

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202192173** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
2021.12.16

(22) Дата подачи заявки  
2020.02.03

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*A61P 35/00* (2006.01)  
*A61K 47/68* (2017.01)  
*C07K 16/18* (2006.01)  
*A61K 39/00* (2006.01)

(54) **АНТИ-CD228 АНТИТЕЛА И КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО**

(31) 62/801,590; 62/824,923; 62/879,660;  
62/882,016; 62/934,424

(32) 2019.02.05; 2019.03.27; 2019.07.29;  
2019.08.02; 2019.11.12

(33) US

(86) PCT/US2020/016381

(87) WO 2020/163225 2020.08.13

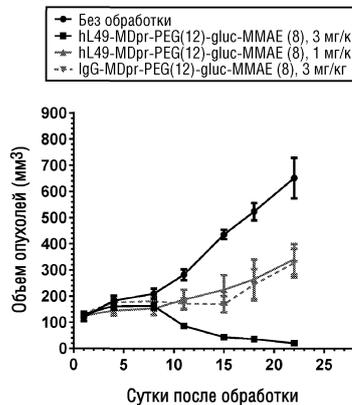
(71) Заявитель:  
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:  
Сэндолл Шарсти, Вестендорф Лори,  
Льюис Тимоти (US)

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

(57) Изобретение относится к новым анти-CD228 антителам, конъюгатам антитело-лекарственное средство и к способам применения таких анти-CD228 антител и конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения рака.

LU0697 PDX модель аденокарциномы NSCL



**A1**

**202192173**

**202192173**

**A1**

## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-569816EA/019

### АНТИ-CD228 АНТИТЕЛА И КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

#### **Перекрестная ссылка на родственные заявки**

[0001] Данная заявка заявляет приоритет предварительных заявок на патент США № 62/801590, поданной 5 февраля 2019 г., № 62/824923, поданной 27 марта 2019 г., № 62/879660, поданной 29 июля 2019 г., № 62/882016, поданной 2 августа 2019 г. и № 62/934424, поданной 12 ноября, 2019 г., содержание которых в полном объеме включено здесь посредством ссылки.

#### **Представление списка последовательностей в текстовом файле ASCII**

[0002] Список последовательностей представлен в электронном виде в формате ASCII и, таким образом, полностью включен в настоящее описание посредством ссылки: машиночитаемая форма списка последовательностей (название файла: 761682001340SEQLIST.TXT, дата создания 21 января, 2020 г., размер 28 КБ).

#### **Область техники**

[0003] Настоящее изобретение относится к новым анти-CD228 антителам и конъюгатам антитело-лекарственное средство, и к способам применения таких анти-CD228 антител и конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения рака.

#### **Уровень техники**

[0004] CD228, который также известен как меланотрансферрин, MELTF, p97 и MF12, представляет собой гликозилфосфатидилинозитол-заякоренный гликопротеин и впервые был идентифицирован как маркер клеточной поверхности клеток злокачественной меланомы массой 97 кДа. CD228 сверхэкспрессируется на большинстве клинических изолятов меланомы, и его экспрессия также наблюдается на многих карциномах человека. Было показано, что CD228 экспрессируется при различных формах рака. CD228 относится к семейству железосвязывающих белков трансферринов.

[0005] Меланома, также известная как злокачественная меланома, представляет собой тип рака, который развивается из меланоцитов, которые представляют собой пигментсодержащие клетки. Меланома представляет собой самый опасный тип рака кожи. В 2015 г. 3,1 млн. человек болели активной формой заболевания, и меланома унесла жизни 59800 человек. Хирургическое вмешательство может быть эффективным при меланоме на ранней стадии, но не представляет собой вариант лечения заболевания, которое дало метастазы в отдаленные органы. Меланомы, которые распространяются, часто инвазируют в лимфатические узлы в этой области, прежде чем распространяться в другие места. Попытки повысить выживаемость посредством хирургического удаления лимфатических узлов ассоциировались со многими осложнениями, но без достижения общего повышения выживаемости. Применялись иммунотерапия, химиотерапия и лучевая терапия, но, как правило, они не приводили к излечению, особенно при меланоме на поздних стадиях. Когда имеются отдаленные метастазы, то рак обычно считается неизлечимым. Пятилетняя

выживаемость при меланоме IV стадии составляет 15-20%. Следовательно, существует потребность в улучшенных способах лечения меланомы.

