клеток WIL2-S	0,0±0,0	0,14±0,2	0,3±0,0	Не тестировали	66±1,4
Линия клеток Raji	2,1 ±0,6	3,3±0,7	0,0±0,0	Не тестировали	45±5,7

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)

Анализ активности: АЗКЦ цитотоксическую активность измеряли при помощи высвобождением хрома-51, в котором эффекторные клетки естественного киллера (НК) убивали (лизировали) клетки-мишени посредством связывания с антителом или ADC на клетках-мишенях. Клетки WIL2-S метили хромом-51, связывали с антителом (0,1 нг/мл - 10 мкг/мл) и затем инкубировали с НК-клетками при отношении эффекторная клетка: целевая клетка, равному 10:1 в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂. Супернатант удаляли на фильтровальную пластину, а количество хрома-51 измеряли с помощью TopCount (Perkin Elmer, Волтем, штат Массачусетс). Данные выражали в процентах от максимального специфического лизиса клеток, определяемого положительным контролем 1% клеток, обработанных Triton X-100 (Sigma, Сент-Луис, штат Миссури).

Тест на проточную цитометрию использовали для измерения активности АЗКЦ на нормальных Т-клетках человека. РKN2-меченные нормальные Т-клеточные мишени человека связывали с титрами антител (0,1 нг/мл - 10 мкг/мл), а затем инкубировали с эффекторными НК-клетками при отношении эф-

факторная клетка: целевая клетка, равному 10:1 в течение 4 ч при 37°C, 5% CO₂. Жизнеспособность определяли с помощью включения 7-AAD, измеренного на проточном цитометре FACsCalibur (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния).

Как можно видеть из табл. 9 ниже, гуманизированное антитело 20F3-HDLDwt и вариант ес имеют активность ADCC от низкой до умеренной. PBD димер ADC h20F3ec-1910 (2) демонстрировал снижение АЗКЦ активности относительно неконъюгированного антитела h20F3ec. Номера рецепторов раскрыты в табл. 7.

Таблица 9. Активность АЗКЦ для гуманизированного 20F3 по сравнению с Кампат и Ритуксимаб

Тип клеток	Максимальный % специфического лизиса клеток				
	h20F3wt	h20F3ec	h20F3ec-1910 (2)	Кампат (CD52)	Ритуксимаб (CD20)
Нормальные Т-клетки человека	38±0,8	40±0,6	19±1,0	60±3,5	Не тестировали
Линия клеток WIL2-S	21±0,6	25±2,4	16±3,3	Не тестировали	42±6,0

Для оценки активности АЗКФ, опосредованного NTB-A, нормальные Т-лимфоциты или опухолевые клетки были помечены красным флуоресцентным мембранным красителем - PKH26, затем помечены антителом или ADC в 5-точечной 10-кратной серии разведения, начинающейся с 2 мкг/мл. Затем клетки инкубировали в течение 30 мин на льду и дважды промывали PBS. Клетки смешивали с макрофагами, полученными из моноцитов, в течение одного часа при 37°C. Затем смесь клеток окрашивали путем конъюгирования с Alexa Fluor 488 конъюгированным с анти-CD11b мыши для мечения макрофагов, и анализировали с помощью проточной цитометрии для обнаружения PKH26+CD11b+ меченых двумя изотопами флуоресцентных клеток. Фагоцитарную активность рассчитывали, как частное от деления (процент PKH26+CD11b+) на (процент CD11b+клетки), умноженное на сто.

Как можно видеть из табл. 10 ниже, гуманизированное антитело 20F3-HDLDwt и вариант ес имеют АЗКФ активность умеренно ниже, чем контроль в виде антител ритуксимаб и кампат на линиях раковых клеток. Аналогичные результаты наблюдались для ADC h20F3ec-1910(2).

Таблица 10. Активность АЗКФ для гуманизированного 20F3 по сравнению с Кампат и Ритуксимаб

Тип клеток	Максимальный % специфического лизиса клеток				
	h20F3wt IgG1	h20F3ec	h20F3ec-1910 (2)	Кампат (CD52)	Ритуксимаб (CD20)
Нормальные Т-клетки человека	42	33	37	57	Не тестировали
Линия клеток WIL2-S	45	45	45	Не тестировали	56
Линия клеток Raji	48	44	45	Не тестировали	57

Пример 5. Интернализация ADC

Клеточные линии множественной миеломы (MM.1R или U-266) связывали с насыщающими концентрациями ADC (10 мкг/мл), промывали средой, и инкубировали при 37 или 4°C. Были отмечены точки времени, на которых образцы окрашивали меченым козьим античеловеческим IgG-PE антителом (Jackson ImmunoResearch, Вест Гроув, штат Пенсильвания) и фиксировали в 1% PFA/PBS. После того, как были отмечены все временные точки, средняя интенсивность флуоресценции была измерена на проточном цитометре Fibs Calibur (BD Biosciences, Сан-Хосе, штат Калифорния). PBD димер ADC против NTB-A h20F3ec-1910 (2) быстро интернализировался в клетки MM.1R, причем 80% ADC интернализировалось в течение 4 ч при инкубации при 37°C. Только 20% ADC h20F3ec-1910(2) интернализировалось через 4 ч, если клетки поддерживали при температуре 4°C.

Поверхность клеток и внутриклеточная локализация ADC в клетках MM.1R также были обнаружены с помощью мышиного анти-идиотипического антитела, специфичного к антителу h20F3ec. АЦП позволяли связывать MM.1R клетки в течение 30 мин при 4°C и было обнаружено, что ADC быстро интернализуются в лизосомы.

Пример 6. Цитотоксичность ADC на линиях раковых клеток ММ

Гуманизированные антитела (HDL) тестировали как конъюгаты PBD и ауристин лекарственного средства с антителом. Антимитотический агент монометил ауристин Е (ММАЕ) конъюгировали с mAb против NTB-A через расщепляемый катепсин валин-цитруллин (vc)-линкер. Второй ауристин - Ауристин-2 конъюгировали с mAb против NTB-A через пептидный линкер. Для конъюгатов PBD лекарственный линкер SGD-1910 конъюгировали с антителом против NTB-A через тиольную группу остатка цистеина, введенного в положение 239 цепи антитела IgG1 (нумерация в соответствии с системой нумерации EU), а средняя лекарственная нагрузка составляла около 2 молекул лекарственного средства на антитело. Антитела с цистеином в положении 239 несут обозначение ec. Приготовление было таким, как описано в WO 2011/130613, с использованием антител против NTB-A, описанных в данном документе. ADC серийно разбавляли в 3 раза в средах для получения 10-точечной кривой дозы (1000 нг/мл - 0,05081 нг/мл) и наносили на несколько клеток миеломы, культивируемых в 96-луночных планшетах для анализа. Линии клеток обрабатывали ADC против NTB в четырех параллельных испытаниях и инкубировали в течение 96 ч при 37°C, 5% CO₂. Клетки анализировали на жизнеспособность с использованием анализа клеточного титрования Glo люминесцентной цитотоксичности (Promega) и данных, собранных с использованием планшетного ридера Envision (Perkin Elmer). Кривые зависимости доза-эффект и значения IC₅₀ были рассчитаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты представлены в табл.11 и 12.

