



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.11.30

(21) Номер заявки
201201273

(22) Дата подачи заявки
2011.03.10

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

(54) МОНОКЛОНАЛЬНЫЕ АНТИТЕЛА К С-MET

(31) PA 2010 00191; 61/312,622; PA 2010 00862

(32) 2010.03.10; 2010.03.10; 2010.09.24

(33) DK; US; DK

(43) 2013.02.28

(86) PCT/EP2011/053646

(87) WO 2011/110642 2011.09.15

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
ГЕНМАБ А/С (DK)

(72) Изобретатель:
Нейссен Йост Й., Де Гуэй Барт, Ван Ден Бринк Эдвард, Лабрейн Аран Франк, Хут Рене М.А., Схююрман Янине, Паррен Паул, Ван Де Винкел Ян (NL)

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

(56) JIN HONGKUI ET AL.: "MetMAb, the one-armed 5D5 anti-c-Met antibody, inhibits orthotopic pancreatic tumor growth and improves survival", CANCER RESEARCH, AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 68, no. 11, 1 June 2008 (2008-06-01), pages 4360-4368, XP002570057, ISSN: 0008-5472, DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-07-5960, abstract, pg. 4360, left-hand col

TSENG JEFFREY R. ET AL.: "Preclinical efficacy of the c-Met inhibitor CE-355621 in a U87 MG mouse xenograft model evaluated by 18F-FDG small-animal PET", JOURNAL OF NUCLEAR MEDICINE : OFFICIAL PUBLICATION, SOCIETY OF NUCLEAR MEDICINE JAN 2008, vol. 49, no.

1, 1 January 2008 (2008-01-01), pages 129-134, XP002562169, DOI: 10.2967/JNUMED.106.038836, abstract, pg. 129, right-hand col. - pg. 130, right-hand col fig. 1

WO-A1-2005016382

TOBIAS MARTENS ET AL.: "A novel one-armed anti-c-Met antibody inhibits glioblastoma growth in vivo", CLINICAL CANCER RESEARCH, THE AMERICAN ASSOCIATION FOR CANCER RESEARCH, US, vol. 12, no. 20 Pt 1, 15 October 2006 (2006-10-15), pages 6144-6152, XP002618391, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1418, abstract, pg. 6145, left-hand col.

EP-A1-2014681

WO-A2-2007126799

US-A-5686292

DANGL J. L. ET AL.: "Segmental flexibility and complement fixation of genetically engineered Chimeric human, rabbit and mouse antibodies.", THE EMBO JOURNAL JUL 1988 LNKD-PUBMED:3138110, vol. 7, no. 7, July 1988 (1988-07), pages 1989-1994, XP008046142, ISSN: 0261-4189, abstract, pg. 1992-1993, table I, fig. 4

SAPHIRE E. O. ET AL.: "Contrasting IgG Structures Reveal Extreme Asymmetry and Flexibility", JOURNAL OF MOLECULAR BIOLOGY, ACADEMIC PRESS, UNITED KINGDOM, vol. 319, no. 1, 24 May 2002 (2002-05-24), pages 9-18, XP004449639, ISSN: 0022-2836, DOI: 10.1016/50022-2836(02)00244-9, abstract, figures 1-4

DALL'ACQUA WILLIAM F. ET AL.: "Modulation of the effector functions of a human IgG1 through engineering of its hinge region", JOURNAL OF IMMUNOLOGY, AMERICAN ASSOCIATION OF IMMUNOLOGISTS, US, vol. 177, no. 2, 15 July 2006 (2006-07-15), pages 1129-1138, XP002497452, ISSN: 0022-1767, abstract, tables I and II

WO-A1-2010063746

(57) В изобретении раскрыты выделенные моноклональные антитела, которые связывают человеческий c-Met, рецептор фактора роста гепатоцитов, связанные с ними композиции и молекулы на основе антител. Также раскрыты фармацевтические композиции, включающие антитела, а также терапевтические и диагностические способы применения антител.

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против человеческого с-Met, рецептора фактора роста гепатоцитов, и к применениям таких антител, конкретно к их применению в лечении злокачественных новообразований.

Предшествующий уровень техники

Белок с-Met является мембраноассоциированным рецептором-тирозинкиназой. Преимущественно одноцепочечный предшественник посттрансляционно расщепляется с получением зрелой формы гетеродимера с-Met, который состоит из внеклеточной α -цепи (50 кДа) и более длинной трансмембранной β -цепи (145 кДа), которые связаны дисульфидной связью (Birchmeier et al. 2003. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:915). Внеклеточная часть с-Met состоит из трех типов доменов. N-концевой домен SEMA образуется из цельной α -субъединицы и части β -субъединицы и имеет гомологию с белками семафоринов. За доменом SEMA следует цистеин-богатый домен, а далее 4 иммуноглобулино-(Ig)-подобных домена. Цитоплазматическая часть содержит околочелювечный киназный домен и C-концевой хвост, который существенен для передачи сигнала в клетку. Единственный известный высоко-аффинный лиганд для с-Met, фактор роста гепатоцитов (HGF), экспрессируется, главным образом, фибробластами в нормальных условиях (Li and Tseng 1995. *J Cell Physiol* 163:61) и опухолевыми клетками (Ferracini et al. 1995. *Oncogene* 10:739). HGF (также называемый рассеивающим фактором: SF) синтезируется в виде предшественника, который протеолитически превращается в активный а/р гетеродимер. На основании кристаллической структуры фрагмента, связывающего рецептор, считается, что HGF связывается с с-Met в виде димера (Chirgadze et al. 1999. *Nat Struct Biol* 6:72). α -Цепь HGF связывается в с-Met с высокой аффинностью с Ig-подобным доменом, тогда как β -цепь HGF связывается в с-Met с низкой аффинностью с доменом SEMA (Basilico et al. 2008. *J Biol Chem* 283:21267). Последнее взаимодействие ответственно за димеризацию с-Met и активацию рецепторной тирозинкиназы при связывании с активным гетеродимером HGF. Автофосфорилирование рецептора приводит в результате к получению уникального стыковочного сайта для привлечения эффекторов, из которых связывание Gab1 (1-й связывающий агент, ассоциированный с 2-м белком, связанным с рецептором фактора роста [Grb2]) существенно для последующих этапов основных сигнальных путей с-Met (Comoglio et al. 2008. *Nat Rev Drug Discov* 7:504):

Путь Ras-ERK1/2: пролиферация;

Путь Ras-Rac: инвазия, подвижность, эпителиально-мезенхимальный переход;

Путь PI3K-Akt: жизнеспособность.

с-Met экспрессируется на поверхности эпителиальных и эндотелиальных клеток многих органов в процессе эмбриогенеза и во взрослом состоянии, включая печень, поджелудочную железу, предстательную железу, почки, мышцы и костный мозг. Активация с-Met играет существенную роль в так называемой программе "инвазивного роста", которая состоит из ряда процессов, включающих пролиферацию, подвижность, ангиогенез и защиту от апоптоза (Bossaccio and Comoglio 2006. *Nat Rev Cancer* 6:637). Эти регулируемые с-Met процессы идут при нормальных физиологических условиях в процессе эмбрионального развития, при репарации поражений печени и сердца, и в патологических случаях в ходе онкогенеза (Eder et al. 2009. *Clin Cancer Res* 15:2207).

Неуместная передача сигналов от с-Met происходит фактически во всех типах твердых опухолей, таких как рак мочевого пузыря, рак груди, рак шейки матки, колоректальный рак, рак желудка, рак головы и шеи, рак печени, рак легкого, рак яичников, рак поджелудочной железы, рак почек и рак щитовидной железы, а также в различных саркомах, гемопоэтических злокачественных новообразованиях и в меланомах (Birchmeier et al. 2003. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4:915; Comoglio et al. 2008. *Nat Rev Drug Discov* 7:504; Peruzzi and Bottaro 2006. *Clin Cancer Res* 12:3657). Основопологающие механизмы онкогенности с-Met, как правило, осуществляются тремя различными путями:

аутокринные петли HGF/с-Met,

сверхэкспрессия с-Met или HGF,

мутации в кодирующей последовательности рецептора с-Met, активирующие киназы.

Наиболее значимо то, что активирующие с-Met мутации были идентифицированы у пациентов с наследственным папиллярным раком почек (Schmidt et al. 1997. *Nat Genet* 16:68). Конститутивная активация с-Met способствует одному из или комбинации пролиферативного, инвазивного, жизнеобеспечивающего или ангиогенного фенотипов злокачественных новообразований. Было показано, что сайленсинг эндогенно экспрессирующегося гена с-Met в опухолевых клетках в результате приводит к прекращению пролиферации и опухолевого роста и к регрессии начавшегося метастазирования, а также к уменьшению образования новых метастаз (Corso et al. 2008. *Oncogene* 27:684).

Так как с-Met способствует многим состояниям развития злокачественного новообразования, от исходного до прогрессии к метастазированию, с-Met и его лиганд HGF стали лидирующими кандидатами для направленной противоопухолевой терапии (Comoglio et al. 2008. *Nat Rev Drug Discov* 7:504; Knudsen and Vande Woude 2008. *Curr Opin Genet Dev* 18:87). Для достижения данной цели изучаются несколько стратегий:

Ложные рецепторы: субобласти HGF или с-Met или молекулярные аналоги могут действовать анта-

гонистически в качестве стехиометрических конкурентов путем блокирования связывания лиганда или димеризации рецептора. Одним примером такой антагонистической субобласти HGF является NK4 (Kringle Pharma).

Низкомолекулярные ингибиторы тирозинкиназ (TKI): Тремя с-Met-специфичными TKI в различных стадиях клинической оценки являются ARQ197 (ArQule), JNJ 38877605 (Johnson & Johnson) и PF-04217903 (Pfizer).

Моноклональные антитела, связывающие HGF, такие как AMG102, рилотумумаб (англ. ritotumumab) (Amgen), HuL2G7 (Takeda), и AV-299 (Schering).

Моноклональные антитела, связывающие с-Met, описаны в WO 2005016382, WO 2006015371, WO 2007090807, WO 2007126799 WO 2009007427, WO 2009142738 и в работе van der Horst et al. (van der Horst et al. 2009. Neoplasia 11:355). MetMAb (Genentech) представляют собой гуманизированные моновалентные (одно-плечевые) OA-5D5 антитела, которое связывают внеклеточный домен с-Met, предотвращая таким образом связывание HGF и последующую активацию рецептора (Jin et al. 2008. Cancer Res 68:4360). В мышинных моделях ксенотрансплантатов было обнаружено, что обработка MetMAb ингибирует опухолевый рост HGF-управляемой ортотопической глиобластомы и подкожных панкреатических опухолей (Jin et al. 2008. Cancer Res 68:4360; Martens et al. 2006. Clin Cancer Res 12:6144). Антитело h224G11 (Pierre Fabre) (Corvaia and Boute 2009. Abstract 835 AACR 100th Annual Meeting) представляет собой гуманизированное двухвалентное IgG1-антитело против с-Met. Противоопухолевый эффект данного антитела наблюдали у мышей (Goetsch et al. 2009. Abstract 2792 AACR 100th Annual Meeting). Антитело CE-355621 (Pfizer) представляет собой человеческий IgG2, который блокирует связывание лиганда путем связывания с внеклеточным доменом с-Met и ингибирует HGF-зависимый рост в моделях опухолевых ксенотрансплантатов (Tseng et al. 2008. J Nucl Med 49:129).

В заключении следует отметить, что некоторые продукты против с-Met уже изучались, но до сих пор не существует ни одного продукта против с-Met, одобренного для терапевтического применения. Существует потребность в получении эффективных и безопасных продуктов для лечения тяжелых, ассоциированных с с-Met заболеваний, таких как злокачественные новообразования.

Сущность изобретения

Целью настоящего изобретения является предложение новых высокоспецифичных и эффективных моноклональных антител против с-Met для медицинского применения. Антитела по изобретению демонстрируют характеристики связывания с с-Met, которые отличаются от характеристик антител, описанных в данной области. В предпочтительных воплощениях, антитела по изобретению обладают высокой аффинностью по отношению к человеческому с-Met, являются антагонистическими и обладают предпочтительным профилем фармакокинетики для применения у пациентов-людей.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1. Сравнение последовательностей переменных участков тяжелых цепей антител HuMAb. На основании этих последовательностей могут быть определены консенсусные последовательности CDR. Эти консенсусные последовательности представлены в таблице 4.

Фиг. 2. Сравнение последовательностей переменных участков легких цепей антител HuMAb. На основании этих последовательностей могут быть определены консенсусные последовательности CDR. Эти консенсусные последовательности представлены в табл. 4.

Фиг. 3. Кривые связывания одновалентных и двухвалентных форм антител против с-Met с клетками A431, которые экспрессируют с-Met. Представленные данные это MFI одного репрезентативного эксперимента. Так как IgG1-024 и Uni-068 не демонстрируют насыщенного связывания с клетками A431, то не представляется возможным рассчитать точное значение EC₅₀.

Фиг. 4. Связывание антител с с-Met, который экспрессируется на эпителиальных клетках макаки-резус. Представленные данные - это MFI одного эксперимента.

Фиг. 5. Ингибирование связывания HGF с внеклеточным доменом рецептора с-Met, индуцированное антителом против с-Met. Представленные данные - это один репрезентативный эксперимент.

Фиг. 6. Кривые ингибирования различными антителами против с-Met связывания HGF с сMetSEMA_567His8, полученные с помощью TR-FRET. Представленные данные - это среднее MFI ± стандартное отклонение трех независимых экспериментов.

Фиг. 7. Процентное ингибирование жизнеспособных клеток KP4 после обработки антителом против с-Met по сравнению с необработанными клетками (0%). Представленные данные - это процентное ингибирование жизнеспособных клеток двух независимых экспериментов ± стандартное отклонение. IgG1-1016-022 является единственным положительным результатом в одном эксперименте.

Фиг. 8. Эффективность антител против с-Met при ингибировании опухолевого роста в модели ксенотрансплантата KP4 в мышах SCID. Мышей обрабатывали с помощью 400 цд антитела на 9 день после недельного поддержания дозы 200 цд. Представлены средние размеры опухоли на группу обработки.

Фиг. 9. Эффективность антител, связывающих с-Met, для ингибирования опухолевого роста в модели ксенотрансплантата KP4 в мышах SCID. Мышей обрабатывали 400 мкг антитела на 9 день, с последующей поддерживающей дозой 200 мкг раз в неделю. Эффект обработки, оказываемый на частоту опу-

холой, от времени. Представлен процент мышей без опухоли (размеры опухолей $<500 \text{ мм}^3$). Образование опухолей замедлялось у мышей, обработанных антагонистическими антителами, по сравнению с мышами, обработанными контрольными антителами.

Фиг. 10. Эффективность антител против с-Met при ингибировании опухолевого роста в модели ксенотрансплантата MKN45 в мышах SCID. Мышей обрабатывали 40 мг/кг антитела на 7 день и 20 мг/кг антитела в дни 14, 21 и 28. Представлены средние размеры опухолей до достижения 50% мышей предельного значения, составляющего 700 мм^3 на группу обработки.

Фиг. 11. Эффективность антител против с-Met, при ингибировании опухолевого роста в модели ксенотрансплантата MKN45 в мышах SCID. Мышей обрабатывали 40 мг/кг антитела на 7 день и 20 мг/кг антитела в дни 14, 21 и 28. Процент мышей с размером опухоли менее чем 700 мм^3 представлен на диаграмме Каплана-Мейера. Образование опухолей замедлялось у мышей, обработанных анти с-Met антителами, по сравнению с мышами, обработанными изотипическим контрольным антителом.

Фиг. 12. Анализ жизнеспособности КР4 для определения влияния гибкости антитела (antibody flexibility) на его агонистическую активность. Формат IgA2m(1) не индуцирует пролиферацию в отличие от форматов IgA1 и IgG1 того же антитела. В данном эксперименте использовали варианты антитела против с-Met 5D5 (см. US6468529 и пример 2).

Фиг. 13. Анализ гибких мутантов в невозстанавливающем ДСН-ПААГ (069). Не наблюдали aberrantных мультимеров или продуктов деградации, тогда как спаривание легкой цепи было видно как пелосу 50 кДа ((LC)₂) в C220S, ΔC220 в мутантах IgG1-шарнир IgG3.

Фиг. 14. Антигенсвязывающий тИФА для измерения связывания с с-Met антител против с-Met с мутациями в шарнире. С помощью тИФА было показано, что все мутанты связывают с-Met со сравнимой аффинностью.

Фиг. 15. Фосфорилирование с-Met как регистрируемая величина агонистической активности антител против с-Met. На фиг. 15 представлены результаты вестерн-блоттинга лизатов клеток A549; мембраны окрашены антителами против фосфорилированного с-met, общего с-Met или β-актина.

Фиг. 16. Анализ пролиферации с использованием клеток NCI-H441. Клеточную массу определяли через 7 дней инкубации в присутствии антитела или контролей, и выражали в виде процента относительно необработанных образцов (для которых устанавливали 100%).

Фиг. 17. Анализ жизнеспособности КР4. Тестировали эффект, оказываемый антителами против с-Met, на общую жизнеспособность клеток КР4. Способность IgG1-1016-069 снижать жизнеспособность КР4 сохранялась и/или улучшалась путем введения мутаций, которые снижали гибкость антител.

Фиг. 18. Отрицательная модуляция, измеренная с помощью тИФА в виде уровня суммарного с-Met в лизатах A549. Все варианты антитела (069) сохраняли способность отрицательной модуляции.

Фиг. 19. Анализ ADCC для сравнения антител IgG1-1016-069 с высоким и с низким содержанием фукозы.

Фиг. 20. Отсутствие связывания антител с-Met с клетками в цельной крови в анализе связывания FACS. Результаты представлены для В-клеток, моноцитов и гранулоцитов.

Подробное описание изобретения **Определения**

Термин "с-Met", при использовании в данном документе, обозначает рецептор фактора роста гепатоцитов (регистрационный номер Genbank NM 000245) и включает любые варианты, изоформы и межвидовые гомологи человеческого с-Met, которые естественным образом экспрессируются клетками или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном с-Met.

Термин "иммуноглобулин" обозначает класс структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, все четыре связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, *Fundamental Immunology Ch. 7* (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). Вкратце, каждая тяжелая цепь, как правило, содержит вариабельную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как V_H или VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит, как правило, три домена, C_{H1}, C_{H2} и C_{H3}. Каждая легкая цепь содержит, как правило, вариабельную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как V_L или VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит, как правило, один домен, C_L. Области V_H и V_L, которые могут быть дополнительно подразделены на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определяемых петель), также их называют областями, отвечающими за комплементарность связывания (CDR), перемежаются участками, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L, как правило, содержит три CDR и четыре FR, расположенные от N-конца к C-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см., также Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196, 901-917 (1987)). Как правило, нумерация аминокислотных остатков в данной области осуществляется с помощью метода, описанного у Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, Na-

tional Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991) (фразы, такие как нумерация остатка варибельного домена как у Kabat или согласно Kabat обозначают в данном документе систему нумерации для варибельных доменов тяжелой цепи или варибельных доменов легкой цепи). С использованием данной системы нумерации, фактическая линейная аминокислотная последовательность пептида может содержать меньшее количество аминокислот или дополнительные аминокислоты, что соответствует укорачиванию или вставке в FR или CDR варибельного домена. Например, варибельный домен тяжелой цепи может включать единичную аминокислотную вставку (остаток 52a согласно Kabat) после остатка 52 V_H CDR2 и вставленные остатки (например, остатки 82a, 82b, и 82c, и т.д. согласно Kabat) после остатка 82 FR тяжелой цепи. Нумерация остатков по Kabat может определяться для данного антитела с помощью сравнения областей гомологии последовательности антитела с последовательностью со "стандартной" нумерацией по Kabat.

В контексте настоящего изобретения термин "антитело" (АТ) обозначает молекулу иммуноглобулина, фрагмент молекулы иммуноглобулина или их производное, которые обладают способностью специфично связываться с антигеном при обычных физиологических условиях, с периодом полужизни, составляющим существенные периоды времени, например, по меньшей мере около 30 мин, по меньшей мере около 45 мин, по меньшей мере около 1 ч, по меньшей мере около 2 ч, по меньшей мере около 4 ч, по меньшей мере около 8 ч, по меньшей мере около 12 ч, около 24 ч или более, около 48 ч или более, около 3, 4, 5, 6, 7 дней или более и т.д., или любой другой соразмерный функционально определенный период (такой как период времени, достаточный для индукции, стимулирования, усиления и/или модуляции физиологического ответа, ассоциированного с антителом, связывающимся с антигеном, и/или период времени, достаточный для антитела для вызова эффекторной активности). Варибельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат домен связывания, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител (АТ) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации системы комплемента. Антитело, связывающее с-Met, также может быть биспецифичным антителом, диателом или подобной им молекулой (описание диател см., например, в PNAS USA 90(14), 6444-8 (1993)). Действительно, биспецифичные антитела, диатела и им подобные, представленные настоящим изобретением, могут связываться с подходящей мишенью дополнительно к участку с-Met. Как указано выше, термин антитело в данном документе, если не указано иное или пока нет очевидного противоречия по контексту, включает фрагменты антитела, которое сохраняет способность специфично связываться с антигеном. Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может быть осуществлена с помощью фрагментов полноразмерного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охваченных термином "антитело", включают (i) фрагмент Fab' или фрагмент Fab, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L, V_H, C_L и C_H1, или моновалентное антитело, описанное в WO2007059782 (Genmab); (ii) фрагменты F(ab')₂, двухвалентные фрагменты, включающие два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, по существу состоящий из доменов V_H и C_H1; (iv) фрагмент Fv, по существу состоящий из доменов V_L и V_H ОДИНОЧНОГО плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., Nature 341, 544-546 (1989)), который по существу состоит из домена V_H и называется также доменным антителом (Holt et al; Trends Biotechnol. 2003 Nov;21(11):484-90); (vi) верблюжьего антитела или нанотела (Revets et al; Expert Opin Biol Ther. 2005 Jan;5(1):111-24) и (vii) выделенный гиперварибельный участок (CDR). Более того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H, кодируются отдельными генами, они могут быть объединены, с помощью рекомбинантных методов, посредством синтетического линкера, который позволяет им создать отдельную белковую цепь, в которой области V_L и V_H сливаются с образованием моновалентных молекул (известных как одноцепочечные антитела или одноцепочечный фрагмент Fv (scFv), см. например, Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) и Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988)). Такие одноцепочечные антитела охвачены термином антитело, если не упомянуто иное или очевидно не указано в контексте. Хотя такие фрагменты, как правило, включены в обозначение антитела, они все вместе или по отдельности представляют собой уникальные признаки настоящего изобретения, демонстрирующие различные биологические свойства и применимость. Эти и другие применяемые антительные фрагменты в контексте настоящего изобретения обсуждаются далее в данном документе. Также следует понимать, что термин антитело, если не указано иное, также включает поликлональные антитела, моноклональные антитела (МАТ), антитело-подобные полипептиды, такие как химерные антитела и гуманизированные антитела, и антительные фрагменты, сохраняющие способность специфического связывания с антигеном (антигенсвязывающие фрагменты), полученные с помощью известных методов, таких как ферментативное расщепление, пептидный синтез и рекомбинантные методы. При продуцировании антитело может обладать любым изотипом.

При использовании в данном документе термин "изотип" относится к любому классу иммуноглобулинов (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, или IgM), которые кодируются генами константных областей тяжелых цепей.

В контексте настоящего изобретения, термин "моновалентное антитело" обозначает, что молекула антитела способна к связыванию с одной молекулой антигена, и, таким образом, не способна к перекре-

стному связыванию с антигенами.

"Антитело, дефицитное по эффекторной функции" или "антитело с дефицитом эффекторной функции" обозначает антитело, которое обладает значительно меньшей или не обладает способностью активировать один или несколько эффекторных механизмов, таких как активация комплемента или связывание с Fc-рецептором. Таким образом, антитела, дефицитные по эффекторной функции, обладают значительно меньшей или не обладают способностью опосредовать антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Примером такого антитела является IgG4.

"Антитело, связывающее с-Met" представляет собой антитело, описанное выше, которое специфично связывается с антигеном с-Met.

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин "человеческое антитело" включает антитела, содержащие переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие антитела по изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими зародышевыми последовательностями иммуноглобулинов (например, мутации, введенные неспецифическим или сайтспецифическим мутагенезом *in vitro* или соматическими мутациями *in vivo*). Однако, при использовании в данном документе, подразумевается, что термин "человеческое антитело" не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мыши, были пересажены в человеческие каркасные последовательности.

При использовании в данном документе, человеческое антитело "выделено из" зародышевой последовательности, если антитело получено из системы с использованием человеческих иммуноглобулиновых последовательностей, например, путем иммунизации трансгенной мыши, несущей человеческие иммуноглобулиновые гены, или путем скрининга библиотеки человеческих иммуноглобулиновых генов, и где выбранное человеческое антитело идентично по аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью, кодируемой зародышевым иммуноглобулиновым геном, по меньшей мере на 90%, например по меньшей мере на 95%, например по меньшей мере на 96%, например по меньшей мере на 97%, например по меньшей мере на 98%, или например по меньшей мере на 99%. Как правило, помимо CDR3 тяжелой цепи, человеческое антитело, полученное из конкретной человеческой зародышевой последовательности, будет демонстрировать не более чем 20 аминокислотных отличий, например, не более чем 10 аминокислотных отличий, как например, не более чем 9, 8, 7, 6 или 5, например, не более чем 4, 3, 2, или 1 аминокислотное отличие от аминокислотной последовательности, кодируемой зародышевым иммуноглобулиновым геном.

В предпочтительном воплощении антитело по изобретению является выделенным. При использовании в данном документе, подразумевается, что "выделенное антитело" обозначает антитело, которое по существу свободно от других антител, обладающих отличными антигенными специфичностями (например, выделенное антитело, которое специфично связывается с с-Met, по существу свободно от антител, которые специфично связываются с антигенами, отличными от с-Met). Выделенное антитело, которое специфично связывается с эпитопом, изоформой или вариантом человеческого с-Met, может, однако, обладать перекрестной реактивностью с другими родственными антигенами, например из других видов (например, с межвидовыми гомологами с-Met). Кроме того, выделенное антитело может быть фактически свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ. В одном воплощении настоящего изобретения два или несколько "выделенных" моноклональных антител, обладающих отличающимися антигенсвязывающими специфичностями, объединяются в хорошо охарактеризованной композиции.

При использовании в данном документе в контексте двух или нескольких антител, термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" обозначает, что два или несколько антител конкурируют за связывание с с-Met, например, конкурируют за связывание с с-Met в анализе, описанном в примерах данного документа. Для некоторых пар антител конкуренция при анализе в примерах наблюдается только тогда, когда антитело нанесено в виде покрытия на чашку, а другое антитело используется для конкуренции, а не наоборот. Также при использовании в данном документе подразумевается, что термин "конкурирует с" охватывает такие комбинации антител.

Термин "эпитоп" означает белковую детерминанту, способную специфически связываться с антителом. Эпитопы, как правило, содержат поверхностные группировки молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические характеристики заряда. Конформационные и неконформационные эпитопы различаются тем что связывание с первым, но не последним, нарушается в присутствии денатурирующих растворителей. Эпитоп может включать аминокислотные остатки, непосредственно вовлеченные в связывание (также называемые иммунодоминантные компоненты эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые вовлечены в связывание, такие как аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются специфическим антигенсвязывающим пептидом (другими словами, аминокислотный остаток находится внутри футпринта специфического антигенсвязывающего пептида).

При использовании в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к препарату

молекул антитела одной молекулярной композиции. Композиция моноклонального антитела демонстрирует уникальную специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Соответственно, термин "человеческое моноклональное антитело" обозначает антитела, демонстрирующие уникальную специфичность связывания, и которые содержат переменные и константные области, выделенные из человеческих зародышевых последовательностей иммуноглобулинов. Человеческие моноклональные антитела могут быть получены с помощью гибридомы, которая является слитой с иммортализованной клеткой В-клеткой, полученной из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, такого как трансгенная мышь, имеющего геном, включающий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи человека.

При использовании в данном документе, термин "связывание" в контексте связывания антитела с конкретным антигеном с аффинностью связывания, соответствующей K_D около 10^{-7} М или менее, как например, около 10^{-8} М или менее, как например, около 10^{-9} М или менее, около 10^{-10} М или менее, или около 10^{-11} М или еще менее, согласно определению, с помощью, например технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR) в приборе "BIAcore 3000" с использованием антигена в качестве лиганда и антитела в качестве аналита, которое связывается с конкретным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , которая по меньшей мере в десять раз ниже, например, в 100 раз ниже, например, по меньшей мере, в 1000 раз ниже, например, по меньшей мере, в 10000 раз ниже, например по меньшей мере в 100000 раз ниже, чем аффинность связывания с неспецифичным антигеном (например, БСА, казеин), отличным от конкретного антигена или близкородственного антигена. Значение, на которое снижается аффинность, зависит от K_D антитела, так что когда K_D антитела очень низкая (то есть, антитело высоко-специфично), то значение, на которое аффинность к антигену ниже, чем аффинность для неспецифичного антигена, может быть, по меньшей мере, десятикратным.