[0006] Все ссылки, цитированные в данном документе, включая заявки на патент, патентные публикации и научную литературу, включены в настоящее описание посредством ссылки во всей своей полноте, как если бы каждая отдельная ссылка была специально и индивидуально указана для включения посредством ссылки.

### **Сущность изобретения**

[0007] Настоящее изобретение относится к выделенному анти-CD228 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи включает:

- (i) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
  - (ii) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; и
  - (iii) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и
- где вариабельная область легкой цепи включает:

- (i) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (ii) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; и
- (iii) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В

некоторых вариантах осуществления антитело является гуманизированным.

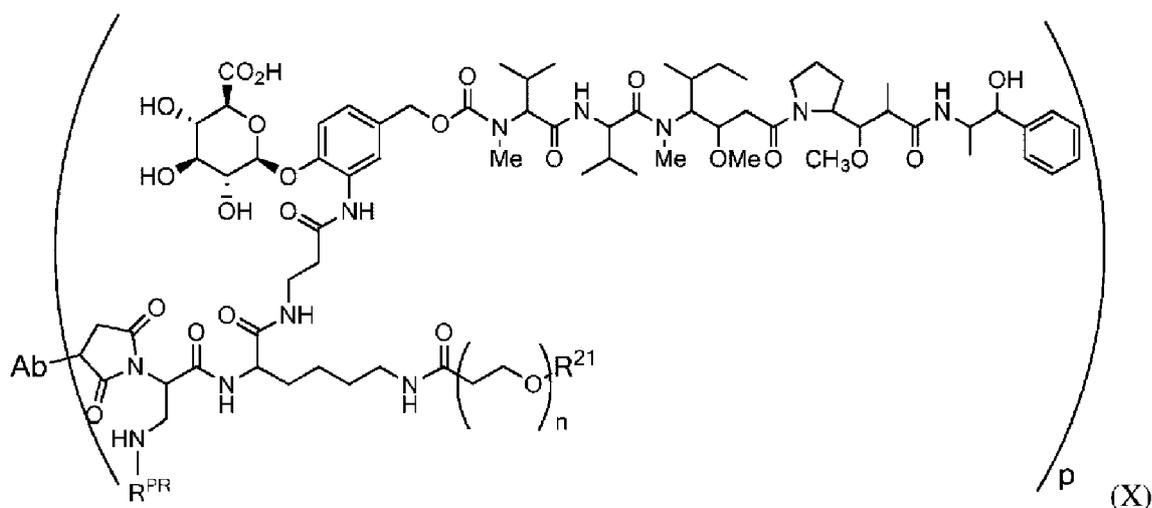
[0008] Также настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD228 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, при условии, что положение H27 занято D, положение H30 занято T, положение H47 занято Y, положение H71 занято R, и положение H78 занято Y, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8, при условии, что положение L2 занято F, положение L36 занято Y, и положение L46 занято L. В некоторых вариантах осуществления положение L28 занято D.

[0009] Также настоящее изобретение относится к гуманизированному анти-CD228 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR согласно системе нумерации Kabat с SEQ ID NO: 7, где положение H27 занято D, положение H30 занято T, положение H47 занято Y, положение H71 занято R, и положение H78 занято Y, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR согласно системе нумерации Kabat с SEQ ID NO: 8, где положение L2 занято F, положение L36 занято Y, и положение L46 занято L.

[0010] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В некоторых

вариантах осуществления настоящего изобретения переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело.