Был также проанализирован механизм действия на клетки MM.1R. Клетки MM.1R обрабатывали ADC, а активацию ATR и ATM-киназ количественно определяли путем вестерн-блоттинга с антителами, специфичными к фосфоэпиту. Активированные ADC уровни ATM/ATR почти эквивалентны препарату свободного димера PBD, таким образом ADC активирует ответ повреждения ДНК в клетках MM.

Таблица 11. Значения IC₅₀ различных конъюгатов гуманизированное антитело против 20F3: лекарственное средство в линиях клеток множественной миеломы (значения IC₅₀ в нг/мл, hIgG-несвязывающее отрицательное контрольное антитело)

Антитело	Линкер лекарственное средство	Нагрузка лекарственного средства	Линии клеток множественной миеломы (кол-во рецептора NTB-A/клетка)				
			EJM (9800)	MM.1R (21000)	MM.1S (14800)	U2-66 (18300)	LP-1 (0)
h20F3	vcMMAE	4	162	696	>1000	22	>1000
h20F3	Auristatin-2	8	22	6	7	4	>1000
h20F3ec	димер PBD	2	>1000	1	1	8	>1000
hIgG	vcMMAE	4	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	Auristatin-2	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	димер PBD	2	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Таблица 12. Значения IC₅₀ различных конъюгатов гуманизированное антитело против 20F3: лекарственное средство в линиях клеток НХЛ и ОМЛ (значения IC₅₀ в нг/мл, hIgG-несвязывающее отрицательное контрольное антитело)

Антитело	Линкер лекарственное средство	Нагрузка лекарственного средства	Линии клеток НХЛ и ОМЛ (кол-во рецептора NTB-A/клетка)			
			Ramos (24500)	CA46 (15000)	HEL92.1. 7 (10200)	HNT-34 (57300)
h20F3	vcMMAE	4	11	44	>1000	19
h20F3	Auristatin-2	8	2	3	455	2
h20F3ec	димер PBD	2	0,8	0,9	2	0,5
hIgG	vcMMAE	4	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgG	Auristatin-2	8	>1000	>1000	>1000	>1000
hIgGec	димер PBD	2	>1000	>1000	>1000	>1000

Пример 7. Цитотоксичность ADC на лимфоцитах человека

Для оценки цитотоксических эффектов ADC против NTB-A на покоящиеся человеческих Т и В-лимфоцитов очищенные клетки высевали в черные 96-луночные планшеты для анализа. Затем клетки обрабатывали ADC против NTB-A, начиная с 10 мкг/мл, титровали в 5 раз, в общей сложности на 8 точках разведения. Для лечения свободными лекарственными средствами клетки дозировали либо с MMAE, начиная с 1000 нМ, либо со свободным димером PBD, начиная с 100 нМ, титровали в 5 раз, в общей сложности на 8 точках разведения. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 96 ч, затем оставляли для уравновешивания до комнатной температуры. В каждую лунку добавляли равный объем

реагента Cell-Titer Glo, и планшет инкубировали еще 30 минут при комнатной температуре. Затем планшеты считывали на ридере планшетов Perkin Elmer Envision. Кривые зависимости доза-эффект и значения IC50 были рассчитаны с использованием программного обеспечения GraphPad Prism. Результаты представлены в табл. 13.

Таблица 13. Значения IC50 химерного антитела 20F3 и свободного лекарственного средства для покоящихся Т и В лимфоцитов человека

Донор	Тип клетки	NTB-A (кол-во рецепторов)	c20F3-1910 (2) (нг/мл)	c20F3-vcMMAE (4) (нг/мл)	Свободные MMAE (нМ)	Свободный димер PBD (нМ)
1	В-клетка	6811	1468	>1000	3	1
2	В-клетка	11037	1270	>1000	2	1
3	В-клетка	8771	3421	>1000	5	3
4	Т-клетка	5547	>1000	>1000	>1000	28
5	Т-клетка	7979	>1000	>1000	>1000	25
6	Т-клетка	5522	>1000	>1000	>1000	27

На покоящиеся Т-лимфоциты человека не влияли димеры PBD или аристин-химерные ADC 20F3 в 96-часовом цитотоксическом анализе. Свободный димер PBD был цитотоксичным для покоящихся Т-лимфоцитов, указывая на то, что они чувствительны к этому препарату, повреждающему ДНК. Поэтому уровни клеточной поверхности NTB-A слишком малы для ADC C20F3-1910 (2) для интернализации достаточного количества PBD-лекарственного средства для уничтожения покоящихся Т-лимфоцитов. Напротив, ни свободное лекарственное средство MMAE, ни ADC C20F3-vcMMAE (4) не были эффективны в отношении покоящихся Т-лимфоцитов. Остальные В-лимфоциты человека были чувствительны как к свободному лекарственному среднему MMAE, так и к PBD-димеру. Однако ADC C20F3-1910 (2) оказывает цитотоксическое действие на покоящиеся В-лимфоциты только при высоких концентрациях ADC (> 1000 нг/мл), в то время как ADC C20F3-vcMMAE (4) не оказывает цитотоксического эффекта. Поэтому уровни клеточной поверхности NTB-A слишком малы на В-лимфоцитах, чтобы опосредовать мощный цитотоксический эффект с помощью димера PBD или аристин-химерного ADC C20F3.

Пример 8. Исследования In vivo ксенотрансплантата MM

NSG (NOD ТКИД гамма; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) мышам имплантировали 1 миллион клеток MM.1R, на одно животное внутривенно, чтобы генерировать рассеянную модель множественной миеломы. Через пять суток после имплантации опухолевых клеток, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутрибрюшинную инъекцию PBD ADC h2F3ec-1910 (2) или несвязывающего контрольного PBD ADC hIgGec-1910 (2). Уровни доз PBD ADC составляли 333, 111 и 37 мкг/кг. Мышей с повышенной опухолевой нагрузкой умерщвляли при проявлении симптомов паралича задних конечностей, краниальной опухоли и/или состояния агонии. Как показано на фиг. 3, PBD димер ADC HDLD h20F3ec-1910 (2) вызывал долговременные полные ответы у 10/10 мышей при всех дозах (единичная доза), в то время как контрольные мыши, несущие дозу PBD ADC без связывания, все умерщвлялись из-за болезни на 80-е сутки исследования. Статистически значимое различие между группами (P < 0,0001 Тест Мантела-Кокса) ADC h20F3ec-1910(2) (37 мкг/кг) против контрольного ADC hIgGec-1910(2) (333 мкг/кг) было достигнуто.

NSG (NOD ТКИД гамма; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) мышам имплантировали 5 млн клеток U-266, на одно животное внутривенно, чтобы генерировать рассеянную модель множественной миеломы. Через пять суток после имплантации опухолевых клеток, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутрибрюшинную инъекцию PBD ADC h2F3ec-1910 (2) или несвязывающего контрольного PBD ADC hIgGec-1910 (2). Уровни доз PBD ADC составляли 111, 56 и 28 мкг/кг. Мышей с повышенной опухолевой нагрузкой умерщвляли при проявлении симптомов паралича задних конечностей, краниальной опухоли и/или состояния агонии. Как показано на фиг. 4, PBD димер ADC HDLD h20F3ec-1910 (2) вызывал долговременные полные ответы у 9/10 мышей при дозе 111 мкг/кг (единичная доза). При более низких дозах (28 и 56 мкг/кг) h20F3ec-1910 (2) наблюдалась значительная (P<0,0001 мин. тест Мантела-Кокса) задержка начала заболевания против контрольного PBD ADC hIgGec-1910 (2) (111 мкг/кг).