Термин " k_d " (s^{-1}), при использовании в данном документе, обозначает константу степени диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело. Указанное значение также обозначается в виде k_{off} .

Термин " k_a " ($M^{-1} \times s^{-1}$), при использовании в данном документе, обозначает константу степени ассоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело.

Термин " K_D " (М), при использовании в данном документе, обозначает константу равновесной диссоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело.

Термин " K_A " (M^{-1}), при использовании в данном документе, обозначает константу равновесной ассоциации конкретного взаимодействия антиген-антитело, которую получают путем деления k_a на k_d .

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин "ингибирует рост" (например, в отношении клеток, таких как опухолевые клетки) включает любое измеряемое уменьшение клеточного роста при контакте с антителом, связывающим с-Met, по сравнению с ростом тех же клеток, не контактировавших с антителом, связывающим с-Met, например, ингибирование роста клеточной культуры, по меньшей мере, на величину около 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 99%, или 100%. Такое уменьшение клеточного роста может происходить с помощью различных механизмов, например, с помощью фагоцитоза эффекторных клеток, ADCC, CDC, и/или апоптоза.

В настоящем изобретении также предлагаются антитела, включающие функциональные варианты области V_L , области V_H , или одного или нескольких CDR антител из примеров. Функциональный вариант V_L , V_H , или CDR, используемых в контексте антитела против с-Met, дает возможность антителу сохранить, по меньшей мере, существенную часть (по меньшей мере около 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или более) аффинности/авидности и/или специфичности/селективности родительского антитела и в некоторых случаях такое антитело против с-Met может быть ассоциировано с большей аффинностью, селективностью и/или специфичностью, чем родительское антитело.

Такие функциональные варианты, как правило, сохраняют существенную идентичность последовательности с родительским антителом. Процент идентичности между двумя последовательностями является функцией числа идентичных позиций в последовательностях (т.е. % гомологии = числу идентичных позиций/общее число позиций \times 100), принимая во внимание число пробелов и длину каждого пробела, которые должны вноситься для оптимального выравнивания двух последовательностей. Процент идентичности между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями, может быть определен, например, с помощью алгоритма E. Meyers and W. Miller, *Comput. Appl. Biosci* 4, 11-17 (1988), который включен в программу "ALIGN" (версия 2.0) с использованием таблицы масс остатков PAM120, с штрафом за удлинение пробела, равным 12, и штрафом за внесение пробела, равным 4. Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с помощью алгоритма Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48, 444-453 (1970).

Последовательность вариантов CDR может отличаться от последовательности CDR последовательностей родительских антител консервативными заменами; например, по меньшей мере 10, например по меньшей мере 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 из замен в варианте являются консервативными заменами аминокислотных остатков.

В контексте настоящего изобретения консервативные замены могут определяться с помощью замен внутри классов аминокислот, отраженных в следующей таблице:

Классы аминокислотных остатков для консервативных замен

Кислые остатки	Asp (D) и Glu (E)
Основные остатки	Lys (K), Arg (R), и His (H)
Гидрофильные незаряженные остатки	Ser (S), Thr (T), Asn (N), и Gln (Q)
Алифатические незаряженные остатки	Gly (G), Ala (A), Val (V), Leu (L), и Ile (I)
Неполярные незаряженные остатки	Cys (C), Met (M), и Pro (P)
Ароматические остатки	Phe (F), Tyr (Y), и Trp (W)

При использовании в данном документе, подразумевается, что термин "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") обозначает клетку, в которую вводится экспрессирующий вектор, например, экспрессирующий вектор, кодирующий антитело по изобретению. Рекомбинантные клетки-хозяева включают, например, трансфектомы, такие как клетки CHO, клетки HEK293, клетки NS/0 и лимфоцитарные клетки.

Термин "трансгенное животное, отличное от человека" обозначает животное, отличное от человека, имеющее геном, включающий один или несколько трансгенов тяжелой и/или легкой цепи человека или включающий трансхромосомы (как интегрированные, так и не интегрированные в естественную геномную ДНК животного), и который способен экспрессировать полностью человеческие антитела. Например, трансгенная мышь может иметь трансген человеческой легкой цепи и либо трансген человеческой тяжелой цепи, либо трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так что мышь продуцирует человеческие антитела против с-Met, при иммунизации антигеном с-Met и/или клетками, экспрессирующими с-Met. Трансген человеческой тяжелой цепи может быть интегрирован в хромосомную ДНК мыши, как в случае трансгенных мышей, например, мышей NuMAb, как например, мышей HCo7 или мышей HCo12, или трансген человеческой тяжелой цепи может поддерживаться внехромосомно, как в случае трансхромосомных мышей KM, как описано в WO 02/43478. Похожие мыши, имеющие большой набор человеческих генов AT, включают HCo7 и HCo20 (см., например, WO 2009097006). Такие трансгенные и трансхромосомные мыши (вместе обозначенные в данном документе как "трансгенные мыши") способны продуцировать множество изоформ человеческих моноклональных антител к данному антигену (таких как IgG, IgA, IgM, IgD и/или IgE), при рекомбинации V-D-J и переключении изоформ. Трансгенное животное, отличное от человека, также может использоваться для продуцирования антител против специфического антигена путем введения генов, кодирующих специфическое антитело, например, путем функционального связывания генов с геном, который экспрессируется в молоке животного.

"Лечение" обозначает введение эффективного количества терапевтически активного соединения по настоящему изобретению с целью облегчения, улучшения, купирования или устранения (излечения) симптомов болезненных состояний.

"Эффективное количество" обозначает количество, эффективное в такой дозировке и в течение таких периодов времени, которые необходимы для достижения целевого терапевтического результата. Терапевтически эффективное количество антитела против с-Met, может варьировать согласно таким факторам, как состояние заболевания, возраст, пол и масса индивидуума, а также способность антитела против с-Met, вызывать целевой ответ у индивидуума. Терапевтически эффективное количество также представляет собой такое количество, в котором терапевтически полезные эффекты превышают любые токсические или вредные эффекты антитела или части антитела.

"Идиотипическое" антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, как правило, ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела.

Дополнительные аспекты и воплощения изобретения

Как описано выше в первом аспекте, изобретение относится к моноклональному человеческому антителу, которое связывает человеческий с-Met.

Моноклональные антитела по настоящему изобретению могут быть получены гибридным методом, впервые описанным Kohler et al., Nature 256, 495 (1975), или могут быть получены с использованием методов рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также могут быть выделены из фаговой библиотеки антител с помощью методов, описанных например, в Clackson et al., Nature 352: 624-628 (1991) и в Marks et al., J. Mol. Biol. 222, 581-597 (1991). Моноклональные антитела могут быть получены из любого подходящего источника. Таким образом, моноклональные антитела могут быть получены из гибридом, приготовленных из мышиных В-клеток селезенки, полученных из мышей, иммунизированных с использованием антигена, представляющего интерес, например, в форме клеток, экспрессирующих на своей поверхности антиген, или в форме нуклеиновой кислоты, кодирующей антиген, представляющий интерес. Моноклональные антитела также могут быть получены из гибридом, выделенных из экспрессирующих антитело клеток иммунизированных людей или млекопитающих, отличных от человека, таких как крысы, собаки, приматы и т.д.

В одном воплощении антитело по изобретению является человеческим антителом. Человеческие моноклональные антитела, направленные против с-Met, могут быть получены с использованием транс-

генных или трансхромосомных мышей, несущих в большей степени части человеческой иммунной системы, а не мышинной. Такие трансгенные и трансхромосомные мыши включают мышей, обозначенных в данном документе как мыши HuMAb и мыши KM, соответственно, и вместе обозначаются в данном документе как "трансгенные мыши".

Мышь HuMAb содержит минилокус человеческих иммуноглобулиновых генов, который кодирует последовательности тяжелой цепи (μ и γ) и легкой цепи к иммуноглобулинов, вместе с направленными мутациями, которые инактивируют эндогенные локусы цепей μ и κ (Lonberg, N. et al., *Nature* 368, 856-859 (1994)). Соответственно, мыши демонстрируют пониженную экспрессию мышинного IgM или κ и, в ответ на иммунизацию, введенные человеческие трансгены тяжелой и легкой цепи подвергаются переключению класса и соматическим мутациям с образованием высокоаффинных человеческих моноклональных антител IgG κ (Lonberg, N. et al. (1994), выше; обзор в Lonberg, N. *Handbook of Experimental Pharmacology* 113, 49-101 (1994), Lonberg, N. and Huszar, D., *Intern. Rev. Immunol.* Vol. 13 65-93 (1995) и Harding, F. and Lonberg, N. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 764 536-546 (1995)). Получение мышей HuMAb подробно описано в Taylor, L. et al., *Nucleic Acids Research* 20, 6287-6295 (1992), Chen, J. et al., *International Immunology* 5, 647-656 (1993), Tuailon et al., *J. Immunol.* 152, 2912-2920 (1994), Taylor, L. et al., *International Immunology* 6, 579-591 (1994), Fishwild, D. et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). См., также US 5545806, US 5569825, US 5625126, US 5633425, US 5789650, US 5877397, US 5661016, US 5814318, US 5874299, US 5770429, US 5545807, WO 98/24884, WO 94/25585, WO 93/1227, WO 92/22645, WO 92/03918 и WO 01/09187.

Мыши HCo7 содержат нарушение JKD в своих эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), и нарушение CMD в своих эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 WO 01/14424), трансген KCo5 человеческой легкой цепи каппа (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), и трансген HCo7 человеческой тяжелой цепи (как описано в US 5770429).

Мыши HCo12 содержат нарушение JKD в своих эндогенных генах легкой цепи (каппа) (как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 821-830 (1993)), и нарушение CMD в своих эндогенных генах тяжелой цепи (как описано в примере 1 WO 01/14424), трансген KCo5 человеческой легкой цепи каппа (как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996)), и трансген HCo12 человеческой тяжелой цепи (как описано в примере 2 WO 01/14424).

В линии мышей KM гомозиготно нарушен эндогенный мышинный ген легкой цепи каппа, как описано в Chen et al., *EMBO J.* 12, 811-820 (1993), а также гомозиготно нарушен эндогенный мышинный ген тяжелой цепи, как описано в примере 1 WO 01/09187. Данная линия мышей несет трансген человеческой легкой цепи каппа, KCo5, как описано в Fishwild et al., *Nature Biotechnology* 14, 845-851 (1996). Данная линия мышей также несет трансхромосому человеческой тяжелой цепи, состоящую из фрагмента hCF (SC20) хромосомы 14, как описано в WO 02/43478.

Спленоциты из этих трансгенных мышей можно использовать для получения гибридом, которые секретируют человеческие моноклональные антитела, согласно известным методам.

Кроме того, человеческие антитела по настоящему изобретению или антитела по настоящему изобретению из других видов могут быть идентифицированы посредством методов дисплейного типа, включающих в частности фаговый дисплей, ретровирусный дисплей, рибосомный дисплей и другие методы, хорошо известный в данной области, и полученные в результате молекулы могут быть подвергнуты дополнительному созреванию, такому как созревание аффинности в качестве такого метода, хорошо известного в данной области (см., например, Noogenboom et al., *J. Mol. Biol.* 227, 381 (1991) (фаговый дисплей), Vaughan et al., *Nature Biotech* 14, 309 (1996) (фаговый дисплей), Hanes and Plutchau, *PNAS USA* 94, 4937-4942 (1997) (рибосомный дисплей), Parmley and Smith, *Gene* 73, 305-318 (1988) (фаговый дисплей), Scott *TIBS* 17, 241-245 (1992), Cwirla et al., *PNAS USA* 87, 6378-6382 (1990), Russel et al., *Nucl. Acids Research* 21, 1081-1085 (1993), Hogenboom et al., *Immunol. Reviews* 130, 43-68 (1992), CH1swell and McCafferty *TIBTECH* 10, 80-84 (1992), и US 5733743). Если для получения антител, которые не являются человеческими, применяются технологии дисплея, то такие антитела могут быть гуманизированы.

В одном воплощении антитело по изобретению относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE, или IgM.

В первом основном воплощении антитела по изобретению, антитело конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHis с иммобилизованным антителом, которое содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:37 (024), предпочтительно, где антитело конкурирует более чем за 50%, как, например, более чем за 75% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17.

В следующем воплощении, антитело не конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHis с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

- a) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 1, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 5 (005);
- b) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ

ID NO: 17, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 21 (008);

с) иммобилизованного антитела, содержащего область VH и область VL антитела 5D5, и

d) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 49, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 53 (045),

предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, как например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определениям, данным в примере 17.

В следующем воплощении антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из:

a) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 33, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 37 (024);

b) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 65, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 69 (061);

c) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 73, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 77 (062);

d) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 81, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 85 (064);

e) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 89, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 93 (068);

f) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 97, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 101 (069);

g) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 113, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 117 (098);

h) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 121, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 125 (101), и

i) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 129, и содержащего область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 133 (181).

В следующем воплощении антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в:

a) SEQ ID NO: 36 (024);

b) SEQ ID NO: 193, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO: 68, 76, 84 или 92 (061, 062, 064, 068);

c) SEQ ID NO: 196, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO: 100 или 132 (069, 181)

d) SEQ ID NO: 116 (098) или

e) SEQ ID NO: 201, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO: 124 (101).

В следующем воплощении антитело содержит:

a) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 34, 185 и 36, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 38, 39 и 206, как например, антитело, которое содержит область VH, включающую последовательности SEQ ID NO: 34, 35 и 36, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 38, 39 и 40, (024);

b) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 191, 192 и 193, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 78, 79 и 208, как например, антитело, включающее:

a) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 66, 67 и 68, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 70, 71 и 72, (061);

b) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 74, 75 и 76, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 78, 79 и 80, (062);

c) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 82, 83 и 84, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 86, 87 и 88, (064);

d) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 90, 91 и 92, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 94, 95 и 96, (068);

e) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 194, 195 и 196, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 209, 210 и 104, как например, антитело, включающее:

a) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 98, 99 и 100, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 102, 103 и 104, (069), или

b) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 130, 131 и 132, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 134, 135 и 136, (181),

d) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 197, 198 и 116, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 118, 119 и 211, как например, антитело, которое содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 114, 115 и 116, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 117, 118 и 120,

(098) или

е) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 199, 200 и 201 и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 126, 212 и 128, как например, антители, которое содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO:122, 123 и 124 и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 126, 127 и 128 (101).

В следующем воплощении антители содержат:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 33, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 37 (024);

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 61, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 69 (061);

с) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 73, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 77 (062);

д) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 81, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 85 (064);

е) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 89, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 93 (068);

ф) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 97, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 101 (069);

г) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 113, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 117 (098);

h) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 121, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 125 (101);

и) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:129, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 133 (181);

ж) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 159 и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 160 (078);

к) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 161, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 162 (084);

и) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 163, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 164 (063);

м) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 165, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 166 (087);

н) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 137, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 138 (066);

о) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 139, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 140 (065);

р) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 141, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 142 (082);

q) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 143, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 144 (089), или

г) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно содержит по большей мере 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, например консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В одном воплощении антители содержат область VH, включающую CDR3-последовательность SEQ ID NO: 100, и область VL, включающую CDR3-последовательность SEQ ID NO: 104 (069).

В одном воплощении антители содержат область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 98, 99 и 100, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 102, 103 и 104, (069).

В одном воплощении антители содержат область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO:101 (069).

В другом основном воплощении антители по изобретению:

конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHIs с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антители содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 13 (006), предпочтительно, где антители конкурирует более чем на 50%, как, например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17, и

не конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHIs с иммобилизованным антителом, содержащим область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:49, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 53 (045), предпочтительно, где антители конкурирует менее чем на 50%, например, менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17, и

связывает домен SEMA из -Met, предпочтительно, где антители способно ингибировать связывание

HGF с доменом SEMA с IC50, составляющей менее чем 10 мкг/мл, например менее чем 2 мкг/мл, как описано в примере 9.

В следующем воплощении антитело не конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHis с иммобилизованным антителом, содержащим область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 37 (024), предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17.

В следующем воплощении антитело связывает тот же эпитоп, что и антитело, выбранное из группы, состоящей из:

- a) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 1, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 5 (005);
- b) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 13 (006);
- c) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 25, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 29 (022), и
- d) антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 57, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 61 (058).

В следующем воплощении антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в:

- a) SEQ ID NO: 181, как например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO: 4 или 12 (005, 006);
- b) SEQ ID NO: 28 (022) или
- c) SEQ ID NO: 60 (058).

В следующем воплощении антитело содержит:

a) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 179, 180 и 181, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 6, 7 и 202, как например, антитело, содержащее:

- a) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 3, 4 и 3, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 6, 7 и 8, (005), или
- b) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 10, 11 и 12, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 14, 15 и 16, (006)
- b') область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 26, 184 и 28, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 30, 31 и 205, как например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 26, 27 и 28, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 30, 31 и 32 (62), или
- c) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 189, 190 и 60, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 62, 63 и 207, например, антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 58, 59 и 60, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 62, 63 и 64 (058).

В следующем воплощении, антитело содержит:

- a) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 1, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 5 (005);
- b) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 9, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 13 (006);
- c) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 25, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 29 (022);
- d) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 57, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 61 (058);
- e) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 145, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 146 (031);
- f) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 147, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 148 (007);
- g) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 149, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 150 (011);
- h) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 151, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 152 (017);
- i) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 153, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 154 (025), или
- j) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант содержит по большей мере 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно аминокислотные замены, например консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В другом основном воплощении антитело по изобретению

конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 49, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 53 (045), предпочтительно, где антитело конкурирует более чем на 50%, например, более чем на 75% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17, и

антитело не конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHis с иммобилизованным антителом, где указанное иммобилизованное антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 9, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 13 (006), предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, как например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определению, данному в примере 17.

В следующем воплощении антитело не конкурирует за связывание с растворимым сMetECDHis с антителом, выбранным из группы, состоящей из:

а) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 17, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 21(008), и

б) иммобилизованного антитела, содержащего область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 33, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 37 (024),

предпочтительно, где антитело конкурирует менее чем на 25%, например, менее чем на 20% с указанным иммобилизованным антителом, согласно определениям, данным в примере 17.

В следующем воплощении антитело связывается с тем же эпитопом, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 49, и включающее область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 53 (045).

В следующем воплощении антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 188, например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO: 52 (045).

В следующем воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 186, 187 и 188, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 54, 55 и 56, например антитело, содержащее область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 50, 51 и 52, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 54, 55 и 56, (045).

В следующем воплощении антитело содержит:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 49, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 53 (045);

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 155, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 156 (040);

в) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 157, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 158 (039), или

д) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно содержит по большей мере 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно аминокислотных замены, таких как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В следующем воплощении антитело связывается с доменом SEMA из с-Met, предпочтительно, если антитело способно ингибировать связывание HGF с доменом SEMA с IC50, составляющей менее чем 10 мкг/мл, например, менее чем 2 мкг/мл, как описано в примере 9.

В другом основном воплощении антитела по изобретению, антитело связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 17, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 21 (008), или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 41, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 45 (035), или связывает тот же эпитоп, что и антитело, содержащее область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 105, и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 109 (096).

В следующем воплощении антитело содержит область CDR3 из VH, имеющую последовательность, представленную в SEQ ID NO: 183, например, область CDR3 из VH, представленную в SEQ ID NO: 20, 44 или 108 (008, 035, 096).

В следующем воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 18, 182 и 183, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 22, 203 и 204, например антитело, содержащее:

а) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 18, 19 и 20, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 22, 23 и 24, (008),

б) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 42, 43 и 44, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 46, 47 и 48, (035),

в) область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 106, 107 и 108, и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3, SEQ ID NO: 110, 111 и 112, (096).

В другом воплощении антитело содержит:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 17, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 21 (008);

б) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 41, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 45 (035);

в) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 105, и предпочтительно область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 109 (096); или

д) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно содержит по большей мере 1, 2 или 3 аминокислотных модификации, более предпочтительно аминокислотных замены, таких как консервативные аминокислотные замены в указанных последовательностях.

В следующем воплощении антитело связывается с клетками A431 с EC50, составляющей 10 нМ или менее, как например, с EC50 равной 2 нМ или менее, предпочтительно, как определено согласно примеру 13.

В следующем воплощении, антитело связывается с с-Met с константой аффинности (K_D), составляющей 20 нМ или менее, например, 5 нМ или менее, предпочтительно, как определено согласно примеру 14.

В следующем воплощении антитело связывается с с-Met макаки-резус, предпочтительно, если сигнал связывания антитела с с-Met макаки-резус по меньшей мере в 5 раз превышает сигнал для антитела отрицательного контроля, как определено согласно примеру 15.

В следующем воплощении, антитело ингибирует связывание HGF с внеклеточным доменом с-Met, предпочтительно, если антитело ингибирует связывание более чем на 40%, как например, более чем на 50%, например, более чем на 60%, например, более чем на 70%, например, более чем на 80%, например, более чем на 90%, как определено согласно примеру 16.

Еще в одном воплощении, антитело способно ингибировать жизнеспособность клеток КР4, предпочтительно, если антитело способно ингибировать жизнеспособность более чем на 10%, например, более чем на 25%, например, более чем на 40%, предпочтительно, как описано в примере 19.

Форматы антител

В настоящем изобретении предлагаются антагонистические и неантагонистические антитела, связывающие с-Met. Поскольку некоторые антитела действуют антагонистически на клетки-мишени независимо от того, моновалентны они или бивалентны, для других антител при этом функциональный эффект зависит от валентности. Как представлено в примере 19 в данном документе, антитела 024, 062, 064, 068, 069, 098, 101, 181 (которые все находятся в одной и той же группе перекрестной блокировки, см. пример 17), например, демонстрируют антагонистические свойства в анализе жизнеспособности клеток КР4 независимо от их формата. Антитела 022 и 058, с другой стороны, ведут себя антагонистично в данном анализе в моновалентном формате, но агонистично (или, по меньшей мере, не антагонистично) в бивалентном формате. Таким образом, в зависимости от искомым функциональных свойств для конкретного использования, конкретные антитела могут быть выбраны из набора антител, предлагаемых в настоящем изобретении и/или их формат может быть адаптирован путем изменения валентности.

Более того, антитело изобретения может быть антителом любого изотипа. При выборе изотипа, как правило, будут руководствоваться искомыми эффекторными функциями, такими как индукция ADCC. Примерами изотипов являются IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Может быть использована одна из двух константных областей человеческой легкой цепи, каппа или лямбда. При необходимости класс антитела против с-Met настоящего изобретения может быть изменен известными способами. Например, антитело настоящего изобретения, которое изначально было IgM, может быть изменено на класс антитела IgG настоящего изобретения. Кроме того, методы изменения класса могут быть использованы для конвертации одного подкласса IgG в другой, например, с IgG1 на IgG2. Таким образом, эффекторные функции антител настоящего изобретения могут быть изменены при смене изотипа, например, на антитело IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgD, IgA, IgE или IgM для различных терапевтических применений. В одном воплощении антитело настоящего изобретения является антителом IgG1, например, IgG1,κ.

Отрицательная модуляция, индуцированная антагонистическими антителами, представляет собой механизм действия терапевтических антител против с-Met. Соответственно, в одном аспекте изобретения искомыми являются антитела с пониженными агонистическими свойствами, но с сохранившейся способностью индуцировать отрицательную модуляцию с-Met.

Было обнаружено, что при пониженной конформационной гибкости антител потенциальная остаточная агонистическая активность бивалентных IgG1 антител минимизирована.

Соответственно, в одном воплощении, антитело изобретения было модифицировано так, чтобы сделать его менее гибким, например, посредством мутаций в шарнирной области.

Наибольшие конформационные изменения являются результатом гибкости шарнира, благодаря которой доступен широкий диапазон углов Fab-Fc (Ollmann Saphire, E., R.L. Stanfield, M.D.M. Crispin, P.W.H.I. Parren, P.M. Rudd, R.A. Dwek, D.R. Burton and LA. Wilson. 2002. Contrasting IgG structures reveal extreme asymmetry and flexibility. *J. Mol. Biol.* 319: 9-18). Один из путей уменьшения гибкости Fab-плеча в иммуноглобулинах заключается в предотвращении образования дисульфидных связей между легкой и тяжелой цепью посредством генетической модификации. В естественном антителе IgG1 легкая цепь со-

единена с тяжелой цепью ковалентно через дисульфидную связь, соединяющую С-концевой цистеин легкой цепи с цистеином в позиции 220 (С220 EU нумерации) в шарнире Fc тяжелой цепи. Либо путем мутации аминокислоты С220 в серин либо любую другую естественную аминокислоту, либо удалением С220, либо путем полного удаления шарнира, либо путем замены шарнира IgG1 на шарнир IgG3, образуется молекула, в которой легкие цепи соединены через их С-концевые цистеины, аналогично ситуации, обнаруженной в человеческом изоците IgA2m(1). Это приводит к снижению гибкости Fab относительно Fc и, следовательно, уменьшает способность к перекрестному связыванию, как показано в примерах.

Другая стратегия уменьшения гибкости молекулы IgG1 заключается в замене шарнира IgG1 на шарнир IgG2 или IgG2-подобный шарнир (Dangl et al. EMBO J. 1988;7:1989-94). Данная шарнирная область имеет два свойства, отличные от свойств шарнира IgG1, которые, как считается, делают молекулу менее гибкой. Во-первых, по сравнению с шарниром IgG1 шарнир IgG2 на 3 аминокислоты короче. Во-вторых, шарнир IgG2 содержит дополнительный цистеин, таким образом, образуется три, вместо двух, дисульфидных мостика внутри тяжелой цепи. В ином случае, может быть введен вариант шарнира IgG1, который имеет сходство с шарниром IgG2. Этот мутант (ТН7А6-9) (WO2010063746) содержит мутацию Т223С и две делеции (K222 и Т225) для образования более короткого шарнира с дополнительным цистеином.

В следующем воплощении антитело изобретения является подтипом IgG1, в котором область шарнира была модифицирована путем:

- (i) удаления шарнирной области с последовательностью ЕРКСДКТНТСППСП и ее замены на шарнирную область IgG2 с последовательностью: ЕРКССВЕСППСП (IgG1 Шарнир-IgG2);
- (ii) удаления в положении 220, так чтобы модифицированная шарнирная область содержала последовательность ЕРКСДКТНТСППСП (IgG1 ΔС220);
- (iii) замены цистеина в положении 220 на любую другую естественную аминокислоту (X) так, чтобы модифицированная шарнирная область содержала последовательность ЕРКСХДКТНТСППСП (IgG1 С220Х);
- (iv) удаления шарнирной области с последовательностью ЕРКСДКТНТСППСП (UniBody IgG1);
- (v) удаления шарнирной области с последовательностью ЕРКСДКТНТСППСП и ее замены на шарнирную область IgG3 с последовательностью ЕЛКТПЛГДТНТСПРСПЕРКСДТППСПРСПЕРКСДТППСПРСПЕРКСДТППСП (IgG1 Шарнир-IgG3); или
- (vi) замены треонина в положении 223 на цистеин и удаления лизина в положении 222 и треонина в положении 225, так чтобы модифицированная шарнирная область содержала последовательность ЕРКСДСНСППСП (IgG1 ТН7Δ6-9).

В одном воплощении изобретения антитело изобретения имеет подтип IgG1, в котором область шарнира была модифицирована удалением в позиции 220 таким образом, чтобы модифицированная область шарнира имела последовательность ЕРКСДКТНТСППСП (IgG1 ΔС220) или заменой цистеина в позиции 220 на любую другую естественную аминокислоту (X), так чтобы модифицированная область шарнира имела последовательность ЕРКСХДКТНТСППСП (IgG1 С220Х);

В следующем воплощении антитело изобретения имеет подтип IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная область шарнира имела последовательность ЕРКСДКТНТСППСП (IgG1 С220S).

В следующем воплощении антитело изобретения имеет подтип IgG2.

В следующем воплощении в антителе изобретения модифицированы сахара для уменьшения количества фукозы и, таким образом, для усиления ADCC, например, путем добавления соединений в культуральную среду в ходе выработки антител, как описано в US 2009317869 или как описано в van Berkel et al. (2010) Biotechnol. Bioeng. 105:350 или с помощью нокаутных по FUT8 клеток, например, как описано в Yamane-Ohnuki et al. (2004) Biotechnol. Bioeng 87:614. В ином случае ADCC может быть оптимизировано с помощью способа, описанного Umana et al. (1999) Nature Biotech 17:176.

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую CDR3-последовательность, SEQ ID NO: 100, и область VL, включающую CDR3-последовательность, SEQ ID NO: 104 (069), подтипа IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность ЕРКСДКТНТСППСП (IgG1 С220S).

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 98, 99 и 100 и область VL, включающую последовательности CDR1, 2 и 3 SEQ ID NO: 102, 103 и 104 (069) подтипа IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность ЕРКСДКТНТСППСП (IgG1 С220S).