[0011] Также настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченное здесь, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим агентом. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой линкер MDpr-PEG(12)-gluc. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения цитотоксический или цитостатический агент представляет собой монометилауристин. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения монометилауристин представляет собой монометилауристин E (MMAE). В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения линкер присоединен к монометилауристину E с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего структуру:



где Ab представляет собой антитело hL49,  $p$  равно 12,  $R^{PR}$  представляет собой атом водорода,  $R^{21}$  представляет собой  $CH_3$ , и  $p$  означает число от 1 до 16. В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

[0012] Также настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антитела, описанного здесь. Также настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновую кислоту, обеспеченную здесь. Также настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей нуклеиновую кислоту, обеспеченную здесь.

[0013] Также настоящее изобретение относится к способу получения анти-CD228 антитела или антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного здесь, включающему

культивирование клетки-хозяина, обеспеченной здесь, в условиях, подходящих для получения анти-CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[0014] Также настоящее изобретение относится к способу получения конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство, обеспеченного здесь, включающему культивирование клетки-хозяина, обеспеченной здесь, в условиях, подходящих для получения анти-CD228 антитела; выделение полученного анти-CD228 антитела из клетки-хозяина; и конъюгирование анти-CD228 антитела с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

[0015] Также настоящее изобретение относится к способу лечения рака у субъекта, включающему введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента, обеспеченного здесь, или конъюгата антитело-лекарственное средство, обеспеченного здесь. В некоторых вариантах осуществления рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, колоректального рака, рака легкого, рака щитовидной железы, рака молочной железы, холиангиокарциномы, рака пищевода и рака головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[0016] Также настоящее изобретение относится к набору, включающему: (a) антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченное здесь, или конъюгат антитело-лекарственное средство, обеспеченный здесь; и (b) инструкции по применению антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитело-лекарственное средство в соответствии со способом, обеспеченным здесь.

[0017] Также настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, обеспеченное здесь, или конъюгат антитело-лекарственное средство, обеспеченный здесь, и один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из физиологически приемлемого носителя, разбавителя, эксципиента и вспомогательного вещества.

### **Краткое описание фигур**

[0018] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один рисунок, выполненный в цвете. Копии публикации данного патента или заявки на патент с цветным рисунком(и) будут предоставлены Ведомством по запросу и оплате необходимого сбора.

[0019] На фиг. 1 показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИНС в образцах опухоли меланомы, полученных от пациентов.

[0020] На фиг. 2 показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИНС в образцах опухоли мезотелиомы, полученных от пациентов.

[0021] На фиг. 3 показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИНС в образцах пациентов с колоректальным раком.

[0022] На фиг. 4 показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИНС в образцах злокачественной опухоли молочной железы, полученных от пациентов. На верхней панели показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИНС в образцах пациентов с тройным негативным раком молочной железы. На нижней панели показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИНС в образцах пациентов с Her2-IR+

раком молочной железы.

[0023] На фиг. 5 показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИHC в образцах злокачественной опухоли поджелудочной железы, полученных от пациентов.

[0024] На фиг. 6 показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИHC в образцах пациентов с немелкоклеточным раком легкого. На верхней панели показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИHC в образцах пациентов с плоскоклеточным раком NSCLC. На нижней панели показан анализ экспрессии белка CD228 с использованием ИHC в образцах аденокарциномы, полученных пациентов с NSCLC.

[0025] На фиг. 7 показано сравнение процента образцов пациентов, положительных по экспрессии CD228, как определено ИHC, и по уровням РНК по данным Атласа генома рака для различных типов опухолей.

[0026] На фиг. 8 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи родительского мышинового моноклонального анти-CD228 антитела (обозначенной как Mu L49 vH (SEQ ID NO: 21)) с человеческой акцепторной последовательностью (обозначенной как Hu IGHV4-59/ HJ4 (SEQ ID NO: 23)) и гуманизированными вариантами антитела L49 (обозначенными как hvHA (SEQ ID NO: 7), hvHB (SEQ ID NO: 24) и hvHC (SEQ ID NO: 25)). Положения CDR определены с использованием систем нумерации Kabat и IMGT.