NSG (NOD ТКИД гамма; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) мышам имплантировали 10 миллион клеток EJM, на одно животное внутривенно, чтобы генерировать рассеянную модель множественной миеломы. Через пять суток после имплантации опухолевых клеток, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутрибрюшинную инъекцию PBD ADC h2F3ec-1910 (2) или несвязывающего контрольного PBD ADC hIgGec-1910 (2). Уровни доз PBD ADC составляли 333, 111 и 37 мкг/кг. Мышей с повышенной опухолевой нагрузкой умерщвляли при проявлении симптомов паралича задних конечностей, краниальной опухоли и/или состояния агонии. Как показано на фиг. 5, PBD димер ADC HDLD h20F3ec-1910 (2) вызывал долговременные полные ответы у 8/10 мышей при дозе 333 мкг/кг (единичная доза). При более низких дозах (37 и 111 мкг/кг) h20F3ec-1910 (2) наблюдалась значительная (P<0,0001 мин. тест Мантела-Кокса) задержка начала заболевания против контрольного PBD ADC hIgGec-1910 (2) (333 мкг/кг).

ТКИД (С.В-н/Sz-Prkdc^{scid}) мышам было имплантировано 5 млн клеток острого миелоидного лейкоза HNT-34 на животное подкожно. Когда средний объем опухоли достиг 100 мм³, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию PBD ADC h2F3ec-1910 (2) или несвязывающего контрольного PBD ADC hlgGec-1910 (2). Уровни доз PBD ADC составляли 333, 111 и 37 мкг/кг. Отдельные мыши умерщвляли, когда подкожный объем опухоли HNT-34 достигал 1000 мм³. Как показано на фиг. 6, PBD димер ADC HDLD h20F3ec-1910 (2) вызывал долговременные полные ответы у всех мышей при дозах 333 и 111 мкг/кг. При более низкой дозе 37 мкг/кг h20F3ec-1910 (2) вызывали сильную задержку образования опухоли и 2/10 длительные полные ответы. Контрольный PBD ADC hlgGec-1910 (2) произвел 0/10 полных ответов при 333 мкг/кг.

NSG (NOD ТКИД гамма; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) мышам имплантировали 1 млн клеток MM.1R, на одно животное внутривенно, чтобы генерировать рассеянную модель множественной миеломы. Через пять суток после имплантации опухолевых клеток, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию ADC h20F3-Auristatin2(8) или несвязывающего контрольного ADC hlgG-Auristatin2(8). Уровни доз Auristatin2 ADC составляли 3,0 и 1,0 мг/кг. Мышей с повышенной опухолевой нагрузкой умерщвляли при проявлении симптомов паралича задних конечностей, краниальной опухоли и/или состояния агонии. Как показано на фиг. 7, HDLD ADC h20F3-Auristatin2(8) вызвал значительную задержку образования опухоли (P<0,0001 Тест Мантела-Кокса) при дозах, равных 3,0 и 1,0 мг/кг, против контрольного ADC hlgG-Auristatin2(8) (3,0 мг/кг) в рассеянной модели MM.1R.

NSG (NOD ТКИД гамма; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) мышам имплантировали 5 млн клеток U-266, на одно животное внутривенно, чтобы генерировать рассеянную модель множественной миеломы. Через пять суток после имплантации опухолевых клеток, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию или ADC против NTB-A h20F3-vcMMAE(4), ADC h20F3-Auristatin2(8) или несвязывающего контрольного ADC hlgG-vcMMAE(4) и hlgG-Auristatin2(8). Уровни доз ADC составляли 3,0 и 1,0 мг/кг. Мышей с повышенной опухолевой нагрузкой умерщвляли при проявлении симптомов паралича задних конечностей, краниальной опухоли и/или состояния агонии. Как показано на фиг. 8 ADC h20F3-vcMMAE(4) вызывал долговременные полные ответы у 8/10 мышей при дозе 3,0 мкг/кг. ADC h20F3-Auristatin2(8) вызывал 10/10 продолжительных полных ответов при дозах 1,0 и 3,0 мг/кг. ADC NTB-A Auristatin2 имел большую противоопухолевую активность, чем ADC VCMAE (4), особенно при дозе 1,0 мг/кг.

NSG (NOD ТКИД гамма; NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) мышам имплантировали 10 миллион клеток EJM, на одно животное внутривенно, чтобы генерировать рассеянную модель множественной миеломы. Через пять суток после имплантации опухолевых клеток, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию или ADC против NTB-A h20F3-vcMMAE(4), ADC h20F3-Auristatin2(8) или несвязывающего контрольного ADC hlgG-vcMMAE(4) и hlgG-Auristatin2(8). Уровни доз ADC составляли 3,0 и 1,0 мг/кг. Мышей с повышенной опухолевой нагрузкой умерщвляли при проявлении симптомов паралича задних конечностей, краниальной опухоли и/или состояния агонии. Как показано на фиг. 9, HDLD ADC h20F3-vcMMAE(4) вызвал значительную (P=0,0002 тест Мантела-Кокса) задержку образования опухоли по сравнению с контрольным ADC hlgG-vcMMAE (4) при дозе 3,0 мг/кг. ADC h20F3-Auristatin2(8) вызывал 2/10 продолжительных полных ответов при дозах 1,0 мг/кг и 3,0 мг/кг, соответственно. ADC NTB-A Auristatin2 имели значительно большую противоопухолевую активность, чем ADC vcMMAE(4) при дозах 1,0 мг/кг (P=0,0002 тест Мантела-Кокса) и 3,0 мг/кг (P<0,0001 тест Мантела-Кокса).

ТКИД (С.В-н/Sz-Prkdc^{scid}) мышам было имплантировано 5 миллионов клеток острого миелоидного лейкоза HNT-34 на животное подкожно. Когда средний объем опухоли достиг 100 мм³, n=10 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию или ADC против NTB-A h20F3-vcMMAE(4), ADC h20F3-Auristatin2(8) или несвязывающего контрольного ADC hlgG-vcMMAE(4) и hlgG-Auristatin2(8). Уровни доз ADC составляли 3,0 и 1,0 мг/кг. Отдельных мышей умерщвляли, когда подкожный объем опухоли HNT-34 достигал 1000 мм³. Как показано на фиг. 10, как HDLD ADC vcMMAE(4), так и Auristatin2 (8) h20F3 были очень активны в подкожной модели OMLI HNT-34. ADC h20F3-vcMMAE(4) вызывал долговременные полные ответы у 4/10 или 9/10 мышей при дозе 1,0 или 3,0 мкг/кг соответственно. ADC h20F3-Auristatin2(8) вызывал 3/10 или 9/10 продолжительных полных ответов при дозах 1,0 и 3,0 мг/кг соответственно.