В одном воплощении антитело содержит область VH, включающую последовательность SEQ ID NO:97 и область VL, включающую последовательность SEQ ID NO: 101 (069) подтипа IgG1, в котором область шарнира была модифицирована заменой цистеина в позиции 220 на серин, так чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность ЕРКСДКТНТСППСП (IgG1 С220S).

В различных публикациях продемонстрирована корреляция между сниженным фукозилрованием кора и повышенной активностью ADCC *in vitro* (Shields RL. 2002 JBC; 277:26733-26740, Shinkawa T. 2003 JBC; 278(5):3466-3473, Umana P. Nat Biotechnol. 1999 Feb; 17(2): 176-80).

В следующем воплощении антитело изобретения было модифицировано для уменьшения фукозилрования кора ниже 10%, например, ниже 5%, что определяется с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии вместе с импульсным амперометрическим детектированием (HРАЕС-РАD). Данная проверка может быть осуществлена хорошо известными в предшествующем уровне техники способами, например, обработкой кифунаenziном или получением клеток, отрицательных по FUT8.

В другом воплощении антитело изобретения было сконструировано для усиления активации комплемента, например, как описано в Natsume et al. (2009) Cancer Sci. 100:2411.

В одном воплощении антитело изобретения является полноразмерным, предпочтительно антителом IgG1, в частности, антителом IgG1, κ. В другом воплощении антитело изобретения является фрагментом антитела или одноцепочечным антителом.

Фрагменты антител могут быть получены, например, фрагментацией обычными методами, и фрагменты подвергаются скринингу таким же образом, как описано в данном документе для целых антител. Например, фрагменты F(ab')₂ могут быть получены путем обработки антитела пепсином. Полученный фрагмент F(ab')₂ может быть обработан для уменьшения дисульфидных мостиков для получения фрагментов Fab'. Фрагменты Fab могут быть получены путем обработки антитела IgG папаином; Фрагменты Fab' могут быть получены расщеплением пепсином антитела IgG. Фрагмент F(ab') также может быть получен связыванием Fab', описанным ниже через тиоэфирную связь или дисульфидную связь. Фрагмент Fab' является фрагментом антитела, полученным расщеплением дисульфидной связи области шарнира F(ab')₂. Фрагмент Fab' может быть получен обработкой фрагмента F(ab')₂ восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол. Фрагмент антитела также может быть получен экспрессией нуклеиновых кислот, кодирующих такие фрагменты в рекомбинантных клетках (см., например, Evans et al., J. Immunol. Meth. 184, 123-38 (1995)). Например, химерный ген, кодирующий часть фрагмента F(ab')₂, может включать последовательности ДНК, кодирующие домен C_H1 и область шарнира Н-цепи, после которых следует кодон остановки трансляции с получением таким образом молекулы фрагмента укороченного антитела.

Как указано выше, в одном воплощении антитело изобретения против с-Met является бивалентным антителом.

В одном воплощении антитело изобретения против с-Met является моновалентным антителом.

В одном воплощении антитело изобретения является фрагментом Fab или одноплечевым антителом таким, как описанное в US 20080063641 (Genentech) или другим моновалентным антителом, например, таким, как описано в WO 2007048037 (Amgen).

В предпочтительном воплощении, моновалентное антитело имеет структуру, описанную в WO 2007059782 (Genmab) (который включен в данный документ ссылкой), имеющую делецию в области шарнира. Соответственно, в одном воплощении антитело является моновалентным антителом, где указанное антитело против с-Met сконструировано способом, включающим:

i) обеспечение нуклеотидного конструкта, кодирующего легкую цепь указанного моновалентного антитела, причем указанный конструкт содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую область VL выбранного антигенспецифического антитела против с-Met, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область (CL) Ig, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область VL выбранного антигенспецифического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область CL Ig, функционально связаны друг с другом, и где в случае подтипа IgG1, нуклеотидная последовательность кодирующая область CL, была модифицирована так, чтобы область CL не содержала аминокислот, способных образовывать дисульфидные связи или ковалентные связи с другими пептидами, содержащими идентичную области CL аминокислотную последовательность в присутствии поликлонального человеческого IgG или при введении животному или человеку;

ii) обеспечение нуклеотидного конструкта, кодирующего тяжелую цепь указанного моновалентного антитела, причем указанный конструкт содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую область VH выбранного антигенспецифического антитела, и нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область CH человеческого Ig, где нуклеотидная последовательность, кодирующая область CH модифицирована таким образом, чтобы область, соответствующая шарнирной области и, как требует подтип Ig, другие области CH, такие как область CH3, не содержала каких-либо аминокислотных остатков, которые принимают участие в образовании дисульфидных связей или ковалентных или устойчивых нековалентных межцепных связей тяжелой цепи с другими пептидами, содержащими аминокислотную последовательность идентичную константной области CH человеческого Ig, в присутствии поликлонального человеческого IgG или при введении человеческому существу, где указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область VH выбранного антигенспецифического антитела, и указанная нуклеотидная последовательность, кодирующая область CH указанного Ig, функционально связаны друг с другом;

iii) обеспечение клеточной экспрессирующей системы для получения указанного моновалентного

антитела;

iv) получение указанного моновалентного антитела коэкспрессией нуклеотидных конструкций (i) и (ii) в клетках клеточной экспрессирующей системы (iii).

Подобным образом, в одном воплощении антитело против с-Met является моновалентным антителом, которое содержит

(i) переменную область антитела изобретения, как описано в данном документе или антигенсвязывающую часть указанной области, и

(ii) область C_H иммуноглобулина или ее фрагмент, включающий участки C_H2 и C_H3, где область C_H или ее фрагмент модифицированы так, чтобы область, соответствующая шарнирному участку, и, если иммуноглобулин не относится к изотипу IgG4, другие участки C_H, такие как C_H3, не несли никаких аминокислотных остатков, которые были бы не способны образовывать дисульфидные связи с идентичным участком C_H или не способны образовывать другие ковалентные или стабильные нековалентные связи между тяжелыми цепями с идентичным участком C_H в присутствии поликлонального человеческого IgG.

В следующем воплощении тяжелая цепь моновалентного антитела против с-Met была модифицирована таким образом, чтобы цельный шарнир был удален.

В другом дополнительном воплощении, указанное моновалентное антитело является подтипом IgG4, но область C_H3 была модифицирована так, чтобы одна или несколько следующих аминокислотных замен были внесены:

Нумерация мутаций CH3

КАВАТ*	EU индекс G4*	Мутации
E378	E357	E357A или E357T или E357V или E357I
S387	S364	S364R или S364K
T389	T366	T366A или T366R или T366K или T366N
L391	L368	L368A или L368V или L368E или L368G или L368S или L368T
D427	D399	D399A или D399T или D399S F405A или F405L или F405T или F405D или F405R или F405Q
F436	F405	или F405K или F405Y
Y438	Y407	Y407A или Y407E или Y407Q или Y407K или Y407F
F436 и Y438	F405 и Y407	(F405T и Y407E) или (F405D и Y407E) (D399S и Y407Q) или (D399S и Y407K) или (D399S и Y407E)
D427 и Y438	D399 и Y407	

*КАВАТ указывает на нумерацию аминокислот согласно Kabat (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). EU индекс указывает на нумерацию аминокислот согласно EU индексу как изложено в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)).

В следующем воплощении последовательность указанного моновалентного антитела была модифицирована таким образом, чтобы оно не содержало каких-либо акцепторных сайтов для N-связанного гликозилирования.

Антитела изобретения против с-Met также включают одноцепочечные антитела. Одноцепочечные антитела являются пептидами, в которых области Fv тяжелой и легкой цепей соединены. В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается одноцепочечная Fv (scFv) в которой тяжелая и легкая цепи в Fv антитела против с-Met настоящего изобретения объединены с гибким пептидным линкером (как правило около 10, 12, 15 или большего количества аминокислотных остатков) в одноцепочечном пептиде. Способы получения таких антител описаны, например, в US 4946778, Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds. Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994), Bird et al., Science 242, 423-426 (1988), Huston et al., PNAS USA 5879, 5883-1988 (85) and McCafferty et al., Nature 348, 552-554 (1990). Одноцепочечное антитело может быть моновалентным, если используют один тип V_H и V_L, бивалентным если два типа V_H и V_L используют, или поливалентным, если используют больше двух типов V_H и V_L.

В одном воплощении антитело изобретения против с-Met является антителом с дефицитом эффекторной функции. В одном воплощении антитело против с-Met с дефицитом эффекторной функции является стабилизированным антителом IgG4, которое было модифицировано для предотвращения замены Fab-плеча (van der Neut Kofschoten et al. (2007) Science 317(5844): 1554-7). Примерами подходящих стабилизированных антител IgG4 являются антитела, в которых аргинин в положении 409 в константной области тяжелой цепи человеческого IgG4, который указан по индексу EU как и в Kabat et al., заменен на лизин, треонин, метионин или лейцин, предпочтительно лизин (описанный в WO2006033386 (Kirin)) и/или где область шарнира была модифицирована так, чтобы она содержала последовательность Cys-Pro-Cys.

В другом воплощении стабилизированное IgG4 антитело против с-Met является антителом, содержащим тяжелую и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит константную область человеческого IgG4, имеющую остаток, выбранный из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu в позиции, со-

ответствующей 409 и/или остаток выбирают из группы, состоящей из: Ala, Val, Gly, Ile и Leu в позиции, соответствующей 405, и где указанное антитело необязательно включает одну или несколько дополнительных замен, делеций и/или вставок, и где указанное антитело содержит последовательность Cys-Pro-Cys в области шарнира. Предпочтительно, если указанное антитело содержит остаток Lys или Ala в позиции, соответствующей 409 или область СНЗ антитела заменена на область СНЗ человеческого IgG1, или человеческого IgG2 или человеческого IgG3. См. также WO 2008145142 (Genmab).

В еще одном воплощении стабилизированное IgG4 антитело против с-Met является антителом, содержащим тяжелую и легкую цепь, где указанная тяжелая цепь содержит константную область человеческого IgG4, имеющую остаток, выбранный из группы, состоящей из Lys, Ala, Thr, Met и Leu в позиции, соответствующей 409 и/или остаток выбирают из группы, состоящей из Ala, Val, Gly, Ile и Leu в позиции, соответствующей 405, и где указанное антитело необязательно включает одну или несколько дополнительных замен, делеций и/или вставок и где указанное антитело содержит последовательность Cys-Pro-Cys в области шарнира. Предпочтительно, если указанное антитело содержит остаток Lys или Ala в позиции, соответствующей 409 или область СНЗ антитела заменена на область СНЗ человеческого IgG1, или человеческого IgG2 или человеческого IgG3.

В следующем воплощении антитело против с-Met с дефицитом эффекторной функции является антителом не IgG4 типа, например, IgG1, IgG2 или IgG3, которые были мутированы таким образом, чтобы способность опосредовать эффекторные функции, такие как ADCC, была снижена или даже устранена. Такие мутации описаны, например, у Dall'Acqua WF et al., *J Immunol.* 177(21:1129-1138 (2006) and Hezareh M, *J Virol.*; 75(24): 12161-12168(2001).

Конъюгаты

В следующем воплощении в настоящем изобретении предлагается антитело против с-Met, конъюгированное с терапевтической составляющей, такой как цитотоксин, химиотерапевтическое лекарственное средство, иммуносупрессант или радиоизотоп. Такие конъюгаты называются в данном документе "иммуноконъюгатами". Иммуноконъюгаты, которые включают один или большее количество цитотоксинов называются "иммунотоксинами".

Цитотоксин или цитотоксический агент включает любой агент, который отрицательно сказывается на клетках (например, убивает их). Подходящие терапевтические агенты для формирования иммуноконъюгатов настоящего изобретения, включают таксол, цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубин, даунорубин, дигидроксиантрацин-дион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромидин, антимаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарабин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин, кладрибин), алкилирующие агенты (такие, как мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфид, дибромоманнит, стрептозотозин, декарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин C, цисплатин и другие производные платины, такие как карбоплатин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее актиномицин), блеомицин, даунорубин (ранее дауномицин), доксорубин, идарубин, митрамицин, митомицин, митоксантрон, пликамицин, антрамицин (AMC)), токсин дифтерии и связанные с ними молекулы (такие как цепь дифтерии А и их активные фрагменты и гибридные молекулы), токсин рицин (например, рицин или дегликозилированная цепь А рицина), холерный токсин, шигатоксин-подобный токсин (SLT-I, SLT-II, SLT-III), LT токсин, С3 токсин, шигатоксин, коклюшный токсин, столбнячный токсин, соевый ингибитор протеазы Баумана-Бирка, экзотоксин *Pseudomonas*, алорин, сапорин, модецин, геланин, цепь абрина А, цепь моддецина, альфа-сарцин, белки *Aleurites fordii*, белки диантина, белки *Phytolacca americana* (PAPI, PAPII, и PAP-S), ингибитор *Momordica Charantia*, курцин, кротин, ингибитор *Saponaia officinalis*, гелонин, митогеллин, рестриктоцин, феномицин и эномицин. Другие подходящие конъюгированные молекулы включают рибонуклеазу (РНКазу), ДНКазу I, стафилококковый энтеротоксин-А, антивирусный белок лаконоса, дифтерийный токсин и эндотоксин псевдомонас. См., например, Pastan et al., *Cell* 47, 641 (1986) and Goldenberg, Calif. *A Cancer Journal for Clinicians* 44, 43 (1994). Терапевтические агенты, которые могут быть введены в комбинации с антителом настоящего изобретения против с-Met, как описано где либо еще в данном документе, также могут быть кандидатами для терапевтических составляющих, применимых при конъюгации антитела настоящего изобретения.

В другом воплощении антитело против с-Met изобретения включает конъюгированную нуклеиновую кислоту или молекулу, ассоциированную с нуклеиновой кислотой. В одном из таких аспектов настоящего изобретения конъюгированной нуклеиновой кислотой является цитотоксическая рибонуклеаза, антисмысловая нуклеиновая кислота, ингибирующая молекула РНК (например, молекула миРНК) или иммуностимулирующая нуклеиновая кислота (например, молекула ДНК, содержащая иммуностимулирующий CpG-мотив). В другом воплощении антитело против с-Met изобретения конъюгировано с аппаратом или рибозимом.

В одном воплощении предлагаются антитела против с-Met, содержащие одну или несколько радиоактивно меченных аминокислот. Радиоактивно меченное антитело против с-Met может быть использовано как в диагностических так и терапевтических целях (конъюгация с радиоактивно меченными молеку-

лами является другой возможной особенностью). Неограничивающие примеры меток для полипептидов включают 3H, 14C, 15N, 35S, 90Y, 99Tc и 125I, 131I и 186Re.

Антитела против с-Met также могут быть химически модифицированы ковалентной конъюгацией с полимером, например, для увеличения их периода полужизни в кровотоке. Примерные полимеры и способы прикрепления их к полипептидам, иллюстрированы например, в US 4766106, US 4179337, US 4495285 и US 4609546. Дополнительные полимеры включают полиоксиэтилированные полиолы и полиэтиленгликоль (ПЭГ) (например, ПЭГ с молекулярной массой от около 1000 до около 40 000, например, от около 2000 до около 20 000).

Для конъюгирования антитела против с-Met с конъюгируемой молекулой(ами), такой как те, что описаны выше, может быть использован любой способ, известный в данной области, включая способы, описанные Hunter et al., Nature 144, 945 (1962), David et al., Biochemistry 13, 1014 (1974), Pain et al., J. Immunol. Meth. 40, 219 (1981) and Nygren, J. Histochem. and Cytochem. 30, 407 (1982). Такие антитела могут быть получены химическим конъюгированием другой составляющей с N-концевой стороной или C-концевой стороной антитела против с-Met или его фрагмента (например, H- или L-цепи антитела против с-Met) (см., например, Antibody Engineering Handbook, edited by Osamu Kanemitsu, published by Chijin Shokan (1994)). Такие производные конъюгированного антитела могут быть получены конъюгацией внутренних остатков или Сахаров, где это необходимо. Агенты могут быть спарены либо напрямую, либо не напрямую с антителом против с-Met настоящего изобретения. Одним примером непрямого спаривания со вторым агентом является спаривание посредством спейсера. В одном воплощении, антитело против с-Met настоящего изобретения прикрепляется к хелатору-линкеру, например, тиукситану, который позволяет антителу быть конъюгированным с радиоизотопом.

Биспецифические антитела

В дополнительном аспекте, изобретение относится к биспецифической молекуле, содержащей первый антигенсвязывающий участок из антитела изобретения против с-Met, как описано в данном документе выше, и второй антигенсвязывающий участок, с различной связывающей специфичностью, такой как связывающая специфичность к человеческой эффекторной клетке, человеческому Fc-рецептору, T-клеточному рецептору, B-клеточному рецептору или связывающей специфичностью к неперекрывающемуся эпитопу с-Met, т.е. биспецифическому антителу в котором первый и второй антигенсвязывающие участки не конкурируют за связывание с с-Met, например, биспецифическое антитело, в котором первый и второй антигенсвязывающие участки не конкурируют за связывание с с-Met, например, при тестировании, описанном в примере 17.

Примерные молекулы биспецифических антител изобретения включают (i) два антитела, одно со специфичностью к с-Met, а второе со специфичностью ко второй мишени, которые конъюгированы вместе, (ii) одиночное антитело, которое имеет одну цепь или плечо, специфичное к с-Met, и вторую цепь или плечо, специфичное ко второй молекуле, и (iii) одноцепочечное антитело, которое имеет специфичность к с-Met и ко второй молекуле. В одном воплощении вторая молекула является антигеном злокачественного новообразования /опухолевым антигеном, таким как онкоэмбриональный антиген (CEA), простатоспецифический антиген (PSA), RAGE (почечный антиген), а-фетопротеин, CAMEL (CTL-распознаваемый антиген меланомы), CT антигены (такие как MAGE-B5, -B6, -C2, -C3 и D; Mage-12; CT10; NY-ESO-1, SSX-2, GAGE, BAGE, MAGE and SAGE), муциновые антигена (например, MUC1, муцин-CA125 и т.п.), ганглиозидные антигены, тирозиназы, gp75, С-мус, Marti, MelanA, MUM-1, MUM-2, MUM-3, HLA-B7, Ер-CAM или интегрин, ассоциированный с злокачественным новообразованием, такой как $\alpha\beta 3$ интегрин. В другом воплощении, вторая молекула является ангиогенным фактором или другим ассоциированным со злокачественными новообразованиями фактором роста, таким как фактор роста эндотелия сосудов, фактор роста фибробластов, эпидермальный фактор роста, ангиогенин или рецептор любого из них, особенно рецепторы, ассоциированные с прогрессией злокачественных новообразований (например, один из рецепторов HER1-HER4). В одном воплощении биспецифическое антитело настоящего изобретения является диателом.

Нуклеотидные последовательности, вектора и клетки-хозяева

В дополнительном аспекте изобретение относится к нуклеотидным последовательностям, таким как последовательности ДНК, кодирующим тяжелую и легкую цепи антитела изобретения.

В одном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 и 178.

В другом конкретном воплощении, последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VH, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 и 177.

В другом конкретном воплощении последовательность нуклеиновой кислоты кодирует аминокислотную последовательность VL выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53,

61, 69, 77, 85, 93, 101, 109, 117, 125, 133, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176 и 178.

В следующем аспекте изобретение относится к экспрессирующему вектору, или набору экспрессирующих векторов, кодирующих антитело по изобретению. Тяжелая или легкая цепь антитела может быть закодирована тем же самым вектором или другим вектором.

Такие экспрессирующие вектора могут быть использованы для рекомбинантного продуцирования антител изобретения.

В одном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 5, 9, 13, 17, 21, 25, 29, 33, 37, 41, 45, 49, 53, 57, 61, 65, 69, 73, 77, 81, 85, 89, 93, 97, 101, 105, 109, 113, 117, 121, 125, 129, 133, 137, 138, 139, 140, 141, 142, 143, 144, 145, 146, 147, 148, 149, 150, 151, 152, 153, 154, 155, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 165, 166, 167, 168, 169, 170, 171, 172, 173, 174, 175, 176, 177 и 178.

В другом конкретном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VH, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 1, 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65, 73, 81, 89, 97, 105, 113, 121, 129, 137, 139, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175 и 177.

В другом конкретном воплощении экспрессирующий вектор изобретения содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую одну или несколько аминокислотных последовательностей VL, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 5, 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69, 77, 85, 93, 101, 109, 117, 125, 133, 138, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176 и 178.

В следующем воплощении экспрессирующий вектор дополнительно включает нуклеотидную последовательность, кодирующую константную область легкой цепи, тяжелой цепи или и легкой, и тяжелой цепей антитела, например, человеческого антитела.

Экспрессирующий вектор в контексте настоящего изобретения может быть любым подходящим вектором, включая хромосомный, нехромосомный и синтетический нуклеотидный векторы (нуклеотидная последовательность, содержащая набор элементов контроля экспрессии). Примеры таких векторов включают производные SV40, бактериальные плазмиды, фаговую ДНК, бакуловирусы, дрожжевые плазмиды, векторы, полученные из комбинаций плазмид и фаговой ДНК, и векторы на основе вирусных нуклеиновых кислот (РНК или ДНК). В одном воплощении нуклеиновая кислота, кодирующая антитело против с-Met, содержит "голый" ДНК или РНК вектор, включая, например, линейный экспрессирующий элемент (как описано, например, у Sykes and Johnston, *Nat Biotech* 17, 355-59 (1997)), упакованный нуклеотидный вектор (как описано, например, в US 6077835 и/или WO 00/70087), плазмидный вектор, такой как pBR322, pUC 19/18, или pUC 118/119, нуклеотидный вектор минимального размера "midge" (как описано, например, в Schakowski et al., *Mol Ther* 3, 793-800 (2001)), или преципитированный нуклеотидный вектор-конструкт, например, конструкт, преципитированный CaPO₄ (как описано, например, в WO 00/46147, Benvenisty and Reshef, *PNAS USA* 83, 9551-55 (1986), Wigler et al., *Cell* 14, 725 (1978), и Corago and Pearson, *Somatic Cell Genetics* 7, 603 (1981)). Такие нуклеотидные векторы и их применения хорошо известны в данной области (см. например, US 5589466 и US 5973972).

В одном воплощении, вектор подходит для экспрессии антитела против с-Мус в бактериальной клетке. Примеры таких векторов включают экспрессирующие векторы, такие как BlueScript (Stratagene), векторы pIN (Van Heeke & Schuster, *J Biol Chem* 264, 5503-5509 (1989), векторы pET (Novagen, Мэдисон, Висконсин) и т.п.).

Экспрессирующий вектор также может или в ином случае является вектором, подходящим для экспрессии в дрожжевой системе. Может быть использован любой вектор, подходящий для экспрессии в дрожжевой системе. Подходящие вектора включают, без ограничения перечисленным, векторы, содержащие конститутивные или индуцибельные промоторы, такие как альфа-фактор, алкоголь оксидаза и PGH (рассмотренные в: F. Ausubel et al., ed. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987), и Grant et al., *Methods in Enzymol* 153, 516-544(1987)).

Экспрессирующий вектор также может быть или в ином случае является вектором, подходящих для экспрессии в клетках млекопитающих, например, вектор, содержащий глутаминсинтетазу в качестве селективного маркера, такой, как векторы описанные в (Bebington (1992) *Biotechnology (NY)* 10:169-175).

Нуклеиновая кислота и/или вектор также может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую последовательность секреции/локализации, которая может направлять полипептид, такой как растущая полипептидная цепь, в периплазматическое пространство или в клеточную культуральную среду. Такие последовательности известны в данной области и включают секреторный лидер или сигнальные пептиды.

В экспрессирующем векторе изобретения нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против с-Met, могут содержать или могут быть ассоциированы с любым подходящим промотором, энхансером и другими элементами облегчающими экспрессию. Примеры таких элементов включают промоторы для сильной экспрессии (например, человеческий CMV IE промотор/энхансер а также промоторы RSV,

SV40, SL3-3, MMTV и HIV LTR), эффективные последовательности терминации с полиА, и точки начала репликации для плазмидного продукта в *E. coli*, ген устойчивости к антибиотику в качестве селективного маркера, и/или обычный участок для клонирования (например, полилинкер). Нуклеиновые кислоты также могут содержать индуцируемый промотор, в отличие от конститутивного промотора, такого как CMV IE.

В одном воплощении экспрессирующий вектор, кодирующий антитело против с-Met, может быть расположен в и/или доставлен в клетку-хозяин или в животное-хозяин посредством вирусного вектора.

В дополнительном аспекте изобретение относится к рекомбинантной эукариотической или прокариотической клетке-хозяину, такой как трансфектома, которая продуцирует антитело изобретения, определенное в данном документе. Примеры клеток-хозяев включают дрожжевые, бактериальные клетки и клетки млекопитающих, такие как клетки CHO или НЕК. Например в одном воплощении в настоящем изобретении предлагается клетка, содержащая нуклеиновую кислоту, стабильно интегрированную в клеточный геном, который содержит кодирующую последовательность, экспрессирующую антитело против с-Met по настоящему изобретению. В другом воплощении в настоящем изобретении предлагается клетка, содержащая неинтегрированную нуклеиновую кислоту, такую как плазида, космида, фагемида или линейный экспрессирующий элемент, который содержит кодирующую последовательность, экспрессирующую антитело изобретения против с-Met.

В дополнительном аспекте изобретение относится к гибридоме, которая продуцирует антитело изобретения, определенное в данном документе. В еще одном дополнительном аспекте, изобретение относится к трансгенному животному, не являющемуся человеком, или растению, содержащему нуклеиновые кислоты, кодирующие человеческую тяжелую и легкую цепь, где животное или растение продуцируют антитело изобретения.

В дополнительном аспекте изобретение относится к способу получения антитела изобретения против с-Met, который включает стадии:

- a) культивирования гибридомы или клетки-хозяина по изобретению, как описано в данном документе выше, и
- b) очистки антитела изобретения из культуральной среды.

Композиции

В дополнительном главном аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей

антитело против с-Met, определенное в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может содержать одно антитело настоящего изобретения или комбинацию различных антител настоящего изобретения.

Фармацевтические композиции могут быть созданы в соответствии с обычными методами, такими как те, что описаны в Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th Edition, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, PA, 1995. Фармацевтическая композиция настоящего изобретения может, например, включать разбавители, наполнители, соли, буферы, детергенты (например, неионный детергент, такой как Tween-20 или Tween-80), стабилизаторы (например, сахара или безбелковые аминокислоты), консерванты, фиксаторы тканей, солюбилизаторы, и/или другие материалы, подходящие для включения в фармацевтическую композицию.

Фармацевтически приемлемые носители включают любой и все подходящие растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные и антигрибковые агенты, изотонические агенты, антиоксиданты и замедляющие абсорбцию агенты, и т.п., которые физиологически совместимы с соединением настоящего изобретения. Примеры подходящих водных и неводных носителей, которые могут быть использованы в фармацевтических композициях по изобретению, включают воду, солевой раствор, фосфатно-буферный солевой раствор, этанол, декстрозу, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.), и их подходящие смеси, растительные масла, коллоидальные растворы карбоксиметилцеллюлозы, трагакантовую камедь, и инъекционные органические эфиры, такие как этилолеат, и/или различные буферы. Фармацевтически приемлемые носители включают стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления стерильных инъеклируемых растворов или дисперсий для немедленного приема. Правильная текучесть может поддерживаться, например, при применении покрывающих материалов, таких как лецитин, путем поддержания требуемого размера частиц в случае дисперсий, и с помощью использования ПАВ.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать фармацевтически приемлемые антиоксиданты, например, (1) водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия, сульфит натрия и т.п.; (2) маслорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилоксианизол, бутилокситолуол, лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; и (3) хелатирующие металлы агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать изотонические агенты, такие как сахара, полиспирты, такие как маннит, сорбит, глицерин или хлорид натрия в компози-

циях.

Фармацевтические композиции настоящего изобретения также могут содержать один или несколько адьювантов, подходящих для выбранного пути введения, такие как консерванты, увлажняющие агенты, эмульгирующие агенты, диспергирующие агенты, консерванты или буферы, которые могут усилить срок хранения или эффективность фармацевтической композиции. Соединения могут быть приготовлены с носителями, которые будут предохранять соединение от быстрого высвобождения, такие как состав с контролируемым высвобождением, включая импланты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы доставки. Такие носители могут включать желатин, глицерилмоностеарат, глицерилдистеарат, биodeградируемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевую кислоту, коллаген, полиортоэфир и полимолочную кислоту отдельно или с воском, или другими материалами, хорошо известными в данной области. Способы приготовления таких составов запатентованы или хорошо известны специалистам в данной области.