[0027] На фиг. 9 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельной области тяжелой цепи гуманизированных вариантов антитела L49 (обозначенных как hvHA (SEQ ID NO: 7), hvHB (SEQ ID NO: 24) и hvHC (SEQ ID NO: 25)). Положение CDR определены с использованием систем нумерации Kabat и IMGT.

[0028] На фиг. 10 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельной области легкой цепи родительского мышинового моноклонального анти-CD228 антитела (обозначенной как Mu L49 vL (SEQ ID NO: 31)) с человеческой акцепторной последовательностью (обозначенной как Hu IGKV2-30/ KJ2 (SEQ ID NO: 32)) и гуманизированными вариантами антитела L49 (обозначенными как hvLA (SEQ ID NO: 33), hvLB (SEQ ID NO: 34) и hvLC (SEQ ID NO: 35)). Положения CDR определены с использованием систем нумерации Kabat и IMGT.

[0029] На фиг. 11 показано выравнивание аминокислотных последовательностей варибельной области легкой цепи гуманизированных вариантов антитела L49 (обозначенных как hvLA (SEQ ID NO: 33), hvLB (SEQ ID NO: 34) и hvLC (SEQ ID NO: 35)). Положения CDR определены с использованием систем нумерации Kabat и IMGT.

[0030] На фиг. 12A-12F приведены результаты анализа конкурентного связывания рекомбинантных гуманизированных анти-CD228 антител, родительского мышинового антитела (обозначенного как mL49) и химерного антитела (cL49ec).

[0031] На фиг. 13 приведены результаты анализа насыщаемого связывания рекомбинантных гуманизированных анти-CD228 антител.

[0032] На фиг. 14A-14C показан процент жизнеспособных клеток во временной динамике в клеточных линиях A2058, A375 и Colo-853, обработанных hL49-MC-val-cit-

РАВ-ММАЕ (4), hL49-MP-gluc-ММАЕ (4) и hL49-MP-gluc-ММАЕ (8).

[0033] На фиг. 15 показаны объемы опухоли A2058 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг hL49-HALC, hL49-HALC-ауристин Т (8), hL49-HALC-липофильный MMAF (8), hL49-HALC-тубулизин М (8) и hL49-HALC-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0034] На фиг. 16 показаны объемы опухоли A2058 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 6 мг/кг IgG-MDpr-gluc-ММАЕ (2), 6 мг/кг hL49ec-MDpr-gluc-ММАЕ (2), 3 мг/кг hL49ec-MDpr-gluc-ММАЕ (2), 1 мг/кг hL49ec-MDpr-gluc-ММАЕ (2), 3 мг/кг IgG-MDpr-gluc-ММАЕ (4), 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-ММАЕ (4) и 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-ММАЕ (8).

[0035] На фиг. 17 показаны объемы опухоли A2058 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-ММАЕ (4), 3 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-ММАЕ (4), 1 мг/кг hL49-MDpr-gluc-ММАЕ (8) и 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-ММАЕ (8).

[0036] На фиг. 18 показаны объемы опухоли Colo-853 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-ММАЕ (4), 3 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-ММАЕ (4), 1 мг/кг hL49-MDpr-gluc-ММАЕ (8) и 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-ММАЕ (8).

[0037] На фиг. 19 показаны объемы опухоли A2058 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8), 3 мг/кг IgG-тубулизин М (8), 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-тубулизин М (8), или 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0038] На фиг. 20 показаны объемы опухоли SK-MEL-5 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8), 3 мг/кг IgG-тубулизин М (8), 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-тубулизин М (8) или 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0039] На фиг. 21 показаны объемы опухоли IGR-37 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-тубулизин М (8), или 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0040] На фиг. 22 показаны объемы опухоли Colo-853 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 0,3, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8) или 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0041] На фиг. 23 показаны объемы опухоли LU0697 на PDX модели плоскоклеточного NSCL во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8) или 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0042] На фиг. 24 показаны объемы опухоли LU0697 на PDX модели аденокарциномы NSCL во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8) или 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ (8).