Пример 9. Исследования ксенотрансплантата неходжкинской лимфомы *in vivo*

ТКИД (С.В-н/Sz-Prkdc^{scid}) мышам было имплантировано 5 млн клеток неходжкинской лимфомы Raji на животное подкожно. Когда средний объем опухоли достиг 100 мм³, n=6 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию PBD ADC h2F3ec-1910 (2) или контрольного PBD ADC hlgGec-1910 (2). Уровни доз PBD ADC составляли 100, 50 и 25 мкг/кг. Отдельные мыши умерщвляли, когда подкожный объем опухоли Raji достигал 1000 мм³. Как показано на фиг. 11, PBD димер ADC HDLD h20F3ec-1910 (2) вызывал долговременные полные ответы у всех мышей при дозе 100 мкг/кг. Кроме того, PBD ADC h20F3ec-1910 (2) вызывал надежные полные ответы у 4/6 мышей при дозе 50 мкг/кг, в то время как задержка роста опухоли наблюдалась при дозе 25 мкг/кг. Контрольный PBD ADC

hlgGec-1910 (2) не имел противоопухолевой активности при 100 мкг/кг и вызывал 0/6 полных ответов.

ТКИД (С.В-п/Sz-Prkdc^{scid}) мышам было имплантировано 5 млн клеток неходжкинской лимфомы WSU-DLCL2 на животное подкожно. Когда средний объем опухоли достиг 100 мм³, n=8 мышей на одну группу лечения получали одну внутривенную инъекцию PBD ADC h2F3ec-1910 (2) или контрольного PBD ADC hlgGec-1910 (2). Уровни доз PBD ADC составляли 100, 50 и 25 мкг/кг. Отдельные мыши умерщвляли, когда подкожный объем опухоли WSU-DLCL2 достигал 1.000 мм³. Как показано на фиг. 12, PBD димер ADC HDLD h20F3ec-1910 (2) вызывал долговременные полные ответы 2/8 мышей при дозе 100 мкг/кг. При более низких дозах 25 и 50 мкг/кг, PBD ADC h20F3ec-1910 (2) вызывал измеримые задержки роста опухоли относительно нелеченых мышей. Контрольный PBD ADC hlgGec-1910(2) не имел противоопухолевой активности при 100 мкг/кг и вызывал 0/8 полных ответов.

Перечень последовательностей

SEQ ID NO: 1 представляет собой аминокислотную последовательность NTB-A человека.

MLWLFQSLLFVFCFGPQNVVSSQSSLTPLMVNGILGESVTLPLEFPAGEKVNFIITWLFNE
 TSLAFIVPHETKSPKPEIHVTNPKQGRKLNFTQSYSLQLSNLKMEDTGSYRAQISTKTSAKLSSYT
 LRILRQLRNIQVTNHSQLFQNMTCELHLTCSVEDADDNVSRWEALGNTLSSQPNTLTVSWDPRI
 SSEQDYTCIAENAVSNLSFSVSAQKLCEDVKIQYTDTKMILFMVSGICIVFGFIILLLVLRKR
 RDSLSLSTQRTQGPAESARNLEYVSVSPTNNTVYASVTHSNRETEIWTPRENDTITITYSTINHS
 KESKPTFSRATALDNVV

SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность NTB-A яванского макака.

MLWLFQSLLFVFCFGPQNLVSSSTPLMVNGVLGESVILPLELSAGEMIASITWLCNG
 TSLAFIEPSETKSPNIRVTHPKQRKLNFTQSYSLKLSNLEMDTGSYSAQITTTETSVKLSSYT
 LRIFRQLRSIQVNNYSQLFQNRTEIHLTCSVEDADDNVSRWEALGSTLSSEPNITTSWDPRI
 SGEQDYTCIAENAVSNLSFSVSAQKLCGDVKIQYTDTKMILFVVFVFGICIVTGFIIIMLLVLRKR
 RDSLPLSTQRTQGPAEPAGNIEYVSVSPVNTVYASVTHSNRETEISTPIKNATVTIYSTVNH
 KESKPTFSRATALDNVV

SEQ ID NO: 3 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи 20F3 мыши.

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYGMNWVKQAPGKDLKWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFAFSLDKSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 4 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 без обратных мутаций и с CDR мыши, определенную по Kabat.

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 5 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 HA.

QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFVFLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 6 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 HB.

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQGLEWWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFVFLDKSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 7 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 HC.

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQDLEWWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFVFLDKSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 8 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 HD.

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVRQAPGQDLKWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFVFLDKSVNTAYLQISSLKAEDTAVYYCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 9 представляет собой аминокислотную последовательность вариательной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 HE.

QIQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTNYGMNWVKQAPGQDLKWMGWINTYSGEPR
 YADDFKGRFAFSLDKSVNTAYLQISSLKAEDTAVYFCARDYGRWYFDVWGQGTITVTVSS

SEQ ID NO: 10 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-H1 20F3 мыши и гуманизированного 20F3, определенную по Kabat.

NYGMN

SEQ ID NO: 11 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-H2 20F3 мыши и гу-

манизованного 20F3, определенную по Kabat.

WINTYSGEPYADDFKG

SEQ ID NO: 12 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-H3 20F3 мыши и гуманизированного 20F3, определенную по Kabat.

DYGRWYFDV

SEQ ID NO: 13 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области зрелой легкой цепи 20F3 мыши.

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSHMHYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPA

RFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQWSSTPRTFSGGKLEIKR

SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области зрелой тяжелой цепи гуманизированного 20F3 без обратных мутаций и с CDR мыши, как определено Kabat.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSHMHYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPA

RFSGSGSGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQWSSTPRTFSGGKVEIKR

SEQ ID NO: 15 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области зрелой легкой цепи гуманизированного 20F3 LA.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSHMHYQQKPGQAPRLLIYATSNLASGIPA

RFSGSGSGTDFTLT TISSLEPEDFAVYYCQWSSTPRTFSGGKVEIKR

SEQ ID NO: 16 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области зрелой легкой цепи гуманизированного 20F3 LB.

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSHMHYQQKPGQAPRPWIYATSNLASGIPA

RFSGSGSGTDYTLT TISSLEPEDFAVYYCQWSSTPRTFSGGKVEIKR

SEQ ID NO: 17 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области зрелой легкой цепи гуманизированного 20F3 LC.

QIVLSQSPATLSLSPGERATLSCRASSSVSHMHYQQKPGQAPRPWIYATSNLASGIPA

RFSGSGSGTDYTLT TISSLEPEDFAVYYCQWSSTPRTFSGGKVEIKR

SEQ ID NO: 18 представляет собой аминокислотную последовательность вариабельной области зрелой легкой цепи гуманизированного 20F3 LD.

QIVLSQSPATLSLSPGERATMTCRASSSVSHMHYQQKPGQAPRPWIYATSNLASGVPA

RFSGSGSGTDYTLT TISSLEPEDFAVYYCQWSSTPRTFSGGKVEIKR

SEQ ID NO: 19 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-L1 20F3 мыши и гуманизированного 20F3, определенную по Kabat.