Стерильные инъекционные растворы могут быть приготовлены путем включения активного соединения в необходимом количестве в соответствующий растворитель с одним или с комбинацией ингредиентов, перечисленных выше, по мере необходимости, с последующей стерилизацией микрофильтрацией. В общем, дисперсии готовят путем введения активного соединения в стерильный носитель, который содержит основную дисперсную среду и другие требуемые ингредиенты из тех, что перечислены выше. В случае стерильных порошков для приготовления стерильных инъекционных растворов, примерами способов приготовления являются вакуумная сушка и сублимационная сушка (лиофилизация), которые дают порошок активного ингредиента плюс любой дополнительный требуемый ингредиент из его предварительно стерильно фильтрованного раствора.

Фактические уровни доз активных ингредиентов в фармацевтических композициях могут варьировать для того чтобы количество активного ингредиента являлось эффективным для достижения требуемого терапевтического ответа для конкретного пациента, композиции и режима введения, без оказания токсичного воздействия на пациента. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от целого ряда фармакокинетических факторов, включая активность определенных композиций, используемых настоящим изобретением, или их амида, путь введения, время введения, скорость выведения определенного используемого соединения, длительность лечения, другие лекарственные средства, соединения и/или материалы, используемые в комбинации с конкретными используемыми композициями, возраст, пол, массу, состояние, общий уровень здоровья и предыдущую историю болезни подвергаемого лечению пациента и т.п. факторы, хорошо известные в медицине.

Фармацевтическая композиция может быть введена любым подходящим путем или способом. В одном воплощении фармацевтическая композиция настоящего изобретения вводится парентерально. Словосочетание "вводить парентерально" используемое в данном документе, означает режимы введения отличные от энтерального или местного введения, обычно инъекцией, и включает, без ограничения перечисленным, эпидермальную, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутритрахеальную, внутрикапсулярную, внутриорбитальную, внутрикардиальную, внутрикожную, внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, внутриспинальную, эпидуральную и надчрепную инъекцию или инфузию.

В одном воплощении фармацевтическую композицию вводят внутривенной или подкожной инъекцией или инфузией.

Применения

В дополнительном главном аспекте изобретение относится к антителу изобретения против с-Met для применения в качестве лекарственного средства.

Антитела изобретения против с-Met могут быть использованы в нескольких целях. Конкретно, антитела по изобретению могут быть использованы для лечения различных форм злокачественных новообразований, включая метастатические злокачественные новообразования и невосприимчивые к лечению злокачественные новообразования. Такие злокачественные опухоли могут быть HGF-зависимыми или HGF-независимыми.

В одном воплощении антитела изобретения против с-Met используют при лечении формы злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака груди, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака печени, рака легкого (такого как немелкоклеточный рак легкого (NSCLC)), рака носоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака предстательной железы, рака щитовидной железы.

В другом воплощении антитела изобретения против с-Met используют при лечении формы злокачественного новообразования, выбранной из группы, состоящей из остеосаркомы, рабдомиосаркомы и синовиальной саркомы.

В другом воплощении антитела изобретения против с-Met используют при лечении формы злокачественного новообразования, выбранной из группы, состоящей из саркомы Капоши, лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы и фибросаркомы.

В другом воплощении антитела изобретения против с-Met используют при лечении гематопозитиче-

ских злокачественных опухолей, например злокачественных опухолей, выбранных из группы, состоящей из острого миелогенного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы и множественной миеломы.

В дополнительном воплощении антитела изобретения против с-Met используют при лечении неоплазий, выбранных из группы, состоящей из глиобластомы, астроцитомы, меланомы, мезотелиомы и опухоли Вилмса.

В дополнительном воплощении антитела изобретения против с-Met используют при лечении МiТ-опухолей, включающих светлоклеточную саркому (CCS), альвеолярную саркому мягких тканей (ASPS) и ассоциированную с транслокацией почечноклеточную карциному.

В другом воплощении агонистические антитела изобретения против с-Met используют для регуляции выработки цитокинов и индукции мобилизации эндотелиальных клеток-предшественников, например у пациентов с ишемической болезнью сердца (Yang et al. (2009) Clin Exp Pharmacol Physiol. 36:790).

В другом воплощении агонистические антитела изобретения против с-Met используют для ингибирования или улучшения состояния при хронической почечной недостаточности (Mizuno et al. (2008) Front Biosci. 13:7072).

Аналогично, изобретение относится к способу ингибирования роста и/или пролиферации опухолевой клетки, экспрессирующей с-Met, причем способ включает введение нуждающемуся в этом индивидууму эффективного количества антитела по изобретению.

В одно воплощение указанная опухолевая клетка вовлечена в виде злокачественного новообразования, выбранного из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака груди, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака печени, рака легкого, рака носоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, синовиальной саркомы, саркомы Капоши, лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитоксантомы, фибросаркомы, острого миелогенного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, глиобластомы, астроцитомы, меланомы, мезотелиомы, опухоли Вилмса.

Также изобретение относится к применению моноклонального антитела, которое связывает человеческий с-Met, для приготовления лекарственного средства для лечения злокачественного новообразования, такого как одно из конкретных проявлений злокачественных новообразований, упомянутых выше.

В одном воплощении отбор пациентов для лечения с использованием антитела против с-Met, основан на уровне (сверх)экспрессии с-Met и/или HGF на соответствующих опухолевых клетках указанных пациентов.

В следующем воплощении способов лечения по настоящему изобретению, эффективность лечения отслеживается в процессе терапии, например в определенные моменты времени путем определения уровня экспрессии с-Met на соответствующих опухолевых клетках.

Режимы дозировки в вышеуказанных способах лечения и применениях корректируются для обеспечения оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, может быть введен одиночный болюс, могут быть введены несколько доз в течение периода времени или дозы могут быть пропорционально уменьшены или увеличены в зависимости от потребностей терапевтической ситуации. Парентеральные композиции могут быть составлены в виде единичной лекарственной формы для легкого введения и единообразия доз.

Эффективные дозировки и режимы дозировки для антител против с-Met зависят от заболевания или состояния подвергаемого лечению, или могут определяться специалистом в данной области. Типичный неограничивающий интервал для терапевтически эффективного количества соединения по настоящему изобретению составляет около 0,1-100 мг/кг, например около 0,1-50 мг/кг, например около 0,1-20 мг/кг, как например, около 0,1-10 мг/кг, например около 0,5, около 0,3, около 1, около 3, около 5, или около 8 мг/кг.

Врач или ветеринар, являющийся специалистом в данной области, может легко определить и прописать требуемое эффективное количество терапевтической композиции. Например, врач или ветеринар может начать с дозировки антитела против с-Met в фармацевтической композиции на уровне ниже, чем требуется для достижения требуемого терапевтического эффекта, с постепенным увеличением дозировки до достижения целевого эффекта. Вообще, подходящая суточная доза композиции по настоящему изобретению будет представлять собой такое количество соединения, которое составляет самую низкую дозу, эффективную для получения терапевтического эффекта. Введение может быть парентеральным, таким как внутривенное, внутримышечное или подкожное введение. В одном воплощении антитела против с-Met могут вводиться путем инфузии с еженедельной дозировкой от 10 до 500 мг/м², как например, от 200 до 400 мг/м². Такое введение может повторяться, например, 1-8 раз, например, 3-5 раз. Введение может осуществляться путем непрерывной инфузии в течение периода от 2 до 24 ч, например от 2 до 12 ч. В одном воплощении антитела против с-Met могут быть введены медленной непрерывной инфузией в течение длительного периода, например, более чем за 24 ч, с целью уменьшения токсических побочных эффектов.

В одном воплощении, антитела против с-Met, могут быть введены с еженедельной дозировкой от 250 до 2000 мг, как например, 500 мг, 700 мг, 1000 мг, 1500 мг, 2000 мг или 300 мг, в течение до 8 раз, например от 4 до 6 раз. Такой режим может повторяться один или более раз по необходимости, например, через 6 или 12 месяцев. Дозировка может быть определена или урегулирована путем измерения количества соединения по настоящему изобретению в крови при введении путем, например, забора биологического образца и использования антиидиотипических антител, мишенью которых является антиген-связывающая область антител изобретения против с-Met.

В одном воплощении антитела против с-Met могут быть введены поддерживающей терапией, например, один раз в неделю в течение 6 месяцев или больше.

Антитела против с-Met также могут быть введены профилактически для уменьшения риска развития злокачественного новообразования, задержки наступления события в прогрессии злокачественного новообразования, и/или уменьшения риска рецидива при ремиссии злокачественного новообразования.

Антитела против с-Met также могут быть введены в комбинаторной терапии, т.е. комбинации с другими терапевтическими агентами, релевантными заболеванию или состоянию, подвергаемому лечению. Соответственно, в одном воплощении антитело-содержащее лекарственное средство находится в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, например, цитотоксическим, химиотерапевтическим или антиангиогенным агентом.

Такое объединенное введение может быть одновременным, отдельным или последовательным. Для одновременного введения агенты могут быть введены в виде одной композиции или в виде отдельных композиций, по необходимости. В настоящем изобретении, таким образом, предлагаются способы лечения заболевания, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, как описано выше, где способы включают введение антитела против с-Met по настоящему изобретению, объединенного с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, как описано ниже.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения расстройства, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, в объекте, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента нуждающегося в этом объекту.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения или профилактики злокачественного новообразования, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента нуждающегося в этом объекту.

В одном воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из антимагмента, такого как метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, декарабин, гидроксимочевина, аспарагиназа, гемцитабин или кладрибин.

В другом воплощении, такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из алкилирующего агента, такого как мехлореамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфат, дибромомантин, стрептозотозин, декарабин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цисплатин и других платиновых производных, таких как карбоплатин.

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из антимитотического агента, такого как таксаны, например доксетаксель и паклитаксель, и алколоиды барвинка, например, виндезин, викристин, винбластин и винорелбин.

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из ингибиторов топоизомераз, такого как топотекан или иринотекан, или цитостатического лекарственного средства, такого как эпозид и тенипозид.

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из ингибиторов фактора роста, такого как ингибитор ErbB1 (EGFR) (такой как антитело против EGFR, например, залутумумаб, цетуксимаб, панитумумаб или нимотузумаб или другие ингибиторы EGFR, такие как gefitinib или erlotinib), ингибитор ErbB2 (Her2/neu) (такой как антитело против HER2, например, трастузумаб, трастузумаб DM1 или пертузумаб) или ингибитор как EGFR, так и HER2, такой как лапатиниб).

В другом воплощении такой дополнительный терапевтический агент может быть выбран из ингибитора тирозинкиназы, такого как иматиниб (Glivec, Gleevec STI571) или лапатиниб, PTK787/ZK222584.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения расстройства, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, в объекте, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и, по меньшей мере, одного ингибитора ангиогенеза, неоваскуляризации и/или другой васкуляризации, нуждающегося в этом объекту.

Примерами таких ингибиторов ангиогенеза являются ингибиторы урокиназы, ингибиторы матриксных металлопротеаз (такие как маримастат, Неовастат, BAY 12-9566, А. Г. 3340, BMS-275291 и т.п.), ингибиторы миграции и пролиферации эндотелиальных клеток (такие, как TNP-470, скваламин, 2-метоксистеррадиол, комбретагастатин, эндостатин, ангиостатин, пеницилламин, SCH66336 (Schering-Plough Corp, Меэдисон, Нью-Джерси), R115777 (Янссен Фармацевтика, Inc, Титусвилль, Нью-Джерси) и

подобные агенты), антагонисты ангиогенных факторов роста (например, такие как ZD6474, SU6668, антитела против ангиогенных агентов и/или их рецепторов (такие как VEGF (например, бевацизумаб), bFGF, и ангиопоэтин-1), талидомид, аналоги талидомида (например, CC-5013), 5416 Sugen, SU5402, антиангиогенный рибозим (например, ангиозим), интерферон (например, интерферон $\alpha 2a$), сурамин и т.п.), ингибиторы киназы VEGF-R и других антиангиогенных тирозинкиназ (например, SU 011248), ингибиторы специфичного для эндотелия интегрин/сигнальных путей выживания (такие как витаксин и подобные агенты), антагонисты/хелаторы меди (например, тетраиомолибдат, каптоприл и т.п.), карбоксиамидотриазол (CAI), АВТ-627, СМ101, интерлейкин-12 (IL-12), IM862, PNU145156E, а также нуклеотидные молекулы, ингибирующие ангиогенез (например, антисмысловая-VEGF-кДНК, кДНК, кодирующая ангиостатин, кДНК, кодирующая p53 и кДНК, кодирующая дефектный рецептор VEGF -2).

Другими примерами таких ингибиторов ангиогенеза, неоваскуляризации, и/или другой васкуляризации являются производные антиангиогенного гепарина (например, гепариназа III), темозоломид, NK4, фактор ингибирования миграции макрофагов, ингибиторы циклооксигеназы-2, ингибиторы индуцируемого гипоксией фактора 1, антиангиогенные изофлавоны сои, олтипраз, фумагиллин и его аналоги, аналоги соматостатина, пентозанполисульфат, текогалан натрия, дальтепарин, тумстатин, тромбоспондин, NM-3, комбрестатин, канстатин, авастатин, антитела против других целей, таких антитела против альфа-V/бета-3 интегрин и антитела против кинитостатина.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть иммуногеном против злокачественного новообразования, таким как антиген злокачественного новообразования/опухоль-ассоциированный антиген (например, молекулы адгезии эпителиальных клеток (EPCAM/TACSTD1), муцин 1 (MUC1), онкоэмбриональный антиген (ОЭА), ассоциированный с опухолями гликопротеин 72 (TAG-72), gp100, Melan-A, MART-1, KDR, RCAS1, MDA7, вакцины против вирусов, ассоциированных со злокачественными новообразованиями (например, вакцины против вируса папилломы человека) или опухолевые белки теплового шока.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть противоопухолевым цитокином, хемокином, или их комбинацией. Примеры, подходящих цитокинов и факторов роста включают $IFN\gamma$, IL-2, IL-4, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-23, IL-24, IL-27, IL-28a, IL-28b, IL-29, KGF, $IFN\alpha$ (например, $IFN\alpha 2b$), $IFN\beta$, GM-CSF, CD40L, лиганд Flt3, фактор стволовых клеток, анцестим и $TNF\alpha$. Подходящие хемокины могут включать Glu-Leu-Arg (ELR)-отрицательные хемокины, такие как IP-10, MCP-3, MIG и SDF-1a из семейств человеческих хемокинов CXС и С-С. Подходящие цитокины включают производные цитокинов, варианты цитокинов, фрагменты цитокинов и химерные белки на основе цитокинов.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть регулятором контроля клеточного цикла/апоптоза (или "регулирующим агентом"). Регулятор контроля клеточного цикла/апоптоза может включать молекулы, которые направляют и модулируют регуляторы контроля клеточного цикла/апоптоза такие как (i) cdc-25 (например, NSC 663284), (ii) циклинзависимые киназы, которые сверхстимулируют клеточный цикл (например, флавопиридол (L868275, HMR1275), 7-гидроксиستاурспорин (UCN-01, KW-2401) и росковитин (R-росковитин, SYC202)) и (iii) модуляторы теломеразы (например, BIBR1532, SOT-095, GRN163 и композиции описанные, например, в US 6440735 и US 6713055). Неограничивающие примеры молекул, которые интерферируют с апоптотическими сигнальными путями, включают апоптоз-индуцирующий лиганд, родственный TNF (TRAIL)/лиганд 2 апоптоза (Apo-2L), антитела, которые активируют рецепторы TRAIL, IFN, и антисмысловую Bcl-2.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть гормональным регулирующим агентом, таким как агенты, применимые в антиандрогенной и антиэстрогенной терапии. Примерами таких гормональных регулирующих агентов являются тамоксифен, идоксифен, фулвестрант, дролоксифен, торемифен, ралоксифен, диэтилстильбестрол, этинилэстрадиол/эстинил, антиандроген (такой, как флутаминд/эулексин), прогестин (например, таких как гидроксипрогестерона капроат, медроксипрогестерон/ровера, мегестрол ацепат/мегэйс), адренкортикостероид (например, гидрокортизон, преднизолон), рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (и его аналоги и других агонисты ЛГРГ, таких как бусерелин и гозерелин), ингибитор ароматазы (например, анастразола/аримидекс, аминоглутетимид/цитраден, экземестан) или гормональный ингибитор (например, октреотид/сандостатин).

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечения расстройств, описанных выше, может быть любым антианергическим агентом, например, соединениями, которые являются молекулами, блокирующими активность CTLA-4, например, может быть ипилимумабом.

В одном воплощении терапевтический агент для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, может быть противоопухолевой нуклеиновой кислотой

или противоопухолевой ингибирующей молекулой РНК.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые могут быть применимы в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются агенты, индуцирующие дифференцировку, аналоги ретиноевой кислоты (такие как все из числа транс-ретиноевой кислоты, 13-цис-ретиноевой кислоты и похожих агентов), аналоги витамина D (такие как сеокальцитол и похожие агенты), ингибиторы ErbB3, ErbB4, IGF-IR, рецепторов инсулина, PDGFR α , PDGFR β , Flk/2, Flt4, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, TRKA, TRKC, RON (например, антитело против RON), Sea, Tie, Tie2, Eph, Ret, Ros, Alk, LTK, PTK7 и похожие агенты.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые можно применять в качестве терапевтических агентов в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются эстрамустин и эпирубицин.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые можно применять в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются ингибитор HSP90, такой как 17-аллиламиногелдамицин, антитела против опухолевого антигена, такого как PSA, CA125, KSA, интегрин, например интегрин β 1, или ингибиторы VCAM.

Примерами других противоопухолевых агентов, которые можно применять в качестве терапевтических агентов для применения в комбинации с антителом против с-Met при лечении расстройств, описанных выше, являются ингибиторы кальциневрина (такие как валсподар, PSC 833 и другие ингибиторы MDR-1 или р-гликопротеина), ингибиторы TOR (такие как сиролимус, еверлимус и рапамицин), и ингибиторы механизма "хоминга лимфоцитов" (такие как FTY720), и агенты, оказывающие воздействие на клеточные сигнальные пути, такие как ингибиторы молекул адгезии (например, анти-LFA).

В одном воплощении антитело изобретения против с-Met предназначено для применения в комбинации с одним или несколькими другими терапевтическими антителами, такими как офатумумаб, занолумумаб, даратумумаб, ранибизумаб, зенапакс, Симулект, Ремикад, Химура, Тусабри, Ксолаир, Раптивиа и/или ритуксимаб.

Другими терапевтическими антителами, которые могут быть использованы в комбинации с антителом настоящего изобретения, являются антитела против с-Met, которые связывают другие области с-Met, такие как антитела описанные в WO 2005016382, WO 2006015371, WO 2007090807, WO 2007126799 или WO 2009007427 (все включены в данный документ ссылкой).

В другом воплощении при лечении заболевания используют комбинацию двух или нескольких различных антител изобретения, описанных в данном документе. Особенно интересные комбинации включают два или большее количество неконкурирующих антител. Такая комбинационная терапия может приводить к связыванию повышенного количества молекул антител на клетку, что может увеличить эффективность через активацию комплемент-опосредованного лизиса.

В дополнение к вышеуказанному, другие воплощения комбинационных терапий изобретения включают следующее:

При лечении немелкоклеточного рака легкого применяют антитело против с-Met в комбинации с ингибиторами EGFR, такими как антитело против EGFR, например, залутумумаб, цетуксимаб, панитумумаб или нимотузумаб, или другими ингибиторами EGFR, такими как гефитиниб или ерлотиниб) или в комбинации с ингибитором ErbB2 (Her2/neu) (таким как антитело против HER2, например, трастузумаб, трастузумаб-DM1 или пертузумаб) или в комбинации с ингибитором как EGFR так и HER2, таким как лапатиниб, или в комбинации с ингибитором HER3.

При лечении глиомы применяют антитело против с-Met в комбинации с темозоломидом или ингибитором ангиогенеза, таким как бевацизумаб.

При лечении колоректального рака применяют антитело против с-Met в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из: гемцитабина, бевацизумаба, фолфокса, фолфири, кселокса, IFL, оксалиплатина, иринотекана, 5-FU/LV, капецитабина, UFT, нацеливающих на EGFR агентов, таких как цетуксимаб, панитумумаб, залутумумаб; ингибиторов VEGF или ингибиторов тирозинкиназ, таких как сунитиниб.

При лечении рака предстательной железы применяют антитело против с-Met в комбинации с одним или несколькими соединениями, выбранными из: гормональной/антигормональной терапии; например, антиандрогенов, агонистов рилизинг-фактор лютеинизирующего гормона (LHRH), и химиотерапевтических веществ, таких как таксаны, митоксантрон, эстрамустин, 5FU, винбластин, иксабепилон.

Лучевая терапия - хирургия

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения расстройства, в которое вовлечены клетки, экспрессирующие с-Met, в объекте, где способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению и по меньшей мере одного дополнительного терапевтического агента, нуждающемуся в этом объекту.

В другом воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования, причем способ включает введение терапевтически эффективного количества антитела против с-Met по настоящему изобретению, и применение лучевой терапии у нуж-

дающегося в этом объекта.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается применение антитела против с-Met по настоящему изобретению для приготовления фармацевтической композиции для лечения злокачественного новообразования путем введения антитела в комбинации с лучевой терапией.

Лучевая терапия может включать облучение или ассоциированное введение пациенту радиофармацевтических веществ. Источник излучения может быть как внешним, так и внутренним по отношению к пациенту, подвергаемому обработке (лучевая обработка может, например, быть в форме внешней направленной лучевой терапии (EBRT) или в форме брахотерапии (BT)). Радиоактивные элементы, которые могут использоваться при практическом осуществлении таких методов, включают, например, цезий-137, иридий-192, америций-241, золото-198, кобальт-57, медь-67, технеций-99, иодид-123, иодид-131, и индий-111.

В следующем воплощении в настоящем изобретении предлагается способ лечения или предотвращения злокачественного новообразования, причем способ включает введение нуждающемуся в этом объекту терапевтически эффективного количества антитела против с-Met, такого как антитело против с-Met по настоящему изобретению в комбинации с хирургической операцией.

Диагностические применения

Антитела изобретения против с-Met также могут быть использованы для диагностических целей. Таким образом, в следующем аспекте изобретение относится к диагностической композиции, включающей антитело против с-Met, определенное выше.

В одном воплощении, антитела против с-Met по настоящему изобретению могут использоваться *in vivo* или *in vitro* для диагностики заболеваний, в которых активированные клетки, экспрессирующие с-Met, играют активную роль в патогенезе, путем определения уровня с-Met, или уровня клеток, которые содержат с-Met на своей мембранной поверхности. Этого можно достичь, например, путем контакта тестируемого образца необязательно вместе с контрольным образцом, с антителом против с-Met в условиях, которые дают возможность образования комплекса между антителом и с-Met.

Таким образом, в следующем аспекте, изобретение относится к способу обнаружения наличия антигена с-Met или клетки, экспрессирующей с-Met, в образце, включающему контакт образца с антителом в условиях, которые дают возможность образования комплекса между антителом и с-Met; и анализ образования комплекса.

В одном воплощении, способ осуществляют *in vitro*.

Более конкретно, в настоящем изобретении предлагаются способы идентификации и диагностики инвазивных клеток и тканей и других клеток, на которые направлены антитела против с-Met по настоящему изобретению, и способы мониторинга прогресса терапевтического лечения, состояния после лечения, риска развития злокачественного новообразования, прогрессии злокачественного новообразования и т.п.

Подходящие метки для антитела против с-Met, и/или для вторичных антител, используемые в таких методах, хорошо известны в данной области.

В дополнительном аспекте изобретение относится к набору реактивов для обнаружения наличия антигена с-Met или клетки, экспрессирующей с-Met, в образце, который содержит антитело изобретения против с-Met или биспецифичную молекулу по изобретению и инструкции по применению набора реактивов.

В одном воплощении в настоящем изобретении предлагается набор для диагностики злокачественного новообразования, содержащий контейнер, в котором находится антитело против с-Met, и один или несколько реактивов для обнаружения связывания антитела против с-Met с с-Met. Реактивы включают, например, флуоресцентные метки, ферментные метки или другие детектируемые метки. Реактивы также могут включать вторичные или третичные антитела или реактивы для ферментативных реакций, где ферментативные реакции дают продукт, который может быть визуализирован.

Антиидиотипические антитела

В дополнительном аспекте изобретение относится к антиидиотипическому антителу, которое связывает антитело изобретения против с-Met, описанное в данном документе.

"Антиидиотипическое" (Id) антитело представляет собой антитело, которое распознает уникальные детерминанты, как правило, ассоциированные с антигенсвязывающим сайтом антитела. В качестве источника МАТ против с-Met с МАТ Id-антитело может быть получено иммунизацией животного того же самого вида и генетического типа, для которого получено антитело против Id. Иммунизированное животное, как правило, распознает и отвечает на идиотипические детерминанты иммунизированного антитела выработкой антитела к этим идиотипическим детерминантам (антитело против Id).

Антитела против Id также могут быть использованы в качестве "иммуногена" для индукции иммунного ответа в другом животном, продуцируя так называемое антитело против антитела против Id. Антитело против антитела против Id может быть эпитопно идентичным исходному МАТ, которое индуцирует антитело против Id. Таким образом, при использовании антител к идиотипическим детерминантам МАТ, можно идентифицировать другие клоны, экспрессирующие антитела идентичной специфичности.

Настоящее изобретение дополнительно проиллюстрировано следующими примерами, которые не

должны толковаться как ограничивающие.

Примеры

Пример 1. Конструкты, экспрессирующие с-Met

Получали оптимизированные по кодонам конструкты для экспрессии с-Met, внеклеточного домена (ECD) (ак 1-932 и С-концевая метка His6 или домен SEMA из с-Met (ак 1-567 и С-концевая метка His9) в клетках НЕК и CHO. Белки, кодируемые этими конструктами идентичны учетной записи Genbank NM 000245 для с-Met. Конструкты, содержат подходящие сайты рестрикции для клонирования и оптимальную последовательность Козак (Kozak et al. (1999) Gene 234: 187-208). Конструкты клонировали в вектор для экспрессии в млекопитающих pEE13.4 (Lonza Biologies) (Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10:169-175), с получением pEE13.4cMet, pEE13.4cMetECDHis и pEE13.4cMetSEMA-567His8.

Пример 2. Экспрессирующие конструкты для 5D5v1, 5D5 и G11-HZ

Получали оптимизированные по кодонам конструкты для экспрессии тяжелой (HC) и легкой цепей (LC) антител IgG1 5D5v1, 5D5 и G11-HZ в клетках НЕК. Белки, кодируемые этими конструктами, идентичны тем, что описаны в Пат. США 6468529 (последовательности 3 и 4) для тяжелой и легкой цепей 5D5v1, WO 2006/015371 A2 (фиг. 13) для тяжелой и легкой цепей 5D5, и WO 2009/007427 A2 (последовательность была выделена из множества фигур) для тяжелой и легкой цепей 224G11. 224G11 также называется в данном документе G11-HZ.

Пример 3. Временная экспрессия в клетках НЕК-293F

Клетки Freestyle™ 293-F (субклон НЕК-293 адаптирован для суспензионного роста и химически заданной среды "Freestyle" (НЕК-293F)) были получены из "Invitrogen" и трансфицированы соответствующей плазмидной ДНК, с помощью "293fectin" (Invitrogen), согласно инструкциям производителя. Экспрессию с-Met проверяли с помощью анализа FACS, как описано ниже. В случае экспрессии антитела, соответствующие экспрессирующие векторы для тяжелой и легкой цепей коэкспрессировали.

Пример 4. Временная экспрессия в клетках CHO

pEE13.4cMet временно трансфицировали в клеточную линию Freestyle™ CHO-S (Invitrogen) с помощью реактива для трансфекции "Freestyle MAX transfection reagent" (Invitrogen). Экспрессию с-Met проверяли анализом FACS, как описано ниже.

Пример 5. Клонирование и экспрессия моновалентных антител (молекул UniBody®)

Для экспрессии моновалентных антител в клетках млекопитающих константную область HC из IgG4, утратившую область шарнира (Ch) (аминокислоты E99-P110) и содержащую 2 мутации F405T и Y407E в области CH3, синтезировали в виде оптимизированного по кодонам конструкта в экспрессирующем в млекопитающих векторе pcDNA3.3 (Invitrogen) и назвали pUniTE. Путем вставки оптимизированной по кодонам константной области в область человеческой легкой цепи каппа в pcDNA3.3 сконструировали отдельный вектор.

Релевантные области VH и VL вставили соответственно в pUniTE и pKappa с получением векторов для экспрессии тяжелой и легкой цепей специфических антител. Котрансфекция векторов с тяжелой и легкой цепями специфического антитела в клетках НЕК-293F (Invitrogen), приводила к временной выработке моновалентных антител с искомыми специфичностями. Очистку антител осуществляли с помощью аффинной колоночной хроматографии с протеином А (как описано в примере 11).