[0043] На фиг. 25 показаны объемы опухоли MDA-MB-231 TNBC во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 0,5 мг/кг или 1 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), или 0,5 мг/кг или 1 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8).

[0044] На фиг. 26 показаны объемы опухоли HPAF-II во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг IgGhL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), или 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8).

[0045] На фиг. 27 показано процентное изменение объема опухоли в ответ на обработку hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) на 22 различных мышинных PDX моделях трижды негативного рака молочной железы.

[0046] На фиг. 28А-28В показан % специфического лизиса (ADCC активность) hL49 и другого антитела к CD228, cL235, одного или конъюгированного с MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE для двух пациентов.

[0047] На фиг. 29А приведены концентрации ADC в плазме крови во временной динамике у мышей nude. На фиг. 29В приведены концентрации ADC в плазме крови во временной динамике у крыс.

[0048] На фиг. 30А показаны объемы опухоли A2058 во временной динамике у необработанных мышей и мышей, обработанных различными анти-CD228 антителами. На фиг. 30В показан процент животных с <4-кратным увеличением опухоли во временной динамике для каждого условия обработки.

[0049] На фиг. 31А-31В показана скорость расщепления конъюгата во временной динамике в клетках A375 и Colo-853.

[0050] На фиг. 32 показано, что CD228 пополняется на поверхности клетки во времени, сравнением скоростей расщепления конъюгата во временной динамике в клетках, обработанных флуоресцентно-мечеными антителами hL49, с использованием либо импульсной, либо непрерывной обработки меченым антителом.

[0051] На фиг. 33А-33В показана средняя интенсивность флуоресценции на клетку во временной динамике в клетках, инкубированных с флуоресцентно-мечеными антителами hL49 в присутствии или в отсутствии циклогексимида, который ингибирует синтез белка.

[0052] На фиг. 34А-34F показано связывание различных анти-CD228 антител с CD228 при различных значениях pH в диапазоне от 4 до 7,4.

[0053] На фиг. 35А-35В показана способность антител с аналогичной аффинностью связывания интернализировать и катаболизировать лекарственное средство.

[0054] На фиг. 36А-36В показано, что однократная доза hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) обладает противоопухолевой активностью на опухолевых моделях, полученных от пациентов (PDX).

## **Подробное описание изобретения**

### **I. Определения**

[0055] Для облегчения понимания настоящего раскрытия сначала приводятся

определения некоторых терминов. Каждый из следующих терминов, используемых в данной заявке, если явно не указано иное в настоящем документе, имеет значение, приведенное ниже. Дополнительные определения приводятся по тексту заявки.

[0056] В рамках настоящего изобретения, термин «и/или» следует понимать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов с или без другого. Таким образом, термин «и/или», используемый здесь в выражении, таком как «А и/или В», предназначен для включения «А и В», «А или В», «А» (одного) и «В» (одного). Аналогичным образом, термин «и/или», используемый в выражении, таком как «А, В и/или С», предназначен для включения каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (одного); В (одного); и С (одного).

[0057] Подразумевается, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные здесь, включают «содержащие», «состоящие» и «состоящие по существу из» аспектов и вариантов осуществления.

[0058] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые здесь, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистами в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение. Например, в работах Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, для специалистов в данной области предоставляется общий словарь многих терминов, используемых в настоящем раскрытии.

[0059] Единицы, префиксы и символы обозначены в их форме, принятой в Международной системе единиц (SI). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Заголовки, представленные в данном документе, не являются ограничениями различных аспектов раскрытия, которое может быть получено посредством ссылки на описание в целом. Соответственно, термины, определенные непосредственно ниже, более полно определены со ссылкой на описание в целом.

[0060] В рамках настоящего изобретения, термины «CD228», «p97», «меланотрансферрин», «MELTF» и «MF12» используются здесь взаимозаменяемо и, если не указано иное, то включают любые варианты, изоформы и видовые гомологи человеческого CD228, которые обычно экспрессируются клетками или экспрессируются на клетках, трансфектированных геном CD228.