RASSSVSH MH

SEQ ID NO: 20 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-L2 20F3 мыши и гуманизированного 20F3, определенную по Kabat.

ATS N LAS

SEQ ID NO: 21 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-L3 20F3 мыши и гуманизированного 20F3, определенную по Kabat.

QQWSSTPRT

SEQ ID NO: 22 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-H1 20F3 мыши, определенную по IMGT.

GYTFTNYG

SEQ ID NO: 23 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-H2 20F3 мыши, определенную по IMGT.

INTYSGEP

SEQ ID NO: 24 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-H3 20F3 мыши, определенную по IMGT.

ARDYGRWYFDV

SEQ ID NO: 25 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-L1 20F3 мыши, определенную по IMGT.

SSVSH

Аминокислотная последовательность CDR-L2 20F3 мыши, определенная по IMGT представляет собой:

ATS

SEQ ID NO: 26 представляет собой аминокислотную последовательность CDR-L3 20F3 мыши, определенную по IMGT.

QQWSSTPRT

SEQ ID NO: 27 представляет собой аминокислотную последовательность константной области легкой цепи человека.

TVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD

SKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 28 представляет собой аминокислотную последовательность константной области естественной тяжелой цепи человека.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG

SEQ ID NO: 29 представляет собой аминокислотную последовательность константной области варианта тяжелой цепи человека (S239C).

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS

SGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPCV

FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS

VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL

VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEAL

HNHYTQKSLSLSPG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело, которое специфически связывается с белком NTB-A человека, где антитело содержит переменную область зрелой тяжелой цепи и переменную область зрелой легкой цепи, где:

(а) переменная область зрелой тяжелой цепи содержит три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи согласно нумерации Кабат:

CDR1 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 10,

CDR2 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 11,

CDR3 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 12; и

переменная область зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно нумерации Кабат:

CDR1 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 19,

CDR2 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 20 и

CDR3 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 21; или

(б) переменная область зрелой тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи CDR согласно нумерации IMGT:

CDR1 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 22,

CDR2 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 23, и

CDR3 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 24; и

переменная область зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно нумерации IMGT:

CDR1 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 25,

CDR2 легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности ATS, и

CDR3 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 26.

2. Антитело по п.1, где антитело является гуманизированным, химерным или венеризованным антителом.

3. Антитело по п.1, где антитело представляет собой гуманизированное антитело.

4. Антитело по любому из пп.1-3, где

переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и

переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

5. Антитело по любому из пп.1-3, где

переменная область зрелой тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 8, и

переменная область зрелой легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 18.

6. Антитело по п.4, где

переменная область зрелой тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и

переменная область зрелой легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, и

где аминокислоты вариабельной области зрелой тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8 и аминокислоты вариабельной области зрелой легкой цепи и SEQ ID NO: 18 отличаются только консервативными заменами.

7. Антитело по любому из пп.1-3, где вариабельная область зрелой тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и вариабельная область зрелой легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 18.

8. Антитело по любому из пп.1-3, где вариабельная область зрелой тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 8, и вариабельная область зрелой легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности SEQ ID NO: 18, и где аминокислоты вариабельной области зрелой тяжелой цепи и SEQ ID NO: 8 и аминокислоты вариабельной области зрелой легкой цепи и SEQ ID NO: 18 отличаются только консервативными заменами.

9. Антитело по любому из пп.3-8, в котором H2 занято I или V, H38 занято R или K, H44 занято D или G, H46 занято K или E, H68 занято V или A, H73 занято K или T, H76 занято N или S, H91 занято Y или F, L1 занято Q или E, L5 занято S или T, L21 занято M или L, L46 занято P или L, L47 занято W или L, L58 занято V или I и L71 занято Y или F; согласно нумерации по Кабат.

10. Антитело по любому из пп.3-8, в котором заняты следующие положения в каркасе вариабельной области: H2 занято I, H38 занято R, H44 занято D, H46 занято K, H68 занято V, H73 занято K, H76 занято N, H91 занято Y, L1 занято Q, L5 занято S, L21 занято M, L46 занято P, L47 занято W, L58 занято V, L71 занято Y согласно нумерации по Кабат.

11. Антитело по любому из пп.3-8, в котором следующие положения в каркасе вариабельной области заняты, как указано: H2 занято I, H44 занято D, H46 занято K, H73 занято K, H76 занято N, L1 занято Q, L5 занято S, L21 занято M, L46 занято P, L47 занято W, L58 занято V, L71 занято Y согласно нумерации по Кабат.

12. Антитело по п.1, где зрелая тяжелая цепь и зрелая легкая цепь содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, состоящей из
 SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 15 соответственно;
 SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 16 соответственно;
 SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 17 соответственно;
 SEQ ID NO: 5 и SEQ ID NO: 18 соответственно;
 SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 15 соответственно;
 SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 16 соответственно;
 SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17 соответственно;
 SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 18 соответственно;
 SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 15 соответственно;
 SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 16 соответственно;
 SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 17 соответственно;
 SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 18 соответственно;
 SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 15 соответственно;
 SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 16 соответственно;
 SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 17 соответственно;
 SEQ ID NO: 8 и SEQ ID NO: 18 соответственно;
 SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 15 соответственно;
 SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 16 соответственно;
 SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 17 соответственно и
 SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 18 соответственно.

13. Антитело по любому из пп.1-12, где вариабельная область зрелой тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи и вариабельная область зрелой легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

14. Антитело по п.13, где константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека и где константная область тяжелой цепи обладает сниженным связыванием с рецептором Fc-гамма по сравнению с природной константной областью человека.

15. Антитело по п.13, где константная область тяжелой цепи имеет изотип IgG1.

16. Антитело по п.13, где константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 29, и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 27.

17. Антитело, которое специфически связывается с белком NTB-A человека, где антитело содержит вариабельную область зрелой тяжелой цепи и вариабельную область зрелой легкой цепи, где:

(а) вариабельная область зрелой тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно нумера-

ции Кабат:

CDR1 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 10 с одной консервативной заменой,

CDR2 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 11 или SEQ ID NO: 11 с одной консервативной заменой, и

CDR3 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 12 или SEQ ID NO: 12 с одной консервативной заменой; и

вариабельная область зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно нумерации Кабат:

CDR1 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 19 или SEQ ID NO: 19 с одной консервативной заменой,

CDR2 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 20 с одной консервативной заменой, и

CDR3 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO: 21 с одной консервативной заменой; или

(b) вариабельная область тяжелой цепи содержит три CDR тяжелой цепи согласно нумерации IMGT:

CDR1 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 22 или SEQ ID NO: 22 с одной консервативной заменой,

CDR2 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 23 или SEQ ID NO: 23 с одной консервативной заменой, и

CDR3 тяжелой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 24 с одной консервативной заменой; и

вариабельная область зрелой легкой цепи содержит три CDR легкой цепи согласно нумерации IMGT:

CDR1 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 25 или SEQ ID NO: 25 с одной консервативной заменой,

CDR2 легкой цепи, состоящую из последовательности ATS или ATS с одной консервативной заменой, и

CDR3 легкой цепи, состоящую из SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 26 с одной консервативной заменой.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащее антитело по любому из пп.1-17 и цитотоксический или цитостатический агент, где антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.18, где цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, ауристин, пиррол[1,4]бензодиазепин, индолинбензодиазепин или оксазолидинбензодиазепин.