Пример 6. Очистка His-меченного с-Met

cMetECDHis и cMetSEMAHis экспрессировали в клетках НЕК-293F. Метка His в cMetECDHis и cMetSEMAHis позволяет очищать их с помощью аффинной хроматографии с иммобилизованным металлом. В этом способе, хелатор, зафиксированный в хроматографической смоле, наполнен Co^{2+} . Надосадочные жидкости, содержащие cMetECDHis и cMetSEMAHis, инкубировали со смолой в периодическом режиме (т.е. в растворе). Меченный His белок сильно связывается с гранулами смолы, тогда как другие белки, присутствующие в культуральной надосадочной жидкости, связываются не сильно. После инкубации гранулы извлекали из надосадочной жидкости и помещали в колонку. Колонку промывали для удаления слабо связанных белков. Затем элюировали сильно связанные белки cMetECDHis и cMetSEMAHis буфером, содержащим имидазол, который конкурирует с His за связывание с Co^{2+} . Элюэнт удаляли из белка заменой буфера на обессоливающей колонке.

Пример 7. Процедура иммунизации трансгенных мышей

Антитела 005, 006, 007, 008, 011, 012, 016, 017, 022, 024, 025, 028, 031, 035, 039, 040, 045, 093, 095, 096, 101 и 104 выделяли из следующих иммунизаций: одну мышь HCo20 (1 самка, штамм GG2713), одну мышь HCo17 (самка, штамм GG2714) и две мыши HCo12-Balb/C (2 самки, штамм GG2811) (Medarex, Сан-Хосе, Калифорния, США; для ссылки см. выше параграф о мышах HuMab, WO2009097006 и US2005191293) иммунизировали каждые две недели по очереди 5×10^6 опухолевых клеток NCI-H441 внутривенно (в.б.) и подкожно (п.к.) 20 мкг белка cMetECDHis, связанного с гаптеном гемоцианина лимфы улитки (KLH).

Антитела 058, 061, 062, 063, 064, 065, 066, 068, 069, 078, 082, 084, 087, 089, 098 и 181 выделяли из следующих иммунизаций: две мыши HCo20 (1 самец и 1 самка, штамм GG2713), одну мышь HCo12-Balb/C (1 самец, штамм GG2811) (Medarex, Сан-Хосе, Калифорния, США; для ссылки см. выше абзац о

мышях HuMab) иммунизировали каждые две недели по очереди 5×10^6 клеток CHO-K1SV, временно трансфицированных сMetECD, внутривенно (в.в.) и подкожно (п.к.) 20 мкг белка сMetECDHis, связанного с гаптеном гемоцианина лимфы улитки (KLH).

Осуществляли максимум восемь иммунизаций на мышь, четыре в.в. и четыре п.к. иммунизации в крестец. Первую иммунизацию проводили с помощью клеток в полном адьюванте Фрейнда (CFA; Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США). Для всех остальных иммунизаций, клетки инъецировали в.в. в PBS, а сMetECD, соединенный с KLH, инъецировали п.к. с использованием неполного адьюванта Фрейнда (IFA; Difco Laboratories, Детройт, Мичиган, США). Объединяли мышей, по меньшей мере, с двумя последовательными титрами с-Met-специфичного антитела, равными 200 (разведение сыворотки 200/1) или выше, определенных в анализе антиген-специфичного скрининга FMAT, как описано в примере 8.

Пример 8. Анализ гомогенным антигенспецифичным скринингом

Наличие антител против с-Met в сыворотке иммунизированных мышей или в гибридах "HuMab" (человеческие моноклональные антитела) или в надосадочной жидкости культуры трансфектом, определяли в анализе гомогенным антигенспецифичным скринингом (четвертый квадрант) с помощью технологии "Fluorometric Micro volume Assay Technology" (FMAT; Applied Biosystems, Фостер-Сити,

Калифорния, США). Для этого использовали комбинацию 3 анализов на основе клеток и одного анализа на основе гранул. В анализах на основе клеток, определяли связывание с TH1016-сMet (клетки HEK-293F временно экспрессирующие внеклеточный домен рецептора с-Met; полученные как описано выше) и с HT29 (которые экспрессируют с-Met на клеточной поверхности), а также с клетками HEK293 дикого типа (отрицательный контроль который не экспрессирует с-Met). Для анализа на основе гранул, определяли связывание с SB1016-сMet (сMetECDHis, полученный при временной экспрессии в клетках HEK-293F, как описано выше, биотинилированный и спаренный с покрытыми стрептавидином гранулами). Образцы добавляли к клеткам/гранулам для связывания с с-Met. Затем связывание "HuMab" детектировали с помощью флуоресцентного конъюгата (козьи антитела против человеческих IgG-Cy5; Jackson ImmunoResearch). Химерное антитело специфичное к с-Met 5D5v1 (полученное в клетках HEK-293F) использовали в качестве положительного контроля, а смешанную сыворотку HuMab и HuMab-KLH использовали в качестве отрицательных контролей. Образцы сканировали с помощью системы детекции "Applied Biosystems 8200 Cellular Detection System" (8200 CDS) и значения 'импульсы x флюоресценция' использовали в качестве выводимых данных. Образцы установили как положительные, когда импульсы были выше чем 50, а 'импульсы x флюоресценция' были по меньшей мере в три раза выше, чем в случае отрицательного контроля HuMab-KLH.

Пример 9. Получение гибридомы "HuMab"

Мышей "HuMab" с достаточным развитием антиген-специфичного титра (определенного выше) умерщвляли и собирали селезенку и лимфоузлы, фланкирующие абдоминальную аорту и полую вену. Слияние спленоцитов и клеток лимфоузлов с клеточной линией мышинной миеломы осуществляли электрослиянием с помощью системы "CEEF 50 Electrofusion System" (Cyto Pulse Sciences, Глен-Бурни, Мериленд, США), преимущественно согласно инструкциям изготовителя. Планшеты для слияния скринировали с помощью антиген-специфичных анализов связывания, как описано выше, а клетки, положительные по этому анализу, тестировали в анализе ERK-фосфорилирования "Alphascreen® SureFire®", и в анализе оценки аффинности "Octet", как описано ниже. Антитела 031, 035, 087 и 089 наращивали и культивировали по стандартным протоколам (например, как описано в Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Параллельно клонировали антитела 005, 006, 007, 008, 011, 012, 016, 017, 022, 024, 025, 028, 035, 039, 040, 045, 058, 061, 062, 063, 064, 065, 066, 068, 069, 078, 082, 084, 093, 095, 096, 098, 101, 104 и 181 с использованием системы "ClonePix" (Genetix, Гэмпшир, Великобритания). Специфические первичные луночные гибридомы высевали на полужидкую среду, приготовленную из 40% "CloneMedia" (Genetix, Гэмпшир, Великобритания) и 60% полной среды HyQ 2x (Hyclone, Уолтем, США), и выкалывали приблизительно 100 субклонов каждой первичной лунки. Субклоны тестировали в антигенспецифичном анализе связывания, как описано ранее, а уровень IgG измеряли с использованием "Octet" с целью отбора наиболее специфичного и продуктивного клона из первичной лунки для последующего наращивания. Следующее наращивание и культивирование полученных в результате гибридом "HuMab" проводили по стандартным протоколам (например, как описано в Coligan J.E., Bierer, B.E., Margulies, D.H., Shevach, E.M. and Strober, W., eds. Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, Inc., 2006).

Пример 10. Масс-спектрометрия очищенных антител

Малую аликвоту 0,8 мл антитела, содержащего надосадочную жидкость гибридом из 6-луночной стадии или стадии "Hyperflask" очищали с помощью колонок "PhyTip", содержащих смолу с протеином G (PhyNexus Inc., Сан-Хосе, США) на рабочей станции "Sciclone ALH 3000" (Caliper Lifesciences, Хопкингтон, США) Колонки "PhyTip" использовали согласно инструкциям производителя, но буферы заменили на: Буфер для связывания PBS (B. Braun, Medical B.V., Осс, Нидерланды) и Буфер для элюции 0.1M Глицин-HCl pH 2,7 (Fluka Riedel-de Haen, Букс, Германия), после очистки образцы нейтрализовали

2 M 2M Tris-HCl pH 9,0 (Sigma-Aldrich, Зейдрехт, Нидерланды). В ином случае в некоторых случаях большие объемы культуральной надосадочной жидкости очищали с помощью аффинной колоночной хроматографии с протеином А.

После очистки образцы поместили в 384-луночный планшет (Waters, планшет с 100 мкл квадратными лунками, part* 186002631). Образцы дегликозилировали в течение ночи при 37°C с помощью N-гликозидазы F. Добавляли DTT (15 мг/мл) (1 мкл/лунку) и инкубировали в течение 1 часа при 37°C. Образцы (5 или 6 мкл) обессоливали на "Acquity UPLC™" (Waters, Милфорд, США) с помощью колонки а ВЕН300 С18, 1.7цт, 2.1×50 мм при 60°C. Воду MQ и ацетонитрил категории LC-MS (Biosolve, cat no 01204101, Валкенсваард, Нидерланды), оба с 0,1% муравьиной кислотой (Fluka, cat no 56302, Букс, Германия), использовали в качестве Элюентов А и В соответственно. Масс-спектры с времяпролетной ионизацией электрораспылением записывали в режиме реального времени на масс-спектрометре "micrOTOF™" (Bruker, Бремен, Германия), функционирующем в режиме положительных ионов. До анализа шкалу 900-3000 m/z калибровали с помощью смеси для Настройки "ES" (Agilent Technologies, Санта-Клара, США). Масс-спектры подвергали деконволюции с помощью программного обеспечения "DataAnalysis™ software v. 3.4" (Bruker) при использовании алгоритма максимальной энтропии для поиска молекулярных масс между 5 и 80 кДа.

После деконволюции полученные массы тяжелой и легкой цепей для всех образцов сравнивали для обнаружения дублирующих антител. В сравнении тяжелых цепей было принято во внимание возможное присутствие вариантов с С-концевым лизином. Был получен список уникальных антител, в котором уникальные определены как уникальная комбинация тяжелой и легкой цепей. В случае если дублированные антитела были найдены, результаты из других тестов использовали для решения, какое из антител является лучшим материалом для продолжения экспериментов.

Пример 11. Анализ и клонирование в экспрессирующие векторы последовательностей переменных доменов антитела против с-Met

Общую РНК HuMab против с-Met получали из 5×10^6 клеток гибридомы, а 5'-RACE-комплементарную ДНК (кДНК) получали из 100 нг общей РНК, с помощью набора "SMART RACE cDNA Amplification kit" (Clontech), согласно инструкциям производителя. Кодированные области VH (вариабельная область тяжелой цепи) и VL (вариабельная область легкой цепи) амплифицировали ПЦР и в рамке считывания клонировали в векторы с константной областью pGI (содержащий оптимизированную по кодонам, полностью синтетическую, константную область тяжелой цепи человеческого IgG1 (аллотип f) в экспрессирующем в млекопитающих векторе pEE6.4 (Lonza Biologies, Слоу, Великобритания (Bebbington et al. (1992) *Biotechnology* 10:169-175)) и pKappa (содержащий оптимизированную по кодонам, полностью синтетическую, константную область человеческой легкой цепи каппа (аллотип Km3) в экспрессирующем в млекопитающих векторе pEE12.4 (Lonza Biologies, Слоу, Великобритания (Bebbington et al. (1992) *Biotechnology* 10:169-175)) с помощью независимой от лигирования стратегии клонирования (Aslanidis et al. *Nucleic Acids Res.* 18:6069-6074). Для каждого HuMab 12 клонов VL и 8 клонов VH секвенировали и их теоретические массы рассчитывали и сравнивали с доступными масс-спектрометрическими данными по антителам. Последовательности даны в перечне последовательностей и в табл. 1 в данном документе ниже. Последовательности CDR определяли согласно Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). В табл. 2 и 3 дан обзор информации о последовательностях антител и большинстве гомологичных зародышевых последовательностей.

Таблица 1. Последовательности переменной области тяжелой цепи (VH), переменной области легкой цепи (VL) и последовательности CDR из HuMab

SEQ ID No: 1	VH 005	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFS SYGFGWVRQAPGGLEWMGRISPILGIANY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDVGYDWPDTFDIWGQGMVIV SS
SEQ ID No: 2	VH 005, CDR1	SYGFG
SEQ ID No: 3	VH 005, CDR2	RISPILGIANYAQMFGQ
SEQ ID No: 4	VH 005, CDR3	DVGYDWPDTFDI
SEQ ID No: 5	VL 005	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SFPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 6	VL 005, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 7	VL 005, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 8	VL 005, CDR3	QQYNSFPPT
SEQ ID No: 9	VH 006	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFS SFGIGWVRQAPGGLEWMGRIFPILGTANY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDVGYDSADAFDIWGQGMVTV SS
SEQ ID No: 10	VH 006, CDR1	SFGIG
SEQ ID No: 11	VH 006, CDR2	RIFPILGTANYAQMFGQ
SEQ ID No: 12	VH 006, CDR3	DVGYDSADAFDI
SEQ ID No: 13	VL 006	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSDFTLTISLQPEDFATYYCQQYN SYPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 14	VL 006, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 15	VL 006, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 16	VL 006, CDR3	QQYNSYPPT
SEQ ID No: 17	VH 008	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKLEWMGIYPGDSETRY SPSFQGVTTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARQEITGEFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 18	VH 005, CDR1	SYWIG
SEQ ID No: 19	VH 008, CDR2	IYPGDSETRYSPSFQG
SEQ ID No: 20	VH 008, CDR3	QEITGEFDY
SEQ ID No: 21	VL 008	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSA LAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESQVPSRFS GSGSGDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNYSY PRTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 22	VL 008, CDR1	RASQGISSALA
SEQ ID No: 23	VL 008, CDR2	DASSLES
SEQ ID No: 24	VL 008, CDR3	QQFNYSYPR

SEQ ID No: 25	VH 022	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNK YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRA EDTAVYYCARELLWFGELW GYFDLWGRGTLVTVSS
SEQ ID No: 26	VH 022, CDR1	SYAMH
SEQ ID No: 27	VH 022, CDR2	VISYDGSNKYYADSVKGG
SEQ ID No: 28	VH 022, CDR3	ELLWFGELWGYFDL
SEQ ID No: 29	VL 022	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQEASS FTWTFGQGTKEIK
SEQ ID No: 30	VL 022, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 31	VL 022, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 32	VL 022, CDR3	QEASSFTWT
SEQ ID No: 33	VH 024	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSSGGSTY YVDSVKGRFTISRANSKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDLDRGWMG YFGYWGQGTLVTVSS
SEQ ID No: 34	VH 024, CDR1	SYAMS
SEQ ID No: 35	VH 024, CDR2	AISGSSGGSTYYVDSVKGG
SEQ ID No: 36	VH 024, CDR3	DLDRGWMGYFGY
SEQ ID No: 28	VL 024	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPTFGQGTREIK
SEQ ID No: 38	VL 024, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 39	VL 024, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 40	VL 024, CDR3	QQANSFPT
SEQ ID No: 41	VH 035	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWVMIYPGDSDTRY SPSFQGGVTSADKSISTAYLQWNSLKASDT AMYCARQEITGEFDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 42	VH 035, CDR1	SYWIG
SEQ ID No: 43	VH 035, CDR2	IYYPGDSDFRYSPSFQG
SEQ ID No: 44	VH 035, CDR3	QEITGEFDY
SEQ ID No: 45	VL 035	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQGISSA LAWYQQKPKAPKLLIYDASSLESVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQFNSY PMYTFGQGTKEIK
SEQ ID No: 46	VL 035, CDR1	RASQGISSALA
SEQ ID No: 47	VL 035, CDR2	DASSLES
SEQ ID No: 48	VL 035, CDR3	QQFNSYPMYT
SEQ ID No: 49	VH 045	EVQLLESQGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMSWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGITYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDRWGSDYW GQGTLVTVSS
SEQ ID No: 50	VH 045, CDR1	SYAMS
SEQ ID No: 51	VH 045, CDR2	VISGSGGITYYADSVKGG
SEQ ID No: 52	VH 045, CDR3	DRGWGSDY

SEQ ID No: 53	VL 045	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LAWYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSN WPFITFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 54	VL 045, CDR1	RASQSVSSYLA
SEQ ID No: 55	VL 045, CDR2	DASNRAT
SEQ ID No: 56	VL 045, CDR3	QQRSNWPFT
SEQ ID No: 57	VH 058	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFS DYMYWVRQTPEKRLEWVATISDDGSYTY YPDSVKGRFTISRDNKNNLYLQMSLSE DTAMYYCAREGLYYYGSGSYNQDYWGQ GTLVTVSS
SEQ ID No: 58	VH 058, CDR1	DYMY
SEQ ID No: 59	VH 058, CDR2	TISDDGSYTYYPDSVKG
SEQ ID No: 60	VH 058, CDR3	EGLYYYGSGSYNQDY
SEQ ID No: 61	VL 058	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGLSSA LAWYRQKPGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQFTSYP QITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 28	VL 058, CDR1	RASQGLSSALA
SEQ ID No: 63	VL 058, CDR2	DASSLES
SEQ ID No: 64	VL 058, CDR3	QQFTSYPQIT
SEQ ID No: 65	VH 061	QLQLQESGGLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRPPGKLEWIGXIIYHSGNTY DNPSLKSRTVIAVDRSKNQLSLKLSFLTAAD TAVYYCARSSYDFLTDWG QGTLVTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 66	VH 061, CDR1	SGHSWS
SEQ ID No: 67	VH 061, CDR2	XIIYHSGNTYDNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 68	VH 061, CDR3	SSYDFLTD
SEQ ID No: 69	VL 061	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQHKGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLPEDFATYYCQGAN GFPITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 70	VL 061, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 71	VL 061, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 72	VL 061, CDR3	QQANGFPIT
SEQ ID No: 73	VH 062	QLQLQESGGLVKPSQTLSTCAVSGGSISS GGHSWSWIRPPGKLEWIGXIIYHSGNTY DNPSLKSRTVIAVDRSKNQLSLKLSFVTAAD TAVYYCARSSYDILTWDWGQTLVTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 74	VH 062, CDR1	SGHSWS
SEQ ID No: 75	VH 062, CDR2	XIIYHSGNTYDNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 76	VH 062, CDR3	SSYDILT

SEQ ID No: 77	VL 062	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPIITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 78	VL 062, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 79	VL 062, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 80	VL 062, CDR3	QQANGFPIT
SEQ ID No: 81	VH 064	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTLTCVAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKLEWIGX1IYHSGNTY DNPSLKSRTISVDRSKNQVSLKLSVTAAD TAVYYCARSSYDILTDWQGTTLVTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 82	VH 064, CDR1	SGGHSWS
SEQ ID No: 83	VH 064, CDR2	X1IYHSGNTYDNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 84	VH 064, CDR3	SSYDILTD
SEQ ID No: 85	VL 064	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPIITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 86	VL 064, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 87	VL 064, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 88	VL 064, CDR3	QQANGFPIT
SEQ ID No: 89	VH 068	QLQLQESGSGLVKPSQTLSTLTCVAVSGGSISS GGYSWSWIRQPPGKLEWIGXHYHSGSTYY NPSLKSRTISVDRSKNQVSLKLSVTAADT AVYYCARSSYDILTDW QGTTLVTVSS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 90	VH 068, CDR1	SGGYSWS
SEQ ID No: 91	VH 068, CDR2	X1IYHSGSTYYNPSLKS, где X1 является любой аминокислотой, предпочтительно C, S, Y или A
SEQ ID No: 92	VH 068, CDR3	SSYDILTD
SEQ ID No: 93	VL 068	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 94	VL 068, CDR1	RASQGISSWLA
SEQ ID No: 95	VL 068, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 96	VL 068, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No: 97	VH 069	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYFTT SYGISWVRQAPGHLEWGMGWISAYNGYTN YAQKLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGTTLVTVS S
SEQ ID No: 98	VH 069, CDR1	SYGIS
SEQ ID No: 99	VH 069, CDR2	WISAYNGYTNYAQKLQG
SEQ ID No: 100	VH 069, CDR3	DLRGTNYFDY

SEQ ID No: 101	VL 069	DIQMTQSPSSVSASVGDRTTITCRASQGISN WLA WFOHKPGKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQAN SFPIITFGQGTRLEIK
SEQ ID No: 102	VL 069, CDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID No: 103	VL 069, CDR2	AASSLLS
SEQ ID No: 104	VL 069, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No: 105	VH 096	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPGSDSDTRY SPSFQQQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDT AMYVCARQEITGDFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 106	VH 096, CDR1	SYWIG
SEQ ID No: 107	VH 096, CDR2	IIYPGSDSDTRYSPSFQG
SEQ ID No: 108	VH 096, CDR3	QEITGDFDY
SEQ ID No: 109	VL 096	AIQLTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISSA LA WYQQKPGKAPNLLIYAASSLESQVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 110	VL 096, CDR1	RASQGISSALA
SEQ ID No: 111	VL 096, CDR2	AASSLES
SEQ ID No: 112	VL 096, CDR3	QQFNSYPLT
SEQ ID No: 113	VH 098	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TNFGISWVRQAPGQGLEWMGWISAFNGHT DYSQKVQGRVTMTTDTSTAYMELRSLRS DDTAVFYCARSHYVYSGSPFDYWGQGLV TVSS
SEQ ID No: 114	VH 098, CDR1	NFGIS
SEQ ID No: 115	VH 098, CDR2	WISAFNGHTDYSQKVOG
SEQ ID No: 116	VH 098, CDR3	SHYYGSGSPFDY
SEQ ID No: 117	VL 098	DIQMTQSPSSLSASVGDRTTITCRASQGISN WLA WYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCHQYK SYPWTFGQGTVEIK
SEQ ID No: 118	VL 098, CDR1	RASQGISNWLA
SEQ ID No: 119	VL 098, CDR2	AASSLQS
SEQ ID No: 120	VL 098, CDR3	HQYKSYPWT
SEQ ID No: 121	VH 101	QVQLVQSGGEVKKPGASVKVSKASGYTF TRHGITWVRQAPGQGLEWMGWISADNGNT NYAQKFQDRVTMTTDTSTAYMELRSLRS DDTAVFYCARVFRYFDWLLPYFDYWGQGT LTVST
SEQ ID No: 122	VH 101, CDR1	RHGIT
SEQ ID No: 123	VH 101, CDR2	WISADNGNTNYAQKFQD
SEQ ID No: 124	VH 101, CDR3	VFRYFDWLLPYFDY
SEQ ID No: 125	VL 101	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSSS YLAWYQQKPGQAPRLLIYGVFSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQY SSPYTFGQGTVEIK
SEQ ID No: 126	VL 101, CDR1	RASQSVSSSYLA
SEQ ID No: 127	VL 101, CDR2	GVFSRAT
SEQ ID No: 128	VL 101, CDR3	QQYGSSPYT

SEQ ID No: 129	VH 181	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTF TSYGISWVRQAPGQGLEWMGWISTYNGYT NYAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLRGTAYFDYWGQGLVTV SS
SEQ ID No: 130	VH 181, CDR1	SYGIS
SEQ ID No: 131	VH 181, CDR2	WISTYNGYTNYAQLQGLG
SEQ ID No: 132	VH 181, CDR3	DLRGTAYFDY
SEQ ID No: 133	VL 181	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISN WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 134	VL 181, CDR1	RASQGISNWL
SEQ ID No: 135	VL 181, CDR2	AASSLLS
SEQ ID No: 136	VL 181, CDR3	QQANSFPIT
SEQ ID No: 137	VH 066	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISYNGYTN YAQLQGRVTMTADTSTSTAYMELRSLRS DDTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLVTV SS
SEQ ID No: 138	VL 066	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISN WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 139	VH 065	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFT NYGISWVRQAPGHGLEWMGWISYNGYTN YAQLQGRVTMTTDTSTTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLVTVS S
SEQ ID No: 140	VL 065	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISN WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 141	VH 082	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISYNGYTN YAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLVTVS S
SEQ ID No: 142	VL 082	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISN WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGRLEIK
SEQ ID No: 143	VH 089	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCETSGYTFT SYGISWVRQAPGHGLEWMGWISYNGYTN YAQLQGRVTMTTDTSTSTAYMELRSLRSD DTAVYYCARDLRGTNYFDYWGQGLVTVS S
SEQ ID No: 144	VL 089	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISN WLAWFQHKPKAPKLLIYAASSLLSGVPSR FSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGRLEIK

SEQ ID No: 145	VH 031	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGFGWVRQAPGQGLEWMGRISPILGITNY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDVGYDWPDTFDIWGQGMVIV SS
SEQ ID No: 146	VL 031	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SFPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 147	VH 007	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGIGWVRQAPGQGLEWMGRIFPILGTANY AQMFGQGRVTITADKSTSTAYIELTSLRSED TAVYYCARDVGYDSADAFDIWGQGMVTVS S
SEQ ID No: 148	VL 007	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 149	VH 011	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFS SYGIGWVRQAPGQGLEWMGRVFPILGTAN YMQMFGQGRVTITADKSTSTAYMELTSLRSE DTAVYYCARDVGYDSADAFDIWGQGMVT VSS
SEQ ID No: 150	VL 011	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYN SYPPTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 151	VH 017	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKY FADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARELLWFGELWGYFDLWGRGTL VTVSS
SEQ ID No: 152	VL 017	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQEANS FTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 153	VH 025	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS SYAMHWVRQAPGKGLEWVAFISYDGSNKD YADSVKGRFTIFRDNSKNTLYLQMSSLRAA DTAVYYCARELLWFGELWGYFDLWGRGTL VTVSS
SEQ ID No: 154	VL 025	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLAWYQHKGPKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTNS FTWTFGQGTKVEIK
SEQ ID No: 155	VH 040	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSS YAMTWVRQAPGKGLEWVSVISGSGGITYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCARDRWGSDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID No: 156	VL 040	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LA WYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQQRSN WPFITFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 157	VH 039	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFN NYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGGGITY YADSEKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCAKDRGWGSDCWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 158	VL 039	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSY LA WYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARF SGSGSGTDFLTISLSEPEDFAVYYCQQRSN WPFITFGPGTKVDIK
SEQ ID No: 159	VH 078	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGCLYHSGNTYY NPSLKSRTISVDRSKNQFSLKLSVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 160	VL 078	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLA WYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 161	VH 084	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGCLYHSGNTYY NPSLKSRTISVDRSKNQFSLKLSVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 162	VL 084	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLA WYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN SFPITFGQGTREIK
SEQ ID No: 163	VH 063	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGCIYHSGNTYD NPSLKSRTIAVDRSKNQLSLKLSFVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 164	VL 063	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLA WYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPIITFGQGTREIK
SEQ ID No: 165	VH 087	QLQLQESGSGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISS GGHSWSWIRQPPGKGLEWIGCIYHSGNTYD NPSLKSRTISVDRSKNQFSLKLSVTAADT AVYYCARSSYDILTDWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 166	VL 087	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISS WLA WYQHKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSR FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQAN GFPIITFGQGTREIK
SEQ ID No: 167	VH 016	EVQLVQSGAEVKKPESLKISCKGSGYIFTS YWIGWVRQMPGKGLEWGMHIYPGSDSTRY SPSPGQVTSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCARQEVTDGDFDYWGQGLVTVSS
SEQ ID No: 168	VL 016	AIQLTQSPSSLASVGDRTITCRASQGISSA LA WYQKPGKAPKLLIYDASSLESQVPSRFS GSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQFNSY PLTFGGGKVEIK

SEQ ID No: 169	VH 028	EVQLVQSGGEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWGIVRQMPGKGLEWMGIYPGDSSTRY SPSFQGVVTSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCARQEITGDFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 170	VL 028	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSA LA WYQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 171	VH 012	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWGIVRQMPGKGLEWMGIYPGDSSTRY SPSFQGVVTSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCARQEITGDFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 172	VL 012	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSA LA WYQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQFNSY PRTFGGQTKVEIK
SEQ ID No: 173	VH 095	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWGIVRQMPGKGLEWMGIYPGDSNTRY SPSFQGVVTSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCARQEITGDFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 174	VL 095	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSA LA WYQKPKGKAPKLLIYDASSLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 175	VH 093	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWGIVRQMPGKGLEWMGIYPGDSSTRY SPSFQGVVTSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCARQEITGDFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 176	VL 093	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSA LA WYQKPKGKAPNLLIYAASSLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQFNSY PLTFGGGTKVEIK
SEQ ID No: 177	VH 104	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFIS YWGIVRQMPGKGLEWMGIYPGDSSTRY SPSFQGVVTSADKSISTA YLQWSSLKASDT AMYCARQEITGDFDYWGQGLTLTVSS
SEQ ID No: 178	VL 104	AIQLTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSA LA WYQKPKGKAPKLLIYVASSLESGVPSRFS GSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQFNSY PITFGGQTRLEIK

Таблица 2. Гомологии мышинового первоисточника и последовательностей тяжелых цепей

Антитело	номер мыши	мышинная линия	зародышевый VH
TH1016-005	339732	HCo12B, C1	IgHV1-69-4
TH1016-006	339732	HCo12B, C1	IgHV1-69-4
TH1016-008	339732	HCo12B, C1	IgHV5-51-1
TH1016-022	339733	HCo12B, C1	IgHV3-30-3*1
TH1016-024	339733	HCo12B, C1	IgHV3-23-1
TH1016-035-D09	339732	HCo12B, C1	IgHV5-51-1
TH1016-045	339282	HCo17, C1	IgHV3-23-1
TH1016-058	343191	HCo12B, C2	IgHV3-11-3
TH1016-061	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-062	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-064	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-068	348072	HCo20, C2	IgHV4-30-2*1
TH1016-069	348072	HCo20, C2	IgHV1-18-1
TH1016-096	339732	HCo12B, C1	IgHV5-51-1
TH1016-098	347330	HCo20, C2	IgHV1-18-1
TH1016-101	340659	HCo20, C1	IgHV1-18-1
TH1016-181	348072	HCo20, C2	IgHV1-18-1

Таблица 3. Гомологии мышинового первоисточника и последовательностей легких цепей

Антитело	номер мыши	мышинная линия	зародышевая линия
PC1016-005	339732	HCo12B, C1	IGKV1D-16*01
PC1016-006	339732	HCo12B, C1	IGKV1D-16*01
PC1016-008	339732	HCo12B, C1	IGKV1-13*02
PC1016-022	339733	HCo12B, C1	IGKV1-12*01
PC1016-024	339733	HCo12B, C1	IGKV1-12*01
P1016-035	339732	HCo12B, C1	IGKV1-13*02
PC1016-045	339282	HCo17, C1	IGKV3-11*01
PC1016-058	343191	HCo12B, C2	IGKV1-13*02
PC1016-061	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-062	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-064	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-068	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-069	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01
PC1016-096	339732	HCo12B, C1	IGKV1-13*02
PC1016-098	347330	HCo20, C2	IGKV1D-16*01
PC1016-101	340659	HCo20, C1	IGKV3-20*01
PC1016-181	348072	HCo20, C2	IGKV1-12*01

На фиг. 1 и 2 представлено выравнивание последовательностей HuMabs. На основании этих последовательностей может быть определена консенсусная последовательность для последовательностей CDR. Эти консенсусные последовательности представлены в табл. 4.