[0061] Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно близких гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L) низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, где все четыре соединены 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 обычно состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно V<sub>H</sub> или VH) и константной области тяжелой цепи (C<sub>H</sub> или CH). Константная область тяжелой цепи обычно состоит из трех доменов: C<sub>H1</sub>, C<sub>H2</sub> и

$C_{H3}$ . Тяжелые цепи обычно связаны между собой дисульфидными связями в так называемой «шарнирной области». Каждая легкая цепь обычно состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно  $V_L$  или VL) и константной области легкой цепи ( $C_L$  или CL). Константная область легкой цепи обычно состоит из одного домена  $C_L$ .  $C_L$  может относиться к изотипу  $\kappa$  (каппа) или  $\lambda$  (лямбда). Термины «константная область» и «константный домен» используются здесь взаимозаменяемо. Иммуноглобулин может происходить из любого из хорошо известных изотипов, включая, помимо прочего, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают, не ограничиваясь этим, человеческие IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. «Изотип» относится к классу или подклассу антител (например, IgM или IgG1), которые кодируются генами константной области тяжелой цепи.

[0062] Термин «переменная область» или «переменный домен» относится к области тяжелой или легкой цепи антитела, которая участвует в связывании антитела с антигеном. Переменные области тяжелой цепи и легкой цепи ( $V_H$  и  $V_L$ , соответственно) нативного антитела можно дополнительно подразделить на участки гипервариабельности (или гипервариабельные участки, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также называемые определяющими комплементарность участками (CDR), чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Термины «определяющие комплементарность участки» и «CDR», синонимичные «гипервариабельным участкам» или «HVR», известны в данной области и относятся к несмежным последовательностям аминокислот в переменных областях антитела, которые придают антигенную специфичность и/или аффинность связывания. В общем, имеется три CDR в каждой переменной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой переменной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). «Каркасные области» и «FR» известны в данной области и относятся к участкам, отличным от CDR, переменных областей тяжелой и легкой цепей. Как правило, имеется четыре FR в каждой полноразмерной переменной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной переменной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). Внутри каждой  $V_H$  и  $V_L$  три CDR и четыре FR обычно расположены от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (см. также Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 195, 901-917 (1987)).

[0063] В рамках настоящего изобретения, термин «антитело» (Ab) относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, которые обладают способностью специфически связываться с антигеном в обычных физиологических условиях с периодом полураспада, составляющим значительный период времени, например по меньшей мере примерно 30 мин, по меньшей мере примерно 45 мин, по меньшей мере примерно 1 ч, по меньшей мере примерно 2 ч, по меньшей мере примерно 4 ч, по меньшей мере примерно 8 ч, по меньшей мере примерно 12 ч, примерно 24 ч или более, примерно 48 ч или более, примерно 3, 4, 5, 6, 7 или более суток

и т. д. или любой другой соответствующий функционально определенный период (например, период времени, достаточный для индукции, стимуляции, усиления и/или модуляции физиологического ответа, ассоциированного со связыванием антитела с антигеном, и/или период времени, достаточный для того, чтобы антитело «задействовало» эффекторную активность). Вариабельные области тяжелой и легкой цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител (Abs) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент на классическом пути активации комплемента. Антитело также может быть биспецифическим антителом, диателом, мультиспецифическим антителом или подобной молекулой.

[0064] В рамках настоящего изобретения, термин «моноклональное антитело» относится к препарату молекул антитела, которые продуцированы рекомбинантно с одной первичной аминокислотной последовательностью. Композиция моноклонального антитела проявляет одинарную специфичность и аффинность связывания к определенному эпитопу. Следовательно, термин «человеческое моноклональное антитело» относится к таким антителам, проявляющим одинарную специфичность связывания, у которых вариабельные и константные области происходят из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Человеческие моноклональные антитела могут продуцироваться гибридомой, включающей В-клетки, полученные из трансгенного или трансхромосомного животного, отличного от человека, например, трансгенной мыши, геном которой содержит трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи человека, слитые с иммортализованными клетками.