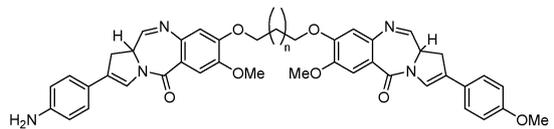
20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.18, где цитотоксическое средство представляет собой ауристин.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.20, где цитотоксическое средство представляет собой MMAE.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.20, где цитотоксическое средство представляет собой MMAF.

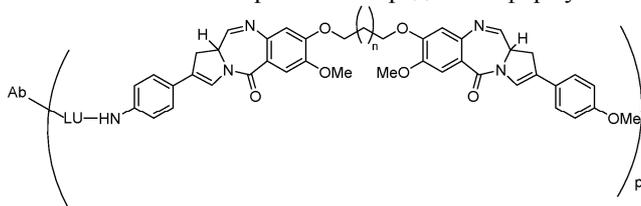
23. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.20, где цитотоксическое средство представляет собой ауристин-2.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.19, где цитотоксический агент представляет собой



где индекс n равен 1 или 3.

25. Конъюгат анти-NTV-A антитело-лекарственное средство с формулой



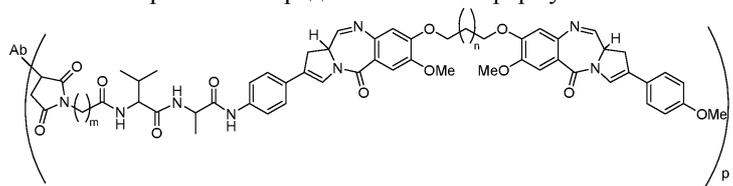
где индекс n равен 1 или 3;

LU представляет собой расщепляемую линкерную единицу;

Ab представляет собой антитело по п.17;

индекс р равен целому числу 1-4.

26. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.24 с формулой



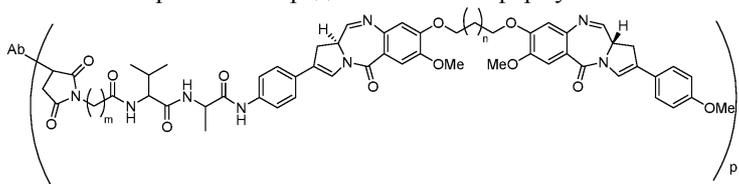
где индекс n равен 1 или 3;

индекс m равен 2-5;

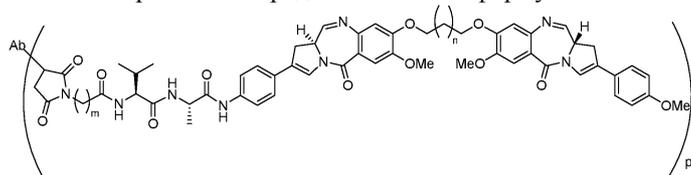
Ab представляет собой антитело по любому из пп.1-17;

индекс р равен целому числу 1-4.

27. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.26 с формулой



28. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.26 с формулой



29. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.26-28, где n равно 1.

30. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.26-28, где n равно 3.

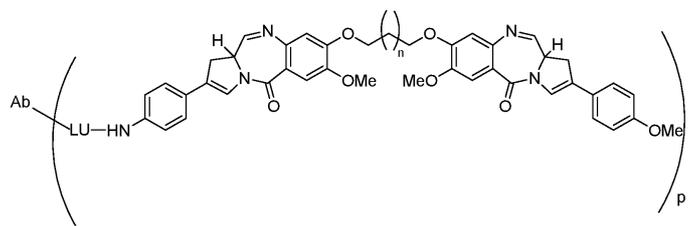
31. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.22-26, где m равно 5.

32. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.26-28, где присоединение к Ab происходит через атом серы модифицированного остатка цистеина Ab.

33. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.26-32, где присоединение к Ab происходит через атом серы или модифицированный остаток цистеина в положении 239 константной области тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации EU.

34. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.25-33, в котором р равно 2.

35. Композиция конъюгата антитело-лекарственное средство для лечения NTB-A-связанного заболевания, содержащая популяцию молекул конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственное средство с формулой



где индекс n равен 1-3;

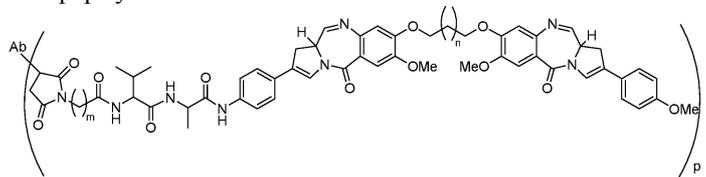
LU представляет собой расщепляемую линкерную единицу;

Ab представляет собой антитело по любому из пп.1-17;

индекс р равен целому числу 1-4;

где средняя нагрузка лекарственного средства в композиции составляет около 2.

36. Композиция по п.35, содержащая популяцию молекул конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственное средство с формулой



где индекс n равен 1-3;

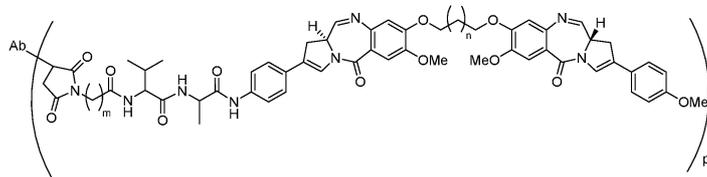
индекс m равен 2-5;

Ab представляет собой антитело по любому из пп.1-17;

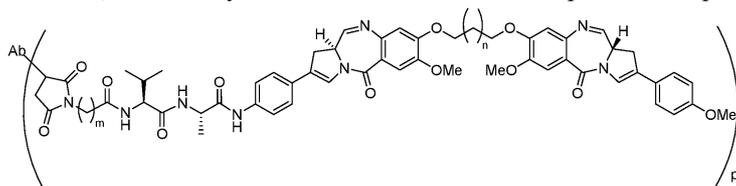
индекс p равен целому числу 1-4;

где средняя нагрузка лекарственного средства в композиции составляет около 2.

37. Композиция по п.36, в которой молекулы конъюгата антитело-лекарственное средство имеют формулу



38. Композиция по п.36, где молекулы конъюгата антитело-лекарственное средство имеют формулу



39. Композиция по любому из пп.36-38, в которой n равно 1.

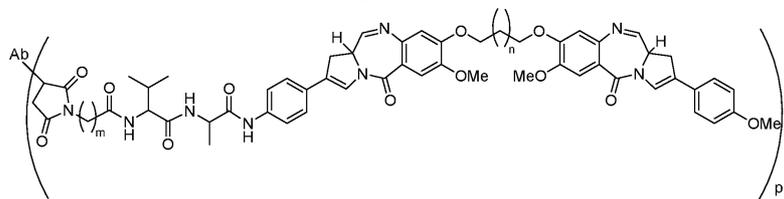
40. Композиция по любому из пп.36-38, в которой n равно 3.