Таблица 4. Консенсусные последовательности

SEQ ID No: 179 005-006	IgHV1-69-4	CDR1	SX1X2X3X4	где X1=Y или F, X2=A или G, X3 = F или I, X4 = S или G. Предпочтительно, если X1=Y олиг F, X2 = G, X3 = F или I и X4=G.
SEQ ID No: 180 005-006	IgHV1-69-4	CDR2	RXIX2PILGX3X4NYAQ X5FQG	где X1=I или V, X2 = I, S или F, X3=I или T, X4=A или T, X5 = K или M. Предпочтительно, если X1=I или V, X2=S или F, X3=I или T, X4=A или T и X5 = M.
SEQ ID No: 181 005-006	IgHV1-69-4	CDR3	DVGYDX1X2DX3FDI	где X1=W или S, X2 = P или A, X3=T или A
SEQ ID No: 182 008-035	IgHV5-51-1	CDR2	IIYPGDSXITRYSPSQG	где X1 = D, E или N
SEQ ID No: 183 008-035-096	IgHV5-51-1	CDR3	QEX1TGX2FDY	где X1=V или I, X2 = E или D
SEQ ID No: 184 022	IgHV3-30-3*1	CDR2	X1ISYDGSX2KX3X4AD SVKG	где X1=V или F, X2 = N или S, X3 = D или Y, X4=Y или F
SEQ ID No: 185 024	IgHV3-23-1	CDR2	AISGSX1GGSTYYX2DS VKG	где X1 = S или отсутствие ак, X2=V или A
SEQ ID No: 186 045	IgHV3-23-1	CDR1	X1YAMX2	где X1 = S или N, X2=S или T
SEQ ID No: 187 045	IgHV3-23-1	CDR2	X1ISGSGGX2TYYADS X3KG	где X1=A или V, X2 = S или I, X3=V или E. Предпочтительно, где X1=A или V, X2 = I и X3=V или E.
SEQ ID No: 188 045	IgHV3-23-1	CDR3	DRGWGSDX1	где X1=Y или C
SEQ ID No: 189 058	IgHV3-II-3	CDR1	DYYMX1	где X1=Y или S
SEQ ID No: 190 058	IgHV3-II-3	CDR2	X1ISX2X3X4SYTX5YX 6DSVKG	где X1=T или Y, X2 = D или S, X3= D или S, X4 = G или S, X5=Y или N, X6 = P или A
SEQ ID No: 191 062-064-068	IgHV4-30-2*1	CDR1	SGGX1SWS	где X1=Y или H
SEQ ID No: 192 062-064-068	IgHV4-30-2*1	CDR2	X1X2YHSGX3TYX4NPS LKS	где X1=любая аминокислота, предпочтительно C, Y, S или A, X2 = I или L, X3=S или N, X4=Y или D
SEQ ID No: 193 062-064-068	IgHV4-30-2*1	CDR3	SSYDX1LTD	где X1=F или I

SEQ ID No: 194 069-181	IgHV1-18-1	CDR1	X1YGIS	где X1=S или N
SEQ ID No: 195 069-181	IgHV1-18-1	CDR2	WISX1YNGX2TNYAQK LQG	где X1=A или T, X2 = N или Y. Предпочтительно, где X1=A или T и X2=Y
SEQ ID No: 196 069-181	IgHV1-18-1	CDR3	DLRGTX1YFDY	где X1=A или N
SEQ ID No: 197 098	IgHV1-18-1	CDR1	X1X2GIS	где X1 = N или S, X2 = F или Y
SEQ ID No: 198 098	IgHV1-18-1	CDR2	WISAX1NGX2TX3YX4 QKX5QG	где X1 = F или Y, X2 = H или N, X3 = D или N, X4=S или A, X5=V или L
SEQ ID No: 199 101	IgHV1-18-1	CDR1	X1X2GIX3	где X1 = R или S, X2 = H или Y, X3=T или S
SEQ ID No: 200 101	IgHV1-18-1	CDR2	WISAX1NGNTNYAQK X2QX3	где X1 = D или Y, X2 = F или L, X3 = D или G
SEQ ID No: 201 101	IgHV1-18-1	CDR3	VX1RYFDWLLX2YFDY	где X1 = F или L, X2 = P или отсутствие ак
SEQ ID No: 202 005-006	IGKV1D-16*01	CDR3	QQYNSX1PX2T	где X1=Y или F, X2 = P или W. Предпочтительно, где X1=Y или F и X2 = P
SEQ ID No: 203 008-035	IGKV1-13*02	CDR2	X1ASSLES	где X1 = D, V или A
SEQ ID No: 204 008-035	IGKV1-13*02	CDR3	QQFNSYPLX1T	где X1 = R, I, L, W или MY
SEQ ID No: 205 022	IGKV1-12*01	CDR3	QX1X2X3SFX4WT	где X1 = Q или E, X2=A или T, X3 = N или S; X4 = P или T
SEQ ID No: 206 024	IGKV1-12*01	CDR3	QQANSFPX1T	где X1=I или отсутствие ак
SEQ ID No: 207 058	IGKV1-13*02	CDR3	QQFX1SYXP2IT	где X1=T или N, X2 = Q или отсутствие ак
SEQ ID No: 208 062-064-068	IGKV1-12*01	CDR3	QQANX1FPIT	где X1 = G или S
SEQ ID No: 209 069-181	IGKV1-12*01	CDR1	RASQGISX1WLA	где X1=S или N
SEQ ID No: 210 069-181	IGKV1-12*01	CDR2	AASSLX1S	где X1=Q или L
SEQ ID No: 211 098	IGKV1D-16*01	CDR3	X1QYX2SYPWT	где X1 = H или Q, X2 = K или N
SEQ ID No: 212 101	IGKV3-20*01	CDR2	GX1X2SRAT	где X1=V или A, X2 = F или S

Пример 12. Очистка антител

Культуральную надосадочную жидкость фильтровали через 0,2 мкм тупиковый фильтр и наносили на 5 мл колонки "MabSelect SuRe" (GE Health Care) и элюировали 0,1 М цитратом натрия - NaOH, pH 3. Элюат немедленно нейтрализовали 2 М Tris-HCl, pH 9 и диализовали в течение ночи против 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). В ином случае, после очистки элюат наносили на колонку "Hi-Prep Desalting column" и заменяли в антителах буфер на 12,6 mM NaH₂PO₄, 140 mM NaCl, pH 7,4 (B.Braun). После диализа или замены буфера образцы стерильно фильтровали через 0,2 мкм тупиковые фильтры. Чистоту определяли посредством ДСН-ПААГ, а концентрацию измеряли нефелометрией и по поглощению при 280 нм. Очищенные антитела хранили при 4°C. Масс-спектрометрию осуществляли для идентификации молекулярной массы тяжелой и легкой цепей антител, экспрессируемых гибридомами, как описано в примере 10.

Пример 13. Связывание клонов анти-с-Met с опухолевыми клетками, которые экспрессируют мембраносвязанный с-Met, измеренное посредством анализа FACS

Связывание антител с-Met и их моновалентных форм (также называемых в данном документе "молекулами UniBody" см. пример 5) с клетками A431, экспрессирующими мембраносвязанный с-Met (приобретенными у ATCC, CRL-1555), проверяли с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II, BD Biosciences). Анализ "Qifit" (Dako, Глоструп, Дания) выявил, что клетки A431 экспрессируют в среднем 30

000 копий белка с-Met на клетку. Связывание антител против с-Met и молекул "UniBody" определяли с помощью конъюгированных с фикоэритрином козьих антител, связывающих человеческие IgG (Jackson). IgG1-5D5 использовали в качестве положительного контрольного антитела, а HuMab-KLN использовали в качестве антитела изотипного контроля. Значения EC_{50} определяли посредством нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая "доза-эффект" с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения "GraphPad Prism V4.03" (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фиг. 3 показано, что все протестированные антитела и молекулы "UniBody" против с-Met связывают с-Met, экспрессируемый на клетках A431 дозозависимым способом. Значения EC_{50} для связывания варьируют в диапазоне 0,28-1,92 нМ для IgG и 0,52-13,89 нМ для молекул "UniBody". Интересно, что антитело IgG1-024 продемонстрировало высокие уровни ненасыщенного связывания с клетками A431, которое не наблюдалось при тестировании связывания с клетками HT-29 (приобретенных у ATCC, HTB-38™) (данные не представлены). Для антител 022, 024, 062, 064, 069, 098, 101 и 181, снижения EC_{50} не наблюдалось или наблюдалось менее чем 2 кратное снижение между IgG1 и молекулами "UniBody" идентичных клонов. Также уровни максимального связывания не менялись у IgG1 и молекул "UniBody". Для антител 005, 006, 008, 035, 045 и 058, с другой стороны, при сравнении IgG1 с эквивалентным "UniBody" наблюдали больше чем 2 кратное уменьшение значения EC_{50} , а также уменьшение уровня максимального связывания. Это, по всей вероятности, произошло из-за более низких скоростей диссоциации (K_d) этих антител (см. пример 14).

Пример 14. Анализ "Octet" для ранжирования аффинности

Связывание антитела с сMetECDHis анализировали посредством технологии "Bio-Layer Interferometry" (BLI) на системе "Octet" (Fortebio, Менло-Парк, США). Биосенсоры, покрытые антителами к человеческим IgG (Fc-специфичными) использовали для захвата антител против с-Met согласно процедуре, рекомендованной изготовителем. сMetECDHis, полученный из клеток HEK293, наносили сверху на иммобилизованные антитела против с-Met путем помещения загруженного биосенсора в лунку, содержащую 10 мкл/мл сMetECDHis разведенного в 10 раз в буфере для измерения кинетики (Fortebio). Различия в отражении света ($\Delta\lambda$, нм) поверхности биосенсора из-за связывания с сMetECDHis измеряли в реальном времени в течение примерно 10 минут, а для расчета константы ассоциации (k_a [1/М×с]) использовали программное обеспечение "Octet" (V4.0, Fortebio). Затем загруженный биосенсор помещали в лунку, содержащую только буфер для измерения кинетики (разведенный в 10 раз в PBS) для определения константы диссоциации (k_d [1/с]). Анализ кинетики осуществляли для определения аффинности (K_D [М]) при использовании модели 1:1 (ленгмюр). В качестве положительного контроля использовали 0,2 мкг/мл IgG15D5, продуцируемого клетками HEK293.

В табл. 5 показано, что все антитела против с-Met связывают сMetECDHis с наномолярными аффинностями в диапазоне 0,6-13,9 нМ.

Таблица 5. Кинетические константы (k_a , k_d и K_D) антител при связывании с сMetECDHis

Клон	K_a [1/Мс]	k_d [1/с]	K_D [М]
5D5	2,14E+05	1,25E-03	5,86E-09
005	3,18E+05	2,52E-03	7,92E-09
006	4,25E+05	4,20E-03	9,89E-09
008	3,08E+05	1,57E-03	5,12E-09
022	2,36E+05	2,51E-04	1,06E-09
024	1,45E+05	2,28E-04	1,57E-09
035	2,64E+05	3,68E-03	1,39E-08
045	7,21E+05	2,07E-03	2,87E-09
058	4,64E+05	1,25E-03	2,70E-09
061	2,56E+05	1,53E-04	5,96E-10
062	2,73E+05	3,19E-04	1,17E-09
064	2,84E+05	3,24E-04	1,14E-09
068	3,21E+05	1,35E-03	4,21E-09
069	2,12E+05	2,67E-04	1,26E-09
096	1,96E+05	5,00E-04	2,55E-09
098	1,64E+05	2,97E-04	1,82E-09
101	1,69E+05	2,14E-04	1,27E-09
181	2,37E+05	5,31E-04	2,23E-09

Пример 15. Связывание антител против с-Met с мембрано-связанным с-Met на эпителиальных клетках макак-резусов, измеренное анализом FACS

Для определения кросс-реактивности с с-Met макак-резусов, связывание антител против с-Met с с-Met-положительными эпителиальными клетками макак-резусов (4MBr-5, приобретенными у ATCC) тестировали с помощью проточной цитометрии (FACS Canto II, BD Biosciences). Конъюгированное с фикоэритрином козье антитело против человеческих IgG (Jackson) использовали в качестве вторичного конъюгата. HuMab-KLN использовали в качестве изотипного контрольного антитела.

На фиг. 4 продемонстрировано, что все протестированные антитела против с-Met являются кросс-реактивными с с-Met макаки-резуса. В обеих протестированных концентрациях (0,5 и 10 мкг/мл) антите-

ла против с-Met были способны специфически связывать с-Met макаки-резуса. Для всех антител, сигнал был, по меньшей мере, в 5 раз выше, чем для изотипного контрольного антитела HuMab-KLN. Интересно, что P1016-035 продемонстрировал намного более высокие верхние уровни флуоресценции (MFI ~200 000) по сравнению с другими специфичными к с-Met антителами. Это различие не наблюдалось на клеточных линиях, экспрессирующих человеческий рецептор с-Met.

Пример 16. Блокирование связывания HGF с внеклеточным доменом с-Met, определенное с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (тИФА)

Для анализа возможности антител против с-Met блокировать связывание фактора роста гепатоцитов (HGF) с рецептором с-Met осуществляли тИФА. Для этого прикрепленный внеклеточный домен с-Met инкубировали с меченым антителом против с-Met и флуоресцентно меченным HGF. Неблокирующие антитела не конкурируют с меченым HGF за связывание с с-Met, что дает максимальный сигнал флуоресценции.

Блокирующие антитела конкурируют с меченым HGF за связывание с с-Met, что приводит к снижению флуоресцентного сигнала.

HGF (ProSpec Targy, Реховот, Израиль) флуоресцентно метили путем конъюгации с Европием³⁺ (PerkinElmer, Турку, Финляндия). Лунки для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C 0,5 мкг/мл рекомбинантным человеческим внеклеточным доменом с-Met (R&D systems, Миннеаполис, США), разведенным в PBS. Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды]) и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) PBST, дополненным 2% (об./об.) куриной сывороткой (Gibco, Пейсли, Шотландия). После отмывки PBST, лунки для тИФА инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре в темноте со смесью 50 мкл серийно разведенного антитела против с-Met (0,128-10000 нг/мл в 5-кратных разведениях) и HGF, конъюгированным с 50 мкл 0,44 мкг/мл Европия³⁺ в PBST. Затем несвязанный HGF, конъюгированный с Европием³⁺, отмывали PBST, а связанный HGF, конъюгированный с Европием³⁺, инкубировали в течение 30 мин при КТ в темноте с раствором "Delfia Enhancement Solution" (PerkinElmer) для усиления флуоресцентного сигнала. Среднюю интенсивность флуоресценции при 615 нм измеряли с помощью ридера "EnVision 2101 Multi-label reader" (PerkinElmer) со следующими устанавливаемыми параметрами: парное зеркало Lance/Delfia, фильтр эмиссии 615, фильтр возбуждения 340 нм, время задержки 400 мкс, окно 400 мкс, 100 вспышек, 2000 мкс на цикл и двунаправленное построчное считывание. Для определения значений IC₅₀, кривые связывания анализировали с помощью нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая "доза-эффект" с переменным наклоном, высшие значения ограничены общим значением для всех наборов данных) с помощью программного обеспечения "GraphPad Prism V4.03" (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фиг. 5 представлены характерные примеры кривых ингибирования связывания HGF антителами против с-Met, связывающими внеклеточный домен рекомбинантного человеческого с-Met. 5D5 использовали в качестве положительного контрольного антитела. Все антитела против с-Met в эксперименте продемонстрировали свою способность конкурировать с HGF, конъюгированным с Европием³⁺, за связывание с рекомбинантным с-Met. Значения IC₅₀ варьируют в диапазоне 0,0011-0,0794 мкг/мл. Без добавления HGF, конъюгированного с Европием³⁺, детектировали приблизительно 600 относительных флуоресцентных единиц (англ. relative fluorescent units, RFU), что указывает на уровень сигнала при достижении максимального ингибирования. Когда связывание HGF, конъюгированного с Европием³⁺, не ингибировалось, детектировали примерно ~66,000 RFU. Антитела 005, 006, 058, 101 и антитело положительного контроля 5D5 были способны ингибировать на 84,5-92,1% связывание HGF с рецептором с-Met. Все другие антитела были способны ингибировать связывание HGF с с-Met по меньшей мере на 55%. Поскольку HGF может связывать рецептор с-Met по обоим доменам SEMA и в Ig-области, некоторые антитела могут ингибировать только одно из этих взаимодействий. Для определения, какое из взаимодействий ингибировано, осуществляли анализ ингибирования на основе сMetSEMAHis резонансным переносом энергии флуоресценции с временным разрешением (англ. time-resolved fluorescence resonance energy transfer, TR-FRET).

Пример 17. Конкуренция антител против с-Met за связывание с растворимым сMetECDHis, измеренная с помощью сэндвич-тИФА.

Во-первых, определяли концентрации оптимального покрытия тестируемых антител против с-Met и оптимальную концентрацию сMetECDHis. Далее лунки для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C HuMab против с-Met, серийно разведенными в PBS (8 мкг/мл в 2-кратных разведениях). Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды]) и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) PBSTC (PBST, дополненный 2% (об./об.) куриной сывороткой [Gibco, Пейсли, Шотландия]). После этого, лунки для тИФА отмывали PBST и инкубировали в течение одного часа при комнатной температуре с биотинилированными сMetECDHis серийно разведенными в PBSTC (1 мкл/мл в 2-кратных разведениях). Несвязанный биотинилированный сMetECDHis отмывали с PBST, и связанный биотинилированный сMetECDHis инкубировали в течение 1 ч при КТ с 0,1 мкг/мл Стрептавидин-поли-HRP (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) разведенным в PBST.

После отмывки, реакцию визуализировали после 15-минутной инкубации с 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоной кислотой (ABTS: развести одну таблетку ABTS в 50 мл буфера ABTS [Roche Diagnostics, Алмер, Нидерланды]) при КТ с защитой от света. Окрашивание останавливали путем добавления равного объема щавелевой кислоты (Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряли с помощью ридера микротитрационных планшетов (Biotek Instruments, Винуски, США). Условия, которые приводили к субоптимальному (прим. 80%) связыванию каждого антитела, были определены и использованы для последующих экспериментов перекрестного блокирования.

Лунки для тИФА покрывали антителом против с-Met в субоптимальной дозе, как описано выше. После блокировки лунки для тИФА инкубировали с заданной концентрацией биотинилированного сMetECDHis в присутствии избытка антитела против с-Met. Реакция развивалась, как описано выше. Остаточное связывание было выражено как процент относительно связывания, наблюдаемого в отсутствии антитела-конкурента.

Таблица 6. При добавлении в качестве конкурента, все антитела против с-Met были способны конкурировать за связывание с их иммобилизованными эквивалентами. 022, 058 и 5D5, при добавлении в качестве антител-конкурентов, конкурировали с антителами 005 и 006. Однако в обратной реакции выявили только частичную конкуренцию антител 005 и 006. Эти отличия могут быть объяснены более низкими аффинностями антител 005 и 006 к биотинилированному сMetECDHis. Антитело 5D5, при добавлении в качестве антитела-конкурента, также демонстрировало частичную конкуренцию с антителами 008 и 045, тогда как в обратной реакции не наблюдали или наблюдали минимальную конкуренцию. Кроме того, антитела 024, 062, 064, 068 и 181 при добавлении в качестве антител-конкурентов демонстрируют частичную конкуренцию с антителом 101, тогда как обратная реакция продемонстрировала полное ингибирование связывания сMetECDHis. Значения выше чем 100% могут быть объяснены эффектами avidности и образованием комплексов антитело-сMetECDHis, содержащим два неконкурирующих антитела.

Антитела 024, 062, 064, 068, 069, 098, 101 и 181 конкурируют друг с другом за связывание с сMetECDHis. Антитела 005, 006, 022 и 058 рассматривались как принадлежащие к одной перекрестно-блокирующей группе, которая отличается полной конкуренцией с 005, 006, 022, 058 и 5D5. Однако антитело 5D5 было единственным антителом, которое также было способно конкурировать за связывание с антителом 045. Другая группа антител, которые конкурируют за связывание с сMetECDHis, образована из 008, 035 и G11-HZ.

Таблица 6. Конкуренция антител против с-Met за связывание с биотинилированным сMetECDHis

Иммобилизованное антитело	Конкурирующее антитело							
	005	006	008	022	024	035	045	058
005	7,7 ±1,1	18,2 ±3,6	81,9 ±3,1	4,9 ±1,3	113,5 ±5,0	84,9 ±0,2	116,9 ±7,0	3,6 ±0,1
006	11,3 ±0,9	14,6 ±0,7	58,8 ±2,2	4,6 ±0,3	113,3 ±1,0	67,5 ±4,2	114,5 ±3,5	3,6 ±0,3
008	63,9 ±3,1	47,3 ±1,2	5,4 ±0,3	82,1 ±3,0	103,2 ±0,4	32,9 ±1,0	100,4 ±3,8	40,8 ±0,8
022	37,9 ±3,9	60,5 ±4,0	94,1 ±3,5	3,8 ±1,2	99,4 ±4,8	92,4 ±0,4	95,7 ±3,5	5,8 ±0,0
024	98,4 ±10,4	101,4* ±16,7	104,2* ±12,7	100,2* ±9,0	5,4 ±0,5	108,1* ±5,8	98,1* ±11,9	102,8* ±12,8
035	36,7 ±1,0	33,0 ±17,6	7,2 ±1,7	54,6 ±6,5	121,4 ±27,8	10,6 ±0,3	125,0 ±16,8	18,5 ±2,5
045	111,4 ±1,5	110,6 ±3,5	98,5 ±3,1	105,3 ±2,5	102,4 ±5,6	105,4 ±5,5	21,3 ±0,1	115,3* ±6,5
058	31,4 ±3,6	43,6 ±2,1	90,2 ±2,5	6,8 ±0,3	109,0 ±4,1	90,1 ±5,4	111,7 ±4,9	4,0 ±0,2
062	95,8 ±5,1	95,2 ±6,8	97,4 ±5,3	94,6 ±4,0	7,3 ±2,9	90,6 ±11,5	97,0 ±3,0	94,4 ±4,3
064	90,4 ±1,9	90,1* ±1,4	94,6* ±0,5	94,2 ±3,6	7,5 ±2,5	83,5 ±12,2	95,0 ±4,9	95,5 ±0,6
068	101,1 ±7,6	98,5 ±6,7	101,7 ±5,5	99,6 ±4,0	4,7 ±2,3	88,6 ±12,7	100,4 ±9,0	101,5 ±5,1
069	102,3 ±11,2	100,3 ±12,3	102,1 ±12,8	97,8 ±12,5	6,6 ±4,1	91,7 ±27,3	99,8 ±14,4	100,6 ±14,1
098	99,6 ±6,3	97,9 ±6,7	99,8 ±4,2	95,8 ±5,4	12,9 ±4,2	89,4 ±20,6	96,7 ±3,7	98,6 ±2,9
101	91,5 ±7,2	89,7 ±7,9	94,0 ±6,3	90,7 ±5,3	40,5 ±5,4	96,7 ±1,9	94,7 ±5,1	93,1 ±5,2
181	95,9 ±7,8	93,7 ±8,4	98,7 ±5,8	92,5 ±7,4	4,3 ±1,9	96,0 ±9,6	96,8 ±6,7	98,9 ±9,8
5D5	42,3 ±14,7	58,8 ±19,4	90,2 ±9,9	12,4 ±4,7	94,2 ±9,7	98,1	83,9 ±13,4	6,6 ±3,2
G11-HZ	50,5 ±7,6	47,7 ±2,9	33,3 ±0,2	54,3 ±3,7	98,8 ±5,6	32,8 ±4,0	72,0 ±9,9	27,6 ±4,3

Конкуренция 75 -> 100%

Конкуренция 25-74% конкуренция 0-24%

Иммобилизованное антитело	Конкурирующее антитело								
	062	064	068	069	098	101	181	5D5	G11-HZ
005	117,7 ±10,7	118,2 ±7,8	128,7 ±9,5	124,0 ±8,0	110,4 ±7,6	103,2 ±5,0	131,0 ±7,7	2,9 ±0,1	76,8 ±4,4
006	118,8 ±8,4	122,2 ±5,3	128,6 ±6,5	124,5 ±1,0	110,6 ±2,3	105,9 ±4,1	123,5 ±6,1	3,1 ±0,0	54,0 ±35,1
008	100,5 ±2,5	107,1 ±6,2	112,2 ±5,1	104,1 ±4,4	106,6 ±2,6	101,0 ±2,5	111,3 ±1,3	32,4 ±0,8	2,7 ±0,2
022	99,4 ±2,0	101,9 ±3,2	104,1 ±3,3	99,6 ±6,0	104,8 ±4,0	103,6 ±5,1	107,1 ±5,2	4,2 ±2,1	85,9 ±8,3
024	2,3 ±0,6	2,3 ±0,6	12,0 ±5,5	2,9 ±0,5	10,4 ±4,2	4,8 ±1,0	7,1 ±2,8	95,5* ±1,1	98,2* ±1,3
035	119,6 ±11,2	131,7 ±20,0	175,1 ±30,2	150,9 ±24,9	126,2 ±19,9	113,0 ±4,6	159,1 ±12,9	25,5 ±9,9	7,8 ±3,2
045	103,1 ±3,5	103,7 ±5,7	113,1 ±1,4	97,0 ±5,2	76,4 ±11,7	101,5 ±5,1	99,4 ±3,8	27,8 ±3,9	99,3 ±5,3
058	109,1 ±4,6	108,8 ±4,4	118,8 ±4,2	112,6 ±4,0	111,8 ±6,2	104,4 ±0,8	121,3 ±3,1	2,8 ±0,4	81,5 ±8,6
062	2,4 ±0,5	2,2 ±0,2	14,2 ±1,8	2,9 ±0,1	13,2 ±0,9	7,8 ±1,1	9,4 ±1,6	97,7 ±8,5	101,3 ±0,9
064	2,2 ±0,6	2,0 ±0,2	13,0 ±0,9	2,7 ±0,2	14,7 ±1,2	7,6 ±0,8	10,1 ±3,0	94,9* ±4,6	102,0 ±10,5
068	2,0 ±0,3	2,0 ±0,3	6,6 ±0,7	2,4 ±0,4	8,2 ±1,3	4,8 ±0,7	5,2 ±0,6	94,8 ±2,7	110,3 ±6,6
069	2,2 ±0,4	2,3 ±0,5	10,1 ±2,6	2,4 ±0,7	12,5 ±3,1	3,9 ±0,5	6,3 ±1,0	99,4 ±16,2	110,4 ±13,2
098	8,8 ±0,6	9,3 ±1,3	18,0 ±2,5	3,4 ±0,6	2,6 ±0,4	4,0 ±0,6	12,0 ±2,1	94,9 ±1,2	99,6 ±1,2
101	36,9 ±3,3	37,4 ±3,7	45,9 ±4,3	9,5 ±1,2	9,7 ±1,5	3,7 ±2,4	41,9 ±0,8	97,2 ±4,6	98,3 ±2,1
181	2,0 ±0,2	2,1 ±0,3	6,5 ±1,1	2,2 ±0,3	5,1 ±1,1	2,4 ±0,2	3,6 ±0,2	94,2 ±4,5	98,7 ±6,7
5D5	97,6 ±8,1	97,1 ±12,7	97,8 ±6,6	99,6 ±3,9	97,6 ±4,9	97,9 ±10,6	103,4 ±4,3	4,1 ±1,5	97,3
G11-HZ	95,3 ±3,1	99,2 ±0,6	102,6 ±1,3	95,0 ±8,4	96,2 ±11,8	90,1 ±6,8	101,1 ±5,2	29,1 ±9,2	2,6 ±0,4

Представленные данные являются процентом ингибирования связывания \pm ст. откл. 3 независимых экспериментов. Для антител 035, 5D5 и G11-HZ перекрестно-блокирующий тИФА осуществляли только дважды. Кроме того, несколько конкурентных реакций (*) давших значения Оптимальной плотности выше, чем 5,0, которые выше предела детекции ридера для тИФА. Эти результаты были исключены из анализа в результате повторных измерений.