[0065] «Выделенное антитело» относится к антителу, которое по существу не содержит других антител, обладающих другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с CD228, по существу не содержит антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от CD228). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с CD228, может обладать перекрестной реактивностью с другими антигенами, такими как молекулы CD228 от других видов. Более того, выделенное антитело может по существу не содержать другого клеточного материала и/или химических соединений. В одном варианте осуществления выделенное антитело включает конъюгат антитела, присоединенного к другому агенту (например, низкомолекулярному лекарственному средству). В некоторых вариантах осуществления выделенное анти-CD228 антитело включает конъюгат анти-CD228 антитела с низкомолекулярным лекарственным средством (например, MMAE или MMAF).

[0066] «Человеческое антитело» (HuMAb) относится к антителу, имеющему вариабельные области, в которых как FR, так и CDR происходят из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, то эта константная область также происходит из

последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Человеческие антитела по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, не кодированные последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, введенные случайным или сайт-специфическим мутагенезом *in vitro* или соматической мутацией *in vivo*). Однако в рамках настоящего изобретения, термин «человеческое антитело» не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, были пересажены на каркасные последовательности человека. Термины «человеческие антитела» и «полностью человеческие антитела» используются как синонимы.

[0067] В рамках настоящего изобретения, термин «гуманизированное антитело» относится к сконструированному «нечеловеческому» антителу, которое содержит константные домены человеческого антитела и «нечеловеческие» переменные домены, модифицированные для обеспечения высокого уровня гомологии последовательностей с переменными доменами человека. Это может быть достигнуто посредством пересадки шести участков, определяющих комплементарность (CDR) «нечеловеческих» антител, которые вместе образуют сайт связывания антигена, на гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (см. WO92/22653 и EP0629240). Для полного восстановления аффинности и специфичности связывания родительского антитела, может потребоваться замена каркасных остатков родительского антитела (т. е. «нечеловеческого» антитела) в человеческие каркасные области (обратные мутации). Моделирование по структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать «нечеловеческие» CDR-последовательности, преимущественно человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или более обратных аминокислотных мутаций в «нечеловеческой» аминокислотной последовательности, и полностью человеческие константные области. Необязательно, дополнительные аминокислотные модификации, которые не обязательно являются обратными мутациями, можно использовать для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

[0068] В рамках настоящего изобретения, термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором переменная область получена от видов, отличных от человека (например, от грызунов), и константная область получена от другого вида, например, человека. Химерные антитела можно получить с использованием конструирования антител. «Конструирование антител» представляет собой термин, используемый, в общем, для различных видов модификаций антител, и который является способом, хорошо известным специалистам в данной области. В частности, химерное антитело можно получить с использованием стандартных методов ДНК, как описано в монографии Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Таким образом, химерное антитело может представлять собой

рекомбинантное антитело, полученное посредством генетической или ферментативной инженерии. Специалистам в данной области известно о создании химерного антитела, и, таким образом, создание химерного антитела по настоящему изобретению может быть выполнено другими способами, помимо описанных здесь. Химерные моноклональные антитела для терапевтических применений разработаны с целью снижения иммуногенности антител. Обычно они могут содержать «нечеловеческие» (например, мышьиные) переменные области, которые специфичны для представляющего интерес антигена, и константные области тяжелой и легкой цепей человеческого антитела. Термины «переменная область» или «переменные домены», используемые в контексте химерных антител, относятся к области, которая включает CDR и каркасные области как тяжелой, так и легкой цепей иммуноглобулина.

[0069] «Антитело к антигену» относится к антителу, которое связывается с антигеном. Например, анти-CD228 антитело представляет собой антитело, которое связывается с антигеном CD228.