41. Композиция по любому из пп.36-40, в которой n равно 5.

42. Композиция по любому из пп.36-41, где присоединение к Ab происходит через атом серы модифицированного остатка цистеина Ab.

43. Композиция по любому из пп.36-41, где присоединение к Ab связано через атом серы или модифицированный остаток цистеина в положении 239 константной области тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации EU.

44. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию молекул конъюгата анти-NTV-A антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель, где молекулы конъюгата анти-NTV-A антитело-лекарственное средство имеют формулу



где индекс n равен 1-3;

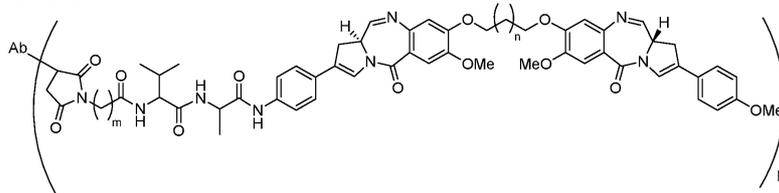
индекс m равен 2-5;

Ab представляет собой антитело по любому из пп.1-17;

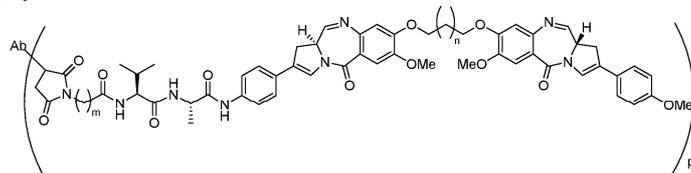
индекс p равен целому числу 1-4;

где средняя нагрузка лекарственного средства в композиции составляет около 2.

45. Фармацевтическая композиция по п.44, в которой молекулы конъюгата антитело-лекарственное средство имеют формулу

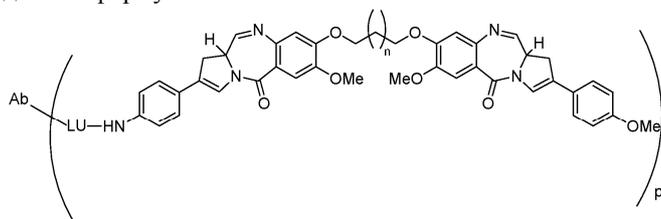


46. Фармацевтическая композиция по п.44, в которой молекулы конъюгата антитело-лекарственное средство имеют формулу



47. Фармацевтическая композиция по любому из пп.44-46, в которой n равно 1.

48. Фармацевтическая композиция по любому из пп.44-46, в которой n равно 3.
 49. Фармацевтическая композиция по любому из пп.44-48, в которой n равно 5.
 50. Фармацевтическая композиция по любому из пп.44-49, где присоединение к Ab происходит через атом серы модифицированного остатка цистеина Ab.
 51. Фармацевтическая композиция по любому из пп.44-50, где присоединение к Ab происходит через атом серы или модифицированный остаток цистеина в положении 239 константной области тяжелой цепи в соответствии с системой нумерации EU.
 52. Фармацевтическая композиция, содержащая популяцию молекул конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственное средство с формулой



где

индекс n равен 1-3;

LU представляет собой отщепляемую линкерную единицу;

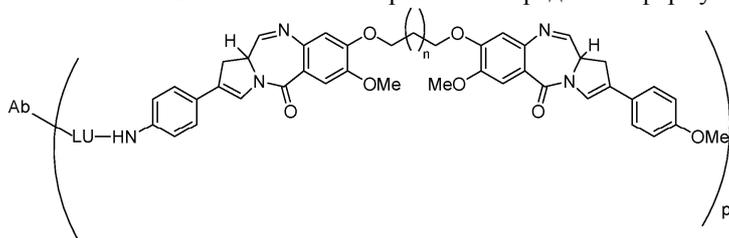
Ab представляет собой антитело, содержащее зрелую тяжелую цепь, содержащую вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и константную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 29, и легкую цепь, содержащую вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18 и константную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 27; и

индекс p равен целому числу 1-4;

где средняя нагрузка лекарственного средства в композиции составляет около 2.

53. Способ лечения онкологического пациента, клетки которого экспрессируют NTB-A, включающий введение пациенту композиции по любому из пп.35-52 в эффективном режиме.

54. Способ лечения пациента с гематологическим злокачественным заболеванием, которое экспрессирует NTB-A, включающий введение в эффективном режиме пациенту композиции, содержащей популяцию молекул конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственное средство с формулой



где

индекс n равен 1-3;

LU представляет собой отщепляемую линкерную единицу;

Ab представляет собой антитело, содержащее три CDR тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 3 и три CDR легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 13, где CDR такие, как определено согласно нумерации Кабат или IMGT; и

индекс p равен целому числу 1-4;

где средняя нагрузка лекарственного средства в композиции составляет около 2.

55. Способ лечения пациента с гематологическим злокачественным заболеванием, которое экспрессирует NTB-A, включающий введение пациенту эффективного количества конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственное средство по любому из пп.26-34.

56. Способ по любому из пп.53-55, в котором онкологическое заболевание представляет собой множественную миелому, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, хронический лимфоцитарный лейкоз, макроглобулинемию Вальденстрема или моноклональную гаммапатию неустановленной этиологии (MGUS).

57. Способ по любому из пп.53-55, в котором онкологическое заболевание представляет собой T-клеточную лимфому.

58. Способ лечения пациента с NTB-A-связанным аутоиммунным заболеванием, включающий введение пациенту композиции по любому из пп.35-52 в эффективном режиме.

59. Способ лечения пациента с NTB-A-связанным аутоиммунным заболеванием, включающий введение пациенту эффективного количества конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственного средства по любому из пп.18-34.

60. Фармацевтическая композиция для лечения NTB-A-связанного заболевания, содержащая антитело по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый носитель.

61. Выделенный полинуклеотид, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR тяжелой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 3 и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR легкой цепи с последовательностью SEQ ID NO: 13, где CDR определено согласно нумерации Кабат и IMGT.

62. Полинуклеотид по п.61, содержащий последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8 и/или вариабельную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

63. Вектор, содержащий полинуклеотид по п.61.

64. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.63.

65. Клетка хозяин по п.63, где клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

66. Способ получения анти-NTB-A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий экспрессию выделенного полинуклеотида по п.61.

67. Способ получения анти-NTB-A антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, где способ включает культивирование клетки-хозяина по п.64 в условиях, подходящих для экспрессии полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

68. Способ получения конъюгата анти-NTB-A антитело-лекарственное средство, где способ включает:

а) культивирование клетки-хозяина по п.64 в условиях, подходящих для экспрессии полинуклеотида, кодирующего антитело или его антигенсвязывающий фрагмент;

б) выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и

с) конъюгирование цитотоксического средства с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

69. Способ по п.67 или 68, где клетка-хозяин представляет собой клетку CHO.

70. Способ по п.68, где цитотоксический агент представляет собой майтанзиноид, ауристин, пироло[1,4]бензодиазепин, индолинобензодиазепин или оксазолинобензодиазепин.