Пример 18. Блокирование связывания HGF с cMetSEMA-567His8, определенное анализом резонансного переноса энергии флуоресценции с временным разрешением (TR-FRET)

HGF может связывать рецептор c-Met как в домене SEMA, так и в IgG-области. Однако только связывание HGF с доменом SEMA оказалось критическим для активации рецептора. По этой причине, с помощью технологии TR-FRET было исследовано взаимодействие антител против c-Met с доменом SEMA рецептора c-Met. Для осуществления данного анализа на основе однородного сближения, фактор роста гепатоцитов (HGF, ProSpec Tarry, Реховот, Израиль) конъюгировали с флуоресцентным красителем-акцептором AlexaFluor-647 (Invitrogen, Бреда, Нидерланды). cMetSEMA-567His8 метили флуоресцентной донорной молекулой, направленной против гистидиновой метки (Anti-6xhis Europium³⁺, PerkinElmer, Турку, Финляндия). Связывание HGF, конъюгированного с AlexaFluor-647, с меченным Европием³⁺ cMetSEMA-567His8 делает возможным перенос энергии с донорной молекулы (возбуждение 340 нм) на акцепторную молекулу (эмиссия 665 нм). Среднюю интенсивность флуоресценции при 665 нм измеряли на ридере "EnVision 2101 Multilabel reader" (PerkinElmer). Конкуренцию немеченных антител против c-Met с HGF, конъюгированным с AlexaFluor-647, измеряли по уменьшению сигнала TR-FRET при 665 нм, из-за того, что в несвязанном состоянии дистанция между донорным и акцепторным флуорофорами слишком большая для осуществления переноса энергии.

Все разведения были сделаны в 0,5x буфере для детекции "LANCE Detection Buffer" (PerkinElmer), дополненном 2,67% стабилизирующим раствором (PerkinElmer) и 0,03% (об./об.) Tween-20 (Riedel de Haen, Зельце, Германия). 25 мкл cMetSEMA-567His8 добавляли к 25 мкл HGF, конъюгированного с AlexaFluor-647, 35 мкл "Anti-6xhis Europium³⁺" и 25 мкл немеченого антитела против c-Met в 96-луночном планшете "opti-white" (PerkinElmer). Была получена конечная концентрация 2,93 мкл/мл cMetSEMA-567His8, 0,96 мкл/мл HGF, конъюгированного с AlexaFluor-647 и 0,4 мкл/мл "Anti-6xhis Europium³⁺". Тестировали 4-кратное серийное разведение немеченого антитела против c-Met в диапазоне 0,49-8000 нг/мл. После инкубирования при 4°C в темноте в течение ночи. Среднюю интенсивность флуоресценции при 665 нм измеряли с помощью ридера "EnVision 2101 Multilabel reader" (PerkinElmer) со следующими устанавливаемыми параметрами: парное зеркало Lance/Delfia, фильтр эмиссии 615-665 нм, фильтр воз-

буждения 320 нм, время задержки 60 мкс, окно 100 мкс, 100 вспышек, 2000 мкс на цикл и двунаправленное построчное считывание. Для определения значений IC_{50} кривые связывания анализировали с помощью нелинейной регрессии (сигмоидальная кривая "доза-эффект" с переменным наклоном) с помощью программного обеспечения "GraphPad Prism V4.03" (GraphPad Software, Сан-Диего, Калифорния, США).

На фиг. 6 представлены кривые ингибирования связывания различных антител, связывающих Met, при связывании с cMetSEMA_567His8, протестированные с помощью TR-FRET. За исключением антител 008, 035 и 096, все антитела были способны конкурировать с HGF, конъюгированным с AlexaFluor-647, за связывание с cMetSEMA-567His8. Антитело 022 было способно ингибировать ~80% связывания HGF, тогда как антитела 005, 006, 024, 045, 058, 061, 062, 064, 068, 069, 101, 181 и антитело положительного контроля 5D5 были способны ингибировать >90% связывание HGF с cMetSEMA-567His8. Определили значения IC_{50} , которые находятся в диапазоне 0,082-0,624 мкг/мл.

Таблица 7. Значения IC_{50} (мг/мл) и процент ингибирования антителами против с-Met связывания лиганда с cMetSEMA-567His8, определенные с помощью TR-FRET

мАТ	IC_{50}	% ингибирования
005	0,16	92
006	0,16	92
008	н.о.	4
022	0,37	77
024	0,39	95
035	н.о.	19
045	0,17	92
058	0,15	99
061	0,49	96
062	0,58	97
064	0,07	97
068	0,26	96
069	0,54	97
096	н.о.	16
098	0,55	98
101	0,53	96
181	0,34	93
5D5	0,2	95

Представленные данные являются средним MFI трех независимых экспериментов.

Пример 19. Анализ жизнеспособности КР4

Антитела против с-Met тестировали по их способности ингибировать жизнеспособность клеток КР4 (Riken BioResource Center Cell Bank, RCB1005). Клетки КР4, которые аутокринным образом экспрессируют высокие уровни как с-Met, так и HGF, рассеивали в 96-луночной культуральной планшете (Greiner bio-one, Фрикенхаузен, Германия) (10000 клеток/луночка) в бессывороточной среде (1 часть HAM's F12K [Cambrex, Ист-Резерфорд, Нью-Джерси] и 1 часть DMEM [Cambrex]). Получали 66,7 нМ разведение антитела с-Met в бессывороточной среде и добавляли к клеткам. Через 3 дня инкубации, количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью "Alamarblue" (BioSource International, Сан-Франциско, США) согласно инструкции производителя. Флуоресценцию отслеживали с помощью ридера "EnVision 2101 Multilabel reader" (PerkinElmer, Турку, Финляндия) со стандартными параметрами для "Alamarblue". Сигнал "Alamarblue" обработанных антителом клеток наносили на диаграмму в виде процента сигнала по сравнению с необработанными клетками.

На фиг. 7 изображено процентное ингибирование жизнеспособных клеток КР4 после обработки антителом, связывающим с-Met, по сравнению с необработанными клетками (0%). Окаймленные рамкой клоны являются антителами, которые перекрестно конкурируют друг с другом как описано в примере 17. Интересно, что антитела 024, 062, 064, 068, 069, 098, 101 и 181, которые принадлежат к одной перекрестно-блокирующей группе, все были способны ингибировать жизнеспособность КР4 (18-46%), как в виде IgG1, так и в виде молекул "UniBody". Также молекулы IgG1 антител 008, 061 и 096 были способны ингибировать жизнеспособность КР4. Напротив, антитело 045 не ингибирует жизнеспособность КР4 ни в виде IgG1, ни в виде молекулы "UniBody". Для Uni-1016-045-TE это возможно происходит из-за его низкой кажущейся аффинности к мембраносвязанному с-Met, что измерено с помощью анализа FACS (пример 13). Антитела IgG1 клонов 005, 006, 022 и 058 не ингибируют значимым образом жизнеспособность КР4, тогда как Uni-1016-022-TE, Uni-1016-058-TE и IgG1-1016-058-wtFab ингибировали жизнеспособность КР4 на 57, 38 и 44% соответственно. Uni-1016-005 и Uni-1016-006 также перекрестно конкурируют с клонами 022 и 058, но не ингибируют значимым образом жизнеспособность КР4. Это возможно происходит из-за их низких кажущихся аффинностей, измеренных анализом FACS (пример 13). Интересно, что IgG4-1016-058 также продемонстрировал некоторое ингибирование жизнеспособности КР4. Этого не наблюдалось с IgG4-5D5).

В целом данные указывают на то, что в некоторых перекрестно-блокирующих группах, для ингибирования жизнеспособности КР4 требуется моновалентное связывание, тогда как в других перекрестно-

блокирующих группах жизнеспособность КР4 могут ингибировать как моновалентно, так и бивалентно связывающие антитела.

Пример 20. Опухолевая модель на основе ксенотрансплантата КР4 в SCID-мышьях

Опухолевую модель на основе ксенотрансплантата в SCID-мышьях использовали для определения эффективности HuMab против с-Met при ингибировании опухолевого роста *in vivo*. Семи-одиннадцати недельные самки SCID-мышьях, линии C.B-17/IcrPrkdc-scid/CRL, приобрели у "Charles River Laboratories Nederland" (Маастрихт, Нидерланды) и содержали в стерильных условиях в клетках с верхним фильтром с кормом и водой, которые предлагались *ad libitum*. Для идентификации мышьях использовали микрочипы (PLEXX BV, Элст, Нидерланды). Все эксперименты были одобрены комитетом по этике отношения к животным университета Утрехта.

В день 0, 10×10^6 клеток КР4 инокулировали подкожно в 200 мкл PBS в правый бок. Мышьях проверяли, по меньшей мере, дважды в неделю по клиническим признакам заболевания. Размер опухоли определяли, по меньшей мере, раз в неделю. Объемы (мм³) рассчитывали после измерений штангенциркулем (PLEXX) как $0,52 \times (\text{длина}) \times (\text{ширина})^2$, начиная с 16 дня. На 9 день измеряли средние размеры опухолей и мышьях разделяли на 8 групп по 7 мышьях в каждой. Антитела против с-Met (008, 058, 069 и 098) инъецировали внутривенно. Антитело G11-HZ использовали в качестве антитела положительного контроля, тогда как антитела 5D5 и изотипного контроля использовали в качестве антител отрицательного контроля. Мышьях получали насыщающую дозу 400 мкг/мышьях с последующей еженедельной поддерживающей дозой 200 мкг/мышьях, в течение 7 недель.

Дополнительно образцы плазмы, собирали до введения 1, 3 и 5 поддерживающей дозы, а затем мышьях умерщвляли, и определяли наличие человеческих IgG с помощью латексных гранул на нефелометре "BNII" (Dade Behring, Аттербури, Великобритания).

На фиг. 8 и 9 показано, что опухолевый рост клеток КР4 ингибировали HuMab 008, 069, 098 и положительный контроль G11-HZ. Ингибирование сравнивали с обработкой антителом изотипического контроля. Опухолевый рост клеток КР4 был замедлен, но не был полностью ингибирован контрольным антителом G11-HZ. Клоны 069 и 098 продемонстрировали более мощное ингибирование по сравнению с клонами 008 и G11-HZ. Антитела 5D5 и 058 не ингибировали опухолевый рост. Это согласовалось с данными *in vitro*, описанными в примере 19. В совокупности, эти данные указывают на то, что в некоторых перекрестно-блокирующих группах бивалентно связывающие антитела могут ингибировать рост опухоли КР4.

Пример 21. Опухолевая модель на основе ксенотрансплантата MKN45

Опухолевую модель ксенотрансплантата человеческой аденокарциномы желудка MKN45 в голых мышьях использовали для определения эффективности HuMab против с-Met при ингибировании опухолевого роста *in vivo*.

Клетки человеческой аденокарциномы желудка MKN45 культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде RPMI-1640, содержащей 100 единиц/мл натриевой соли пенициллина G, 100 мкг/мл сульфата стрептомицина, 25 мкг/мл гентамицина, 20% фетальной бычьей сыворотки и 2 mM глутамин. Использовали семи-восьми недельных самок голых мышьях (nu/nu, Harlan) (массы тела в диапазоне от 17,0 до 26,4 г в начале исследования). Животные получали воду и корм *ad libitum*. Мышьях размещали в условиях, удовлетворяющих рекомендациям руководства по уходу и использованию лабораторных животных. Уход за животными и программа использования были аккредитованы AAALAC. В 0 день, 1×10^7 клеток MKN45 инокулировали подкожно в 200 мкл 50% матригеля в PBS в бок каждой мышьях. В 7 день, животных рассортировали в пять групп (n=10) со средним объемом опухоли от 80 до 120 мм³ и начали обработку. Антитела против с-Met (008, 058, 069) инъецировали в хвостовую вену (в.в.). Антитело G11-HZ использовали в качестве антитела положительного контроля, а антитело изотипического контроля использовали в качестве антитела отрицательного контроля. Все мышьях получили 40 мг/кг антитела на 7 день и 20 мг/кг антитела на 14, 21 и 28 день.

Опухоли измеряли дважды в неделю с помощью штангенциркуля до конечного объема опухоли 700 мм³ или до конца исследования (день 62). На фиг. 10 и 11 показано, что рост опухоли клеток MKN45 был значительно замедлен антителами 008, 058, 069, и контрольным антителом G11-HZ по сравнению с обработкой антителом изотипического контроля.

Пример 22. Снижение остаточной агонистической активности IgG1-антител против с-Met путем ослабления конформационной гибкости

Естественный лиганд с-Met, HGF, является функциональным димером, который индуцирует димеризацию двух молекул с-Met. Последующее внутриклеточное фосфорилирование внутриклеточного домена с-Met приводит к активации нескольких сигнальных путей, которые вовлечены в пролиферацию, инвазию и выживание клеток. Большинство бивалентных антител, индуцированных против с-Met, демонстрируют сравнимые с HGF эффекты на направление развития клеток, особенно когда связываемые антителом эпитопы в с-Met расположены около или в домене SEMA.

Для минимизации потенциальной остаточной агонистической активности бивалентных антител IgG1, была использована стратегия уменьшения конформационной гибкости. В IgG1 у плечей Fab есть

Нидерланды]) и блокировали в течение одного часа при комнатной температуре (КТ) PBSTC (PBST, дополненный 2% (об./об.) куриной сывороткой [Gibco, Пейсли, Шотландия]). После этого, лунки отмывали PBST и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с антителами против с-Met и вариантами, серийно разведенными в PBSTC (10 мкл/мл в 4-кратных разведениях). Несвязанное антитело отмывали с помощью PBST, и антитело, связанное с покрытием определяли при инкубации в течение одного часа при КТ с козьими F(ab')₂-HRP против человеческих IgG, разведенных в PBST (Jackson cat.no. 109-035-097). После отмывки, реакцию визуализировали 15-минутной инкубацией с 2,2'-азино-бис (3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой (ABTS: развести одну таблетку ABTS в 50 мл буфера ABTS [Roche Diagnostics, Алмер, Нидерланды]) при КТ с защитой от света. Окрашивание останавливали путем добавления равного объема щавелевой кислоты (Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряли с помощью ридера микротитрационных планшетов (Biotek Instruments, Винуски, США). Все мутанты связывались с с-Met со сравнимой наблюдаемой аффинностью (EC50) (фиг. 14). В табл. 10 представлены значения EC50 мутантов, полученных в данном эксперименте.

Таблица 9. Значения EC₅₀, определенные с помощью ТИФА

	IgG1-1016-069	IgG1-1016-069-ДС220	IgG1-1016-069-С220S	IgG1-1016-069-Шарнир IgG2	IgG2-1016-069	IgG1-1016-069-ТН7Δ6-9	Uni-1016-069-ТЕ	IgG1-1016-069	IgG1-1016-069-Шарнир IgG3	Uni-IgG1-1016-069
EC50 (нг/мл)	49,5	18,87	15,56	23,03	29,61	18,81	30,08	45,43	14,18	15,39

Пример 25. Сниженный агонистический эффект жестких IgG1-антител против с-Met

Фосфорилирование рецепторов

Для определения агонистических свойств защищенных антител исследовали воздействие антител на фосфорилирование с-Met. После димеризации двух соседствующих рецепторов с-Met либо естественным лигандом HGF, либо большинством бивалентных антител, три остатка тирозина (позиции 1230, 1234 и 1235) во внутриклеточном домене с-Met становятся перекрестно фосфорилированными, после чего происходит дальнейшее фосфорилирование нескольких других аминокислот внутриклеточного домена и активация нескольких сигнальных каскадов. Димеризацию и активацию с-Met можно, следовательно, отслеживать с помощью антител, специфичных к фосфорилированному в этих позициях рецептору, и таким образом можно использовать в качестве данных о потенциальном агонизме антител против с-Met.

Клетки A549, CCL-185 полученные из АТСС, выращивали в сыворотке, содержащей среду DMEM, до достижения 70% конfluence. После трипсинизации и отмывки клетки рассеивали в 6-луночном культуральном планшете по 1*10⁶ клеток/лунку, в культуральную среду, содержащую сыворотку. После ночной инкубации клетки обрабатывали либо HGF (R&D systems; cat. 294-HG) (50 нг/мл), либо панелью антител (30 мкг/мл) и инкубировали в течение 15 мин при 37°C. Клетки затем отмывали дважды ледяным PBS и лизировали буфером для лизирования (Cell Signaling; cat. 9803) дополненным коктейлем ингибиторов протеаз (Roche; cat. 11836170001), образцы хранили при -80°C. Активацию рецептора определяли измерением фосфорилирования посредством вестерн-блоттинга с помощью антител, специфичных к фосфо-с-Met. Белки в клеточном лизате разделяли на 4-12% геле ДСН-ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану, которую затем окрашивали антителом, специфичным к фосфорилированному с-Met (Y1234/1235) (Cell Signaling, cat: 3129). Для контроля загрузки геля использовали антитела против общего с-Met и бета-актина. Результаты вестерн-блоттинга представлены на фиг. 15.

Контроли среды тканевой культуры и клетки, обработанные моновалентным форматом UniBody антитела 5D5, не продемонстрировали фосфорилирования рецептора. Напротив, вестерн-блоттинг клеток, обработанных положительным контролем HGF или антителом-агонистом IgG1-1016-058, продемонстрировал четкую полосу ожидаемой массы. Антитело IgG1-1016-069 продемонстрировало низкое, но детектируемое фосфорилирование рецептора, что указывает на то, что имеет место некоторое перекрестное связывание рецептора. Однако варианты, которые были разработаны для уменьшения гибкости молекулы антитела, продемонстрировали минимальную активацию рецептора, вплоть до уровня, сравнимого с уровнями детектируемыми в клетках, обработанных моновалентным контролем Uni-5D5-TE (фиг. 15).

Эффект антител с-Met на пролиферацию NCI-H441 in vitro

Потенциальную пролиферативную агонистическую активность антител против с-Met тестировали с помощью клеточной линии легочной аденокарциномы NCI-H441 (АТСС, НТВ-174TM), которая экспрессирует высокие уровни с-Met, но не продуцирует его лиганд HGF. Клетки NCI-H441 рассеивали в 96-луночные планшеты для тканевых культур (Greiner bio-one, Фриккенхаузен, Германия) (5000 клеток/лунку) в RPMI (Lonza) без сыворотки. Разведения антитела против с-Met (66,7 нМ) готовили в RPMI без сыворотки и добавляли к клеткам. Через 7 дней инкубации при 37°C/5% CO₂, количество жизнеспособных клеток подсчитывали с помощью "Alamarblue" (BioSource International, Сан-Франциско, США) согласно инструкции производителя. Флуоресценцию отслеживали с помощью ридера "EnVision 2101 Multilabel reader" (PerkinElmer, Турку, Финляндия) со стандартными параметрами для "Alamarblue".

Как видно из фиг. 17 пролиферация клеток NCI-H441 сильно индуцируется агонистическими кон-

трольными мАТ IgG1-058 и IgG1-5D5. Антитело IgG1-1016-069 также продемонстрировало агонистический эффект по сравнению с клетками, обработанными изотипическим контролем. Агонистическая активность IgG1-1016-069 может быть полностью устранена путем введения мутаций в C220, C220S и -del, и частично вариантами с шарниром IgG2 и TH7Δ6-9 или с каркасом IgG2. Контрольные образцы, обработанные изотипным контролем и моновалентной версией 5D5 (Uni-5D5-TE), не индуцировали рост клеток.

Анализ жизнеспособности КР4

Способность ингибировать HGF-зависимые клетки также была определена для мутантов антитела против с-Met в анализе жизнеспособности КР4 (см. пример 19 для экспериментальных процедур). Результаты представлены на фиг. 17. Эффективность мутантов на основе IgG1-1016-069 полностью сохранялась или была незначительно лучше в C220-мутантах. Примечательно, что внесение мутации в C220 в агонистическое антитело 5D5 приводит к значительному снижению жизнеспособности КР4. Отсутствие агонистического эффекта у антител 058 и 5D5 в формате IgG1 наблюдали из-за высокой экспрессии HGF клетками КР4 (аутокринная петля HGF).

Отрицательная модуляция

Отрицательная модуляция, индуцированная антагонистическими антителами, представляет собой механизм действия терапевтических антител против с-Met. Соответственно, в одном воплощении искомыми являются антитела с пониженными агонистическими свойствами, но с сохранившейся способностью индуцировать отрицательную модуляцию с-Met. Для определения отрицательного потенциала антител, клетки A549 (CCL-185, полученные из ATCC) рассеивали в 6-луночные планшеты для тканевых культур (500 000 клеток/лунку) в клеточную культуральную среду с сывороткой и культивировали в течение ночи при 37°C. На следующее утро антитела против с-Met добавляли в конечной концентрации 10 мкг/мл и планшет инкубировали следующие 2 дня при 37°C. После отмывки PBS, клетки лизировали инкубацией в течение 30 мин при комнатной температуре с 250 мкл буфера для лизиса (Cell signaling, Данверс, США). Общий белок подсчитывали с помощью реактива для определения белка с бичинхолиновой кислотой (англ. bichinchoninic acid, BCA) (Pierce), следуя протоколу производителя. Уровни белка с-Met в клеточных лизатах подсчитывали с помощью специфичного к с-Met сэндвич-тИФА. С этой целью, лунки планшетов для тИФА покрывали в течение ночи при 4°C козьим антителом против человеческого с-Met, направленного против внеклеточного домена с-Met (R&D systems), разведенным в PBS (1 мкг/мл). Затем лунки для тИФА отмывали PBST (PBS, дополненный 0,05% Tween-20 [Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды]) и блокировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) PBSTC (PBST, дополненный 2% (об./об.) куриной сывороткой [Gibco, Пейсли, Шотландия]). Добавляли неразведенные клеточные лизаты (100 мкл) и инкубировали один час при КТ. После отмывки PBST лунки инкубировали один час при комнатной температуре с мышинным антителом против внутриклеточного остатка тирозина-1234 человеческого с-Met (Cell signaling), разведенного 1:1000 в PBSTC. Лунки опять отмывали PBST и инкубировали в течение 1 ч при КТ с козьим антителом против мышинового Fc-HRP (Jackson), разведенным 1:5000 в PBSTC. После отмывки PBST, реакцию визуализировали после 30-минутной инкубации с 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой кислотой) (ABTS: развести одну таблетку ABTS в 50 мл буфера ABTS [Roche Diagnostics, Алмер, Нидерланды]) при КТ с защитой от света. Окрашивание осанавливали путем добавления равного объема щавелевой кислоты (Sigma-Aldrich, Звейндрахт, Нидерланды). Флуоресценцию при 405 нм измеряли с помощью ридера микротитрационных планшетов (Biotek Instruments, Винуски, США). Как видно из фиг. 18 все мутанты антитела 069 были способны индуцировать отрицательную модуляцию.

Пример 26. Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность (ADCC)

Клетки MKN45 (приобретенные у RIKEN BioResource Center, Цукуба, Япония, RCB1001) собирали (5×10^6 клеток), отмывали (дважды в PBS, 1500 об./мин, 5 мин) и собирали в 1 мл среды RPMI 1640, дополненной 10% сывороткой CCS (cosmic calf serum) (HyClone, Логан, Юта, США), к которой добавляли 200 мкКи ^{51}Cr (Хром-51; Amersham Biosciences Europe GmbH, Розендал, Нидерланды). Смесь инкубировали в перемешиваемой водяной бане в течение 1,5 ч при 37°C. После отмывки клеток (дважды в PBS, 1500 об./мин, 5 мин), клетки ресуспендировали в среде RPMI 1640, дополненной 10% CCS, подсчитывали по включению трипанового синего и разводили до концентрации 1×10^5 клеток/мл.

При этом мононуклеарные клетки периферической крови выделяли из свежих лейкоцитомоноцитарных слоев (Sanquin, Амстердам, Нидерланды) с помощью стандартного центрифугирования в градиенте плотности фиколла согласно инструкциям производителя (среда для отделения лимфоцитов; Lonza, Вервьё, Франция). После ресуспендирования в среде RPMI 1640, дополненной 10% CCS, клетки подсчитывали по включению трипанового синего и концентрировали до 1×10^7 клеток/мл.

Для каждого эксперимента ADCC, 50 мкл меченных ^{51}Cr клеток MKN45 (5000 клеток) предварительно инкубировали с 15 мкг/мл антитела против с-Met в конечном объеме 100 мкл среды RPMI, дополненной 10% CCS, в 96-луночном микротитрационном планшете. После 15 минут при КТ, добавляли 50 пкл РВМС (500,000 клеток), с получением соотношения эффектора к мишени 100:1. Максимальное количество лизиса клеток определяли инкубацией 50 мкл меченных ^{51}Cr клеток MKN45 (5000 клеток) с 100

мкл 5% Triton-X100. Количество спонтанного лизиса определяли инкубацией 5000 меченных ^{51}Cr клеток MKN45 в 150 мкл среды, без антитела или клеток-эффекторов. Уровень антитело-независимого лизиса клеток определяли инкубацией 5000 клеток MKN45 с 500000 РВМС без антитела. Затем клетки инкубировали 4 ч при 37°C, 5% CO₂. Клетки центрифугировали (1200 об./мин, 3 мин) и 75 мкл надосадочной жидкости переносили в микронные пробирки, после которых подсчитывали ^{51}Cr с помощью счетчика гамма-излучения. Измеренные импульсы в минуту (имп./мин) использовали для расчета процента опосредованного антителами лизиса следующим образом:

$$(\text{имп./мин. образца} - \text{имп./мин. антитело-независимого лизиса}) / (\text{имп./мин. макс. лизис} - \text{имп./мин. спонтанного лизиса}) \times 100\%$$

В различных публикациях продемонстрирована корреляция между сниженным фикоэлированием кора и повышенной активностью ADCC *in vitro* (Shields RL. 2002 JBC; 277:26733-26740, Shinkawa T. 2003 JBC; 278(5):3466-3473). На фиг. 19 показано, что антитело 069 не индуцирует лизис клеток MKN45 через ADCC. Однако когда фукоэлирование кора было снижено из-за присутствия кифунензина в процессе продуцирования МАТ в клетках НЕК, антитело 069 было способно индуцировать больше 30% лизиса клеток MKN45. Более того, лизис уже наблюдался при концентрациях антител ниже 0,01 мкг/мл. Представленные значения являются средними максимальными процентами высвобождения $^{51}\text{Cr} \pm$ станд. откл. из одного репрезентативного *in vitro* ADCC эксперимента с клетками MKN45. Антитело 069 с низким уровнем фукозы вырабатывалось в клетках НЕК 293 в присутствии кифунензина, что дает ~99,5% не коровое фукоэлирование (т.е. отсутствие фукозы). Антитело 069 с высоким уровнем фукозы вырабатывались в клетках НЕК 293 без кифунензина, что дает ~2,11% не коровое фукоэлирование, что определено высокоэффективной анионообменной хроматографией, соединенной с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAD) (данные не показаны).

Пример 27. Утрата связывания антител против с-Met с человеческими клетками периферической крови

Для выяснения связывания клона 069 с тремя типами клеток (В-клетки, моноциты и гранулоциты), присутствующими в периферической крови, осуществили анализ связывания с помощью FACS. Флуоресцентно меченый клон 069 использовали для прямого измерения на FACS без использования вторичных детектирующих антител. Клеточные популяции в крови были идентифицированы в анализе с помощью флуоресцентных коммерческих антител против специфических маркеров на представляющих интерес клетках.

Периферическую кровь из здоровых волонтеров (Медицинский центр Университета Утрехта) разводили в десять раз в буфере для FACS (PBS + 0,4% BSA + 0,02% NaN₃) и инкубировали с антителами против с-Met, конъюгированными с Alexa⁴⁸⁸, и антителами против CD19, CD16 и CD14, конъюгированными с FITC (конечная концентрация 10 пг/мл), и антителами против CD19, CD16 и CD14, меченными фикоэретрином (BD Biosciences, Сан-Хосе, Калифорния) для идентификации клеточных популяций (соответственно В-клеток, гранулоцитов и моноцитов) в конечном объеме 100 мкл. После 30 минут при 4°C, образцы центрифугировали (300 g, 3 мин), надосадочную жидкость удаляли, эритроциты лизировали инкубацией (10 мин, 4°C) с 200 мкл раствора "Ery-lysis solution" (155 mM NH₄Cl, 10 mM KHCO₃, 0,1 mM EDTA [pH 7.4]), и отмывали образцы дважды в буфере для FACS. Образцы ресуспендировали в 100 мкл буфера для FACS и анализировали с помощью "FACS Canto II" (BD Biosciences).