		10	20	30	40	50	60	70
20F3 VH	I
20F3 huFW	QVQLVQSGSELKPKGASVKVSKASGYTF	NYGMN	VVRQAPGGLEWM	QWINTYSGEP	RYADDFKGRFV			
20F3 HA
20F3 HB
20F3 HC
20F3 HD
20F3 HE

		80	90	100	110
20F3 VH
20F3 huFW	SLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCA	FDYGRWYEDW	GGGTTVTVSS		
20F3 HA
20F3 HB
20F3 HC
20F3 HD
20F3 HE

20F3 vH huFW: vH7-4-1/JH6

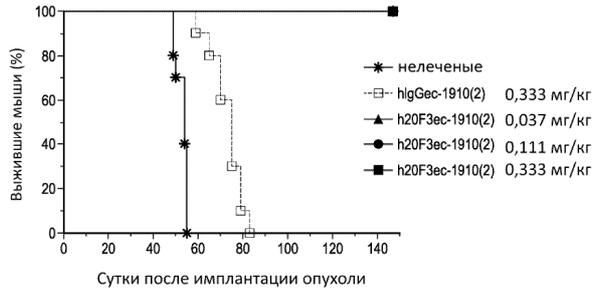
Фиг. 1

		10	20	30	40	50	60	70
20F3 VL	Q
20F3 huFW	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCR	ASSSVSHMHWYQQKPKGAPRLLIYA	TSNLASG	IPARFSGSGGTD				
20F3 LA
20F3 LB
20F3 LC
20F3 LD

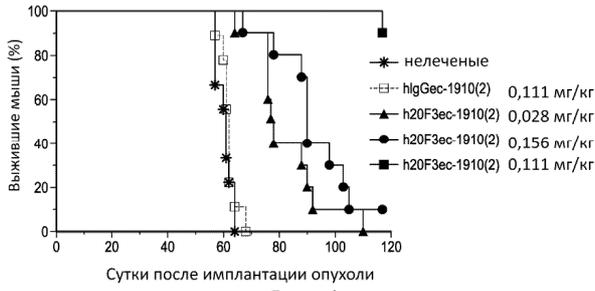
		80	90	100
20F3 VL
20F3 huFW	TLTISSLEPEDFAVYYC	QQWSSTPRTF	GGGTKVEIKR	
20F3 LA
20F3 LB
20F3 LC
20F3 LD

20F3 vL huFW: vK3-11/JH4

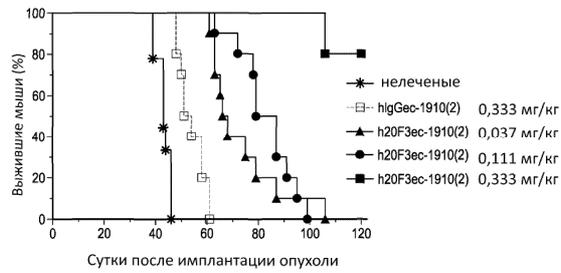
Фиг. 2



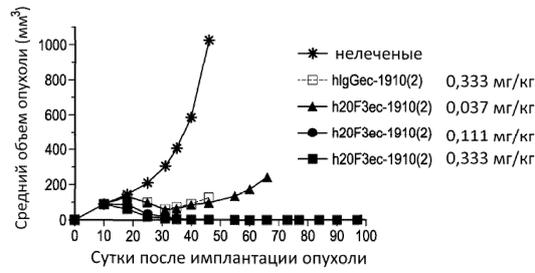
Фиг. 3



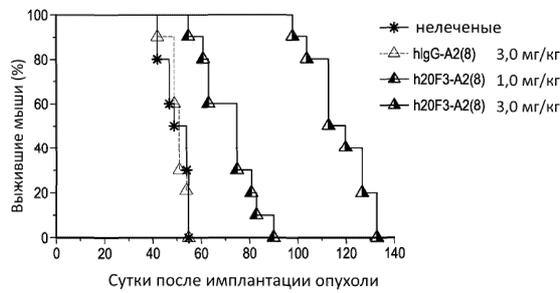
Фиг. 4



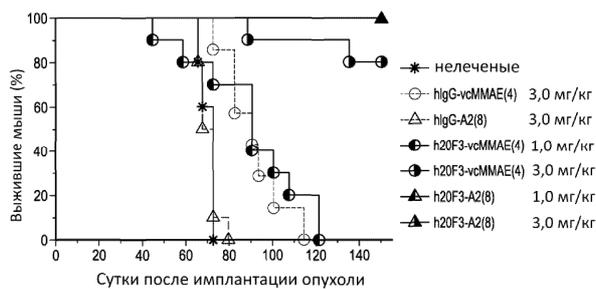
Фиг. 5



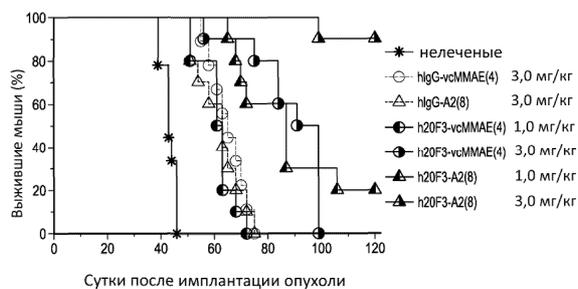
Фиг. 6



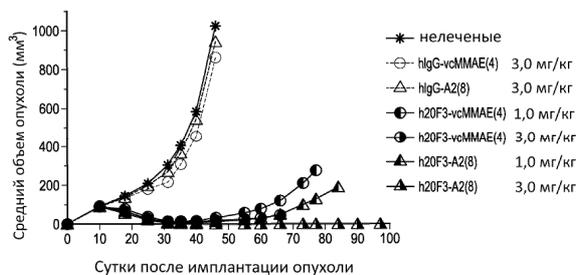
Фиг. 7



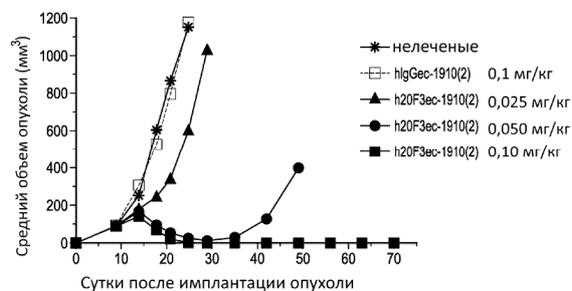
Фиг. 8



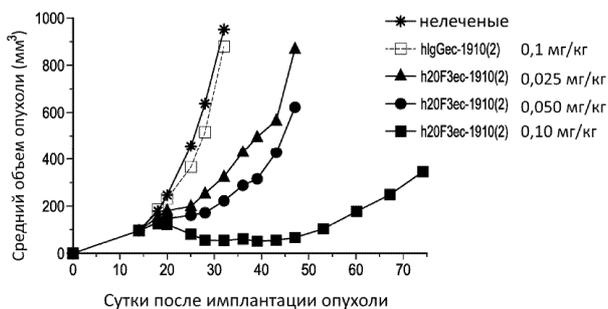
Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Фиг. 12