Фиг. 20 представляет диаграмму FACS, в которой показано, что 069, конъюгированное с Alexa⁴⁸⁸, не связывало популяцию В-клеток (CD19-PE⁺ клетки в пределах окна лимфоцитов). Связывание конъюгированного с Alexa⁴⁸⁸ ритуксимаба использовали в качестве положительного контроля. Связывание с другими клеточными популяциями анализировали таким же образом, и характерные результаты для одного из 3 доноров также помещены на диаграмму на фиг. 21. Антитело 069-Alexa⁴⁸⁸ не связывает В-клетки, моноциты или гранулоциты, тогда как антитела положительного контроля демонстрировали специфическое связывание.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело, которое связывает с-Met человека, где антитело содержит область VH, включающую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 194, 195 и 196, и область VL, включающую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 209, 210 и 104.

2. Антитело по п.1, содержащее:

а) область VH, включающую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 98, 99 и 100, и область VL, включающую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 102, 103 и 104, или

б) область VH, включающую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 130, 131 и 132, и область VL, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 134, 135 и 136.

3. Антитело по п.1 или 2, содержащее:

а) область VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 97, и предпочтительно область VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 101,

б) область VH, содержащую последовательность SEQ ID NO: 129, и предпочтительно область VL,

содержащую последовательность SEQ ID NO: 133, или

с) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет не более 1, 2 или 3 консервативных аминокислотных модификаций.

4. Моноклональное антитело, которое связывает с-Met человека, где антитело содержит область VH, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 189, 190 и 60, и область VL, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 62, 63 и 207.

5. Антитело по п.4, содержащее область VH, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностью SEQ ID NO: 58, 59 и 60, и область VL, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID №: 62, 63 и 64.

6. Антитело по п.4 или 5, содержащее:

а) область VH, включающую последовательность SEQ ID NO: 57, и предпочтительно область VL, содержащую последовательность SEQ ID NO: 61, или

б) вариант любого из указанных антител, где указанный вариант предпочтительно имеет не более 1, 2 или 3 консервативных аминокислотных модификаций.

7. Антитело по любому из пп.1-6, которое связывает домен SEMA с-Met, предпочтительно антитело способно ингибировать связывание HGF с доменом SEMA с IC50 менее 10 мкг/мл, например менее 2 мкг/мл.

8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с клетками A431 с EC50 10 нМ или менее, например EC50 2 нМ или менее.

9. Антитело по п.1, где антитело представляет собой бивалентное антитело.

10. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с с-Met с константой аффинности (KD) 20 нМ или менее, такой как аффинность 5 нМ или менее.

11. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое связывается с с-Met макаки-резус, предпочтительно для которого сигнал связывания антитела с с-Met макаки-резус по меньшей мере в 5 раз превышает сигнал для антитела отрицательного контроля.

12. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело ингибирует связывание HGF с внеклеточным доменом с-Met, предпочтительно где антитело ингибирует связывание более чем на 40%, например более чем на 50%, например более чем на 60%, например более чем на 70%, например более чем на 80%, например более чем на 90%.

13. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое способно ингибировать жизнеспособность клеток KP4, предпочтительно где антитело способно ингибировать жизнеспособность более чем на 10%, например более чем на 25%, например более чем на 40%.

14. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело представляет собой полноразмерное антитело, предпочтительно антитело IgG1, в частности антитело IgG1,к.

15. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой антитело с дефицитной эффекторной функцией, например, стабилизированное антитело IgG4 человека, такое как антитело, в котором аргинин в положении 409 в константной области тяжелой цепи IgG4 человека заменен на лизин, треонин, метионин или лейцин, предпочтительно на лизин, и/или где шарнирная область содержит последовательность Cys-Pro-Pro-Cys.

16. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой моновалентное антитело.

17. Антитело по п.16, где моновалентное антитело содержит:

(i) вариабельную область антитела по любому из пп.1-6 и

(ii) область C_H иммуноглобулина или ее фрагмент, включающий участки C_H2 и C_H3, где область C_H или ее фрагмент модифицированы так, что область, соответствующая шарнирной области, и, если иммуноглобулин не относится к изотипу IgG4, то и другие области C_H, такие как область C_H3, не содержат аминокислотных остатков, которые способны образовывать дисульфидные связи с идентичной областью C_H или другие ковалентные или стабильные нековалентные связи между тяжелыми цепями с идентичной областью C_H в присутствии поликлонального IgG человека.

18. Антитело по п.17, где иммуноглобулин, указанный на стадии (ii), относится к подтипу IgG4.

19. Антитело по п.17 или 18, в котором тяжелая цепь была модифицирована таким образом, что весь шарнир был удален.

20. Антитело по любому из пп.1-17, где антитело было модифицировано так, чтобы сделать его менее гибким, например путем мутаций шарнирной области.

21. Антитело по п.20, где антитело относится к подтипу IgG1, а шарнирная область модифицирована путем:

(i) удаления шарнирной области последовательности EPKSCDKTHTCPPCP и замены ее шарнирной областью IgG2 последовательности: ERKCCVCEPPCP (IgG1-шарнир-IgG2);

(ii) удаления положения 220, чтобы модифицированная шарнирная область имела последовательность EPKSDKTHTCPPCP (IgG1 ΔC220);

(iii) замены цистеина в положении 220 любой другой природной аминокислотой (X), чтобы моди-

- фицированная шарнирная область имела последовательность EPKSDKTHTCPPCP (IgG1 C220X);
- (iv) удаления шарнирной области последовательности EPKSCDKTHTCPPCP (UniBody IgG1);
- (v) удаления шарнирной области с последовательностью EPKSCDKTHTCPPCP и замены ее шарнирной областью IgG3 с последовательностью ELKTPGLDTHHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP (IgG1-шарнир-IgG3) или
- (vi) замены треонина в положении 223 на цистеин и удаление лизина в положении 222 и треонина в положении 225, так что модифицированная шарнирная область имеет последовательность EPKSCDCHCPPCP (IgG1 TH7Δ6-9).
22. Антитело по п.21, где шарнирная область модифицирована путем замены цистеина в положении 220 на серин, так что модифицированная шарнирная область имеет последовательность EPKSSDKTHTCPPCP (IgG1 C220S).
23. Антитело по п.20, где антитело относится к подтипу IgG2.
24. Антитело по любому из предыдущих пунктов, где антитело было модифицировано для уменьшения корового фукозилирования до менее 10%, например менее 5%, определенного с помощью высокоэффективной анионообменной хроматографии в сочетании с импульсным амперометрическим детектированием (HPLC-PAAD).
25. Биспецифическое антитело, содержащее сайт связывания с-Met, как определено в предыдущих пунктах, и второй антигенсвязывающий сайт, имеющий иную специфичность связывания.
26. Биспецифическое антитело по п.25, содержащее область VH, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 98, 99 и 100, и область VL, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 102, 103 и 104, и второй антигенсвязывающий сайт, имеющий иную специфичность связывания.
27. Биспецифическое антитело по п.25 или 26, содержащее первый антигенсвязывающий сайт из антитела против с-Met, и второй антигенсвязывающий сайт, специфичный к рецептору эпидермального фактора роста, где первый сайт связывания антигена содержит область VH, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 98, 99 и 100, и область VL, содержащую CDR1, 2 и 3 с последовательностями SEQ ID NO: 102, 103 и 104.
28. Биспецифическое антитело по п.25 или 26, где второй антигенсвязывающий сайт обладает специфичностью связывания с эффекторной клеткой человека, рецептором Fc человека, В-клеточным рецептором или неперекрывающимся эпитопом с-Met.
29. Нуклеотидная последовательность, кодирующая VH и VL области антитела по любому из предыдущих пунктов.
30. Экспрессирующий вектор, включающий нуклеотидную последовательность по п.29, где вектор дополнительно содержит нуклеотидную последовательность, кодирующую функционально связанную константную область легкой цепи и константную область тяжелой цепи антитела.
31. Рекомбинантная эукариотическая или прокариотическая клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.30 и которая продуцирует антитело по любому из пп.1-28.
32. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-28 и фармацевтически приемлемый носитель, где фармацевтическую композицию применяют для лечения расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими с-Met.
33. Применение антитела по любому из пп.1-28 в качестве лекарственного средства для лечения расстройства, связанного с клетками, экспрессирующими с-Met.
34. Применение по п.33, где заболевание представляет собой рак.
35. Применение антитела по любому из пп.1-28 для лечения рака, где рак выбран из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, рака молочной железы, рака шейки матки, холангиокарциномы, колоректального рака, рака эндометрия, рака пищевода, рака желудка, рака головы и шеи, рака почки, рака печени, рака легкого, рака носоглотки, рака яичников, рака поджелудочной железы, рака желчного пузыря, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, остеосаркомы, рабдомиосаркомы, синовиальной саркомы, саркомы Капоши, лейомиосаркомы, злокачественной фиброзной гистиоцитомы, фибросаркомы, острого миелогенного лейкоза, Т-клеточного лейкоза взрослых, хронического миелоидного лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, глиобластомы, астроцитомы, меланомы, мезотелиомы, опухоли Вильмса и опухоли MiT, включая светлоклеточную саркому (CCS), альвеолярную саркому мягких тканей (ASPS) и ассоциированную с транслокацией почечно-клеточную карциному.
36. Применение по п.35, где антитело предназначено для лечения рака в комбинации с одним или несколькими дополнительными терапевтическими агентами, такими как химиотерапевтические агенты.
37. Способ ингибирования роста и/или пролиферации опухолевых клеток, экспрессирующих с-Met, включающий введение нуждающемуся в этом индивидууму антитела по любому из пп.1-28.
38. Способ получения антитела по любому из пп.1-28, включающий стадии:
- а) культивирование клетки-хозяина по п.31 и
 - б) очистка антитела от культуральной среды.
39. Способ обнаружения наличия с-Met в образце, включающий приведение образца в контакт с антителом по любому из пп.1-28 в условиях, обеспечивающих об-

разование комплекса между антителом и с-Met; и анализ того, образовался ли комплекс.

40. Набор для обнаружения наличия с-Met в образце, характеризующийся тем, что он содержит антитело по любому из пп.1-28.

41. Антиидиотипическое антитело против антитела по любому из пп.1-24.

1 сравнение VH :

```
IgHV1-18-1 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-181 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-066 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-065 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-069 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-082 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-089 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]SGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]GLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
консенсусная QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSC[REDACTED]ASGYTF[REDACTED]YGISWVRQAPG[REDACTED]HGLEWMGWIS[REDACTED]YNG[REDACTED]TNYAQ
последовательность
```

```
IgHV1-18-1 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-181 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-066 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-065 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-069 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-082 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-089 KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
консенсусная KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]-----
последовательность KLQGRVTMT[REDACTED]DTST[REDACTED]TAYMELRSLRSDDTAVYYCAR[REDACTED]LDLGRGTYFDYVGGQGLVTVSS
```

2 сравнение VH :

```
IgHV1-69-4 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-005 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-031 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-006 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-007 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
VH1016-011 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
консенсусная QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSC[REDACTED]KASGGTFSS[REDACTED]WVRQAPGQGLEWMGR[REDACTED]PILG[REDACTED]TNYAQ
последовательность
```

```
IgHV1-69-4 [REDACTED]FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-005 [REDACTED]FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-031 [REDACTED]FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-006 [REDACTED]FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-007 [REDACTED]FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-011 [REDACTED]FQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]EL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]-----
консенсусная [REDACTED]HFQGRVTITADKSTSTAY[REDACTED]MEL[REDACTED]SLRSED[REDACTED]TAVYYCAR[REDACTED]DVGYSADAFDIWGGTMTVTVSS
последовательность
```

3 сравнение VH :

```
IgHV3-30-3-1 QVQLVESGGGVVQPGRSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
VH1016-017 QVQLVESGGGVVQPGRSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
VH1016-025 QVQLVESGGGVVQPGRSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
VH1016-022 QVQLVESGGGVVQPGRSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
консенсусная QVQLVESGGGVVQPGRSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAMHWVRQAPGKGLEWVA[REDACTED]ISYDGS[REDACTED]K[REDACTED]AD
последовательность
```

```
IgHV3-30-3-1 SVKGRFTI[REDACTED]SRDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-017 SVKGRFTI[REDACTED]SRDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-025 SVKGRFTI[REDACTED]SRDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]-----
VH1016-022 SVKGRFTI[REDACTED]SRDNSKNTLYLQM[REDACTED]SLRA[REDACTED]DTAVYYCAR[REDACTED]-----
консенсусная SVKGRFTI[REDACTED]SRDNSKNTLYLQM[REDACTED]NSLRA[REDACTED]EDTAVYYCAR[REDACTED]ELLWFGELWGYFDLWGRGTLVTVSS
последовательность
```

4 сравнение VH :

```
IgHV3-23-1 EVQLLES[REDACTED]GGGLVQPGGSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWV[REDACTED]SISGSGG[REDACTED]ITYYAD
VH1016-040 EVQLLES[REDACTED]GGGLVQPGGSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWV[REDACTED]SISGSGG[REDACTED]ITYYAD
VH1016-045 EVQLLES[REDACTED]GGGLVQPGGSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWV[REDACTED]SISGSGG[REDACTED]ITYYAD
VH1016-039 EVQLLES[REDACTED]GGGLVQPGGSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAM[REDACTED]WVRQAPGKGLEWV[REDACTED]SISGSGG[REDACTED]ITYYAD
консенсусная EVQLLES[REDACTED]GGGLVQPGGSLR[REDACTED]LSCAASGFTFSSYAM[REDACTED]S[REDACTED]WVRQAPGKGLEWV[REDACTED]SISGSGG[REDACTED]ITYYAD
последовательность
```

IgHV3-23-1 SIKGRFTISRINISNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA-----
 VH1016-040 SIKGRFTISRINISNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA-----
VH1016-045 SIKGRFTISRINISNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA-----
 VH1016-039 SIKGRFTISRINISNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA-----
 консенсусная SVKGRFTISRINISNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRGWSDYWGQGLVTVSS
 последовательность

5 сравнение VH :

IgHV4-30-2-1 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
 VH1016-068 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
 VH1016-078 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
 VH1016-084 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
VH1016-061 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
VH1016-062 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
 VH1016-063 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
VH1016-064 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
 VH1016-087 QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSCITY
 консенсусная QLQLQESGGGLVKPSQTLSLTCAVSGGSISSGGSWSWIRQPPGKGLEWIGTYHSGNTYD
 последовательность

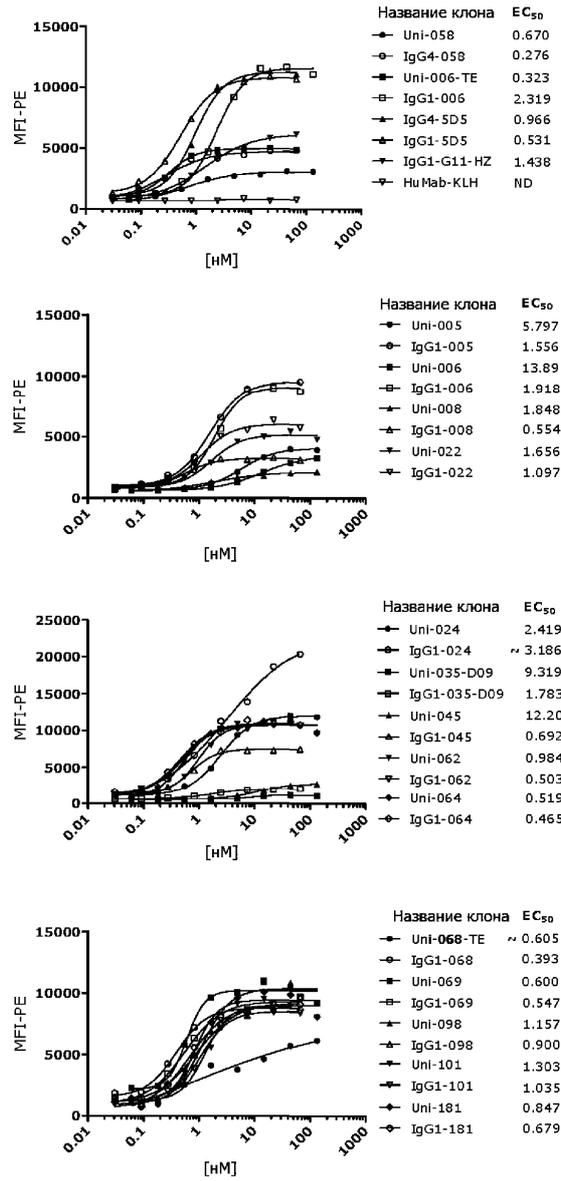
IgHV4-30-2-1 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
 VH1016-068 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
 VH1016-078 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
 VH1016-084 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
VH1016-061 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
VH1016-062 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
 VH1016-063 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
VH1016-064 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
 VH1016-087 NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCAR-----
 консенсусная NP SLKSRVTIIVDRSKNQLSLKLSVTAADTAVYYCARSSYDILTDFWQGLVTVSS
 последовательность

6 сравнение VH :

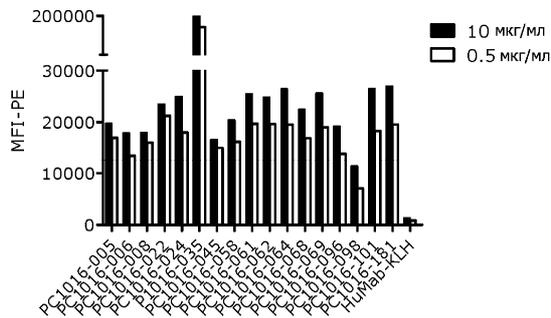
IgHV5-51-1 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-016 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-028 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
VH1016-008 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-012 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
VH1016-035 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-095 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-093 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
VH1016-096 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 VH1016-104 EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 консенсусная EVQLVQSGEELVKKPGESLKI SCKGSGYFTSYWI GWRQMPGKGLEWMGI IYPGDS
 последовательность

IgHV5-51-1 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 VH1016-016 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 VH1016-028 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
VH1016-008 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 VH1016-012 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
VH1016-035 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 VH1016-095 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 VH1016-093 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
VH1016-096 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 VH1016-104 TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCAR-----
 консенсусная TRYSPSPQGGVTI SADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARQELTGFDFYWGQGLVTVSS
 последовательность

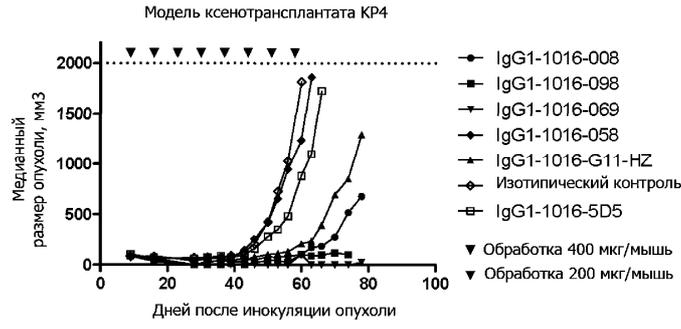
Фиг. 1



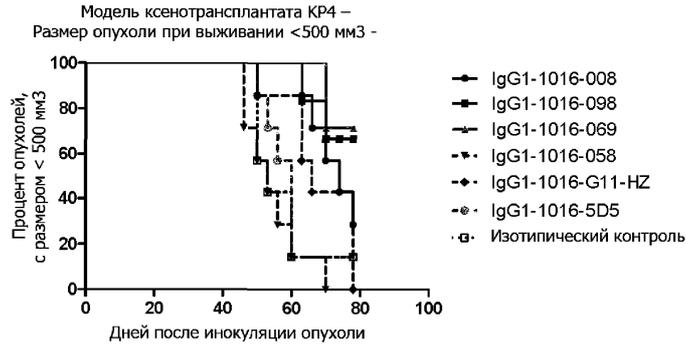
Фиг. 3



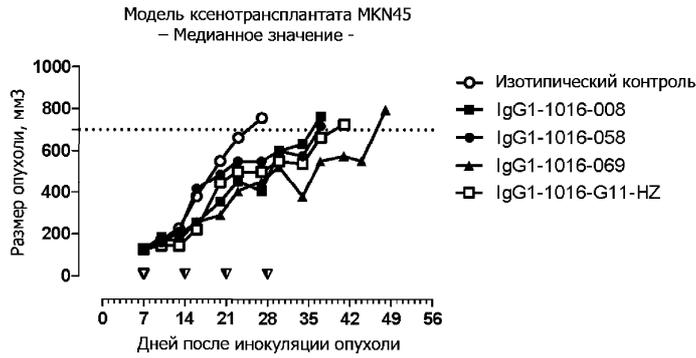
Фиг. 4



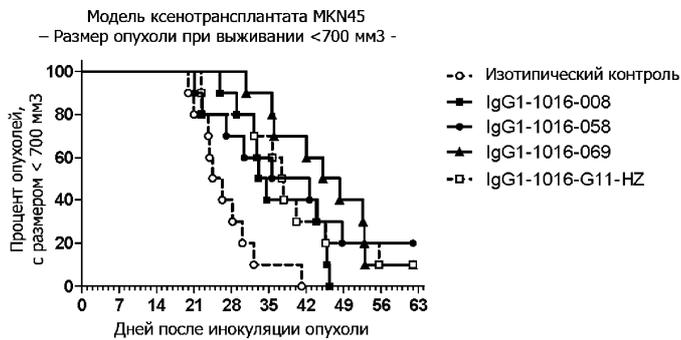
Фиг. 8



Фиг. 9



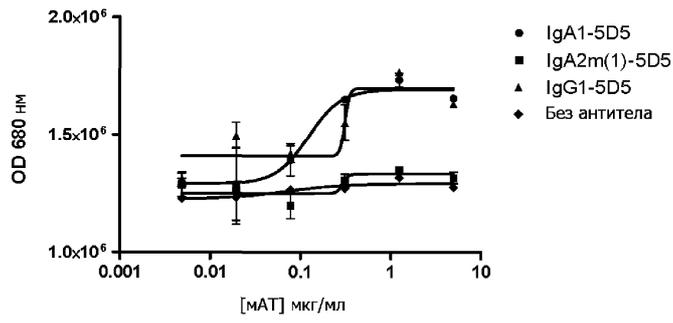
Фиг. 10



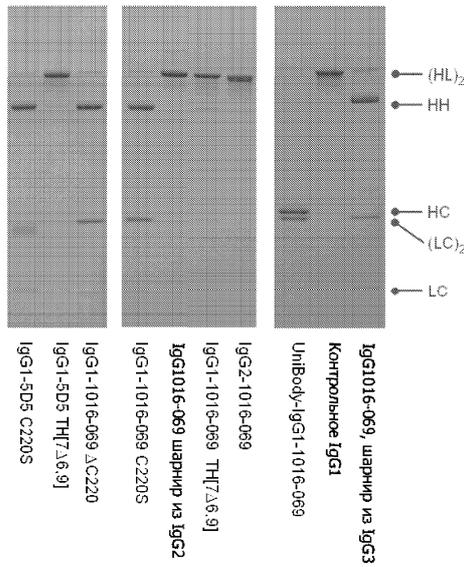
Фиг. 11

045516

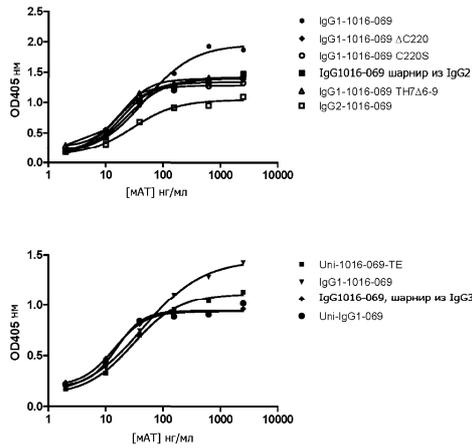
Анализ выживания с клетками КР-4 МАТ 5D5



Фиг. 12

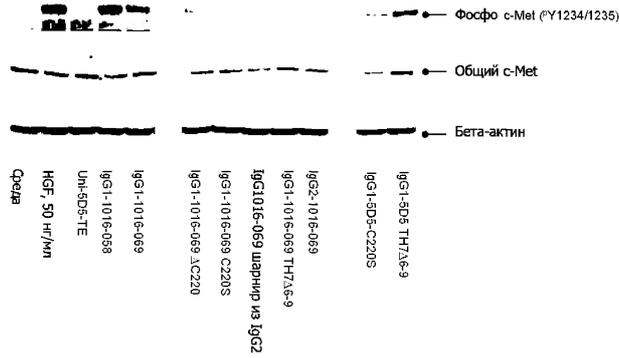


Фиг. 13



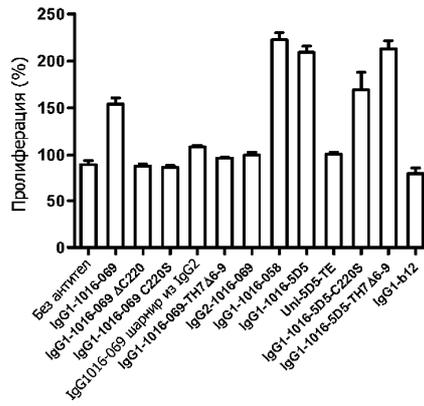
Фиг. 14

045516



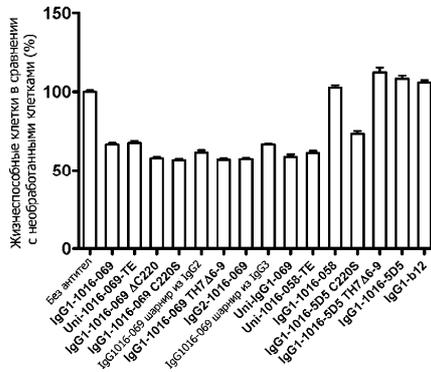
Фиг. 15

Анализ пролиферации NCI-H441



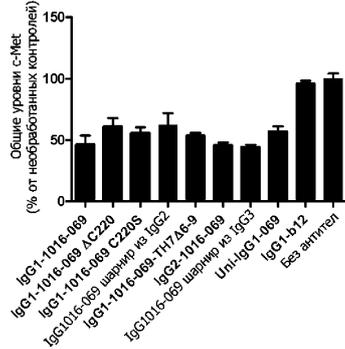
Фиг. 16

Анализ жизнеспособности КР4

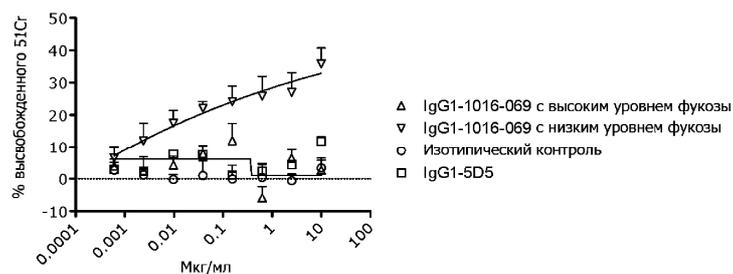


Фиг. 17

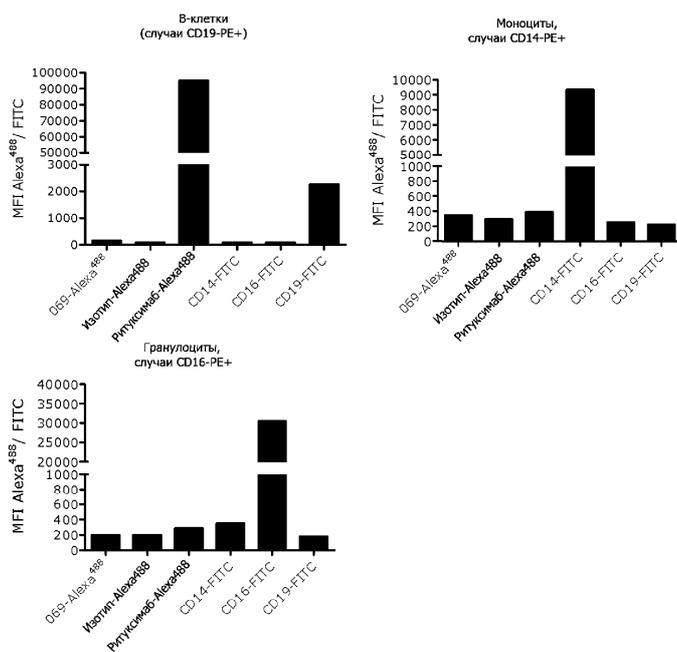
Отрицательная регуляция/деградация с-Met



Фиг. 18



Фиг. 19



Фиг. 20