[0070] «Антигенсвязывающий участок» или антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к одному или более фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, с которым связывается целое антитело. Примеры фрагментов антител (например, антигенсвязывающего фрагмента) включают, не ограничиваясь этим, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')<sub>2</sub>; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление антител папаином дает два идентичных антигенсвязывающих фрагмента, называемых «Fab»-фрагментами, каждый с одним антигенсвязывающим сайтом, и остаточный «Fc»-фрагмент, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином дает фрагмент F(ab')<sub>2</sub>, который имеет два антигенсвязывающих сайта и все еще способен перекрестно связывать антиген.

[0071] «Процент (%) идентичности последовательности» относительно референсной полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в референсной полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, если это необходимо, для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание для определения процента идентичности аминокислотной последовательности можно провести различными способами, которые известны специалистам в данной области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программы BLAST, BLAST-2, ALIGN или Megalign (DNASTAR). Специалисты в данной области могут определить подходящие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности

последовательности данной аминокислотной последовательности А к, с или по сравнению с данной аминокислотной последовательности В (которая альтернативно может быть формулирована как данная аминокислотная последовательность А, которая имеет или включает определенный % идентичности последовательности к, с или по сравнению с данной аминокислотной последовательности В) рассчитывается следующим образом:

$$100 \times \text{дробь } X/Y$$

где X представляет собой количество аминокислотных остатков, оцениваемых как идентичные совпадения по последовательности в этой программе при выравнивании А и В, и где Y представляет собой общее количество аминокислотных остатков в В. Понятно, что где длина последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, то % идентичности последовательностей А и В не будет равняться % идентичности последовательностей В и А.

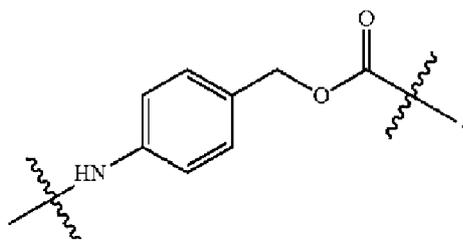
[0072] В рамках настоящего изобретения, термины «связывание», «связывается» или «специфически связывается» в контексте связывания антитела с заранее определенным антигеном обычно представляют собой связывание с аффинностью, соответствующей  $K_D$  примерно  $10^{-6}$  М или ниже, например  $10^{-7}$  М или ниже, например, примерно  $10^{-8}$  М или ниже, например, примерно  $10^{-9}$  М или ниже, примерно  $10^{-10}$  М или ниже, или примерно  $10^{-11}$  М или еще ниже, при определении, например, с помощью бислойной интерферометрии (BLI) на приборе Octet HTX с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита, и где антитело связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, соответствующей  $K_D$ , которая по меньшей мере в 10 раз ниже, например, по меньшей мере 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 его  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), другим, чем заранее определенный антиген или близкородственный антиген. Степень, с которой  $K_D$  связывания ниже, зависит от  $K_D$  антитела, так что, когда  $K_D$  антитела очень низкая, то степень, с которой  $K_D$  связывания с антигеном ниже, чем  $K_D$  связывания с неспецифическим антигеном может быть ниже по меньшей мере в 10000 раз (т. е. антитело является высокоспецифичным).

[0073] В рамках настоящего изобретения, термин « $K_D$ » (М) относится к константе равновесия диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. Аффинность, как здесь используется, и  $K_D$  обратно пропорциональны, т. е. более высокая аффинность относится к более низкой  $K_D$ , и более низкая аффинность относится к более высокой  $K_D$ .

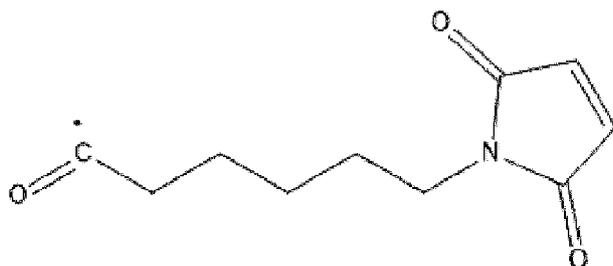
[0074] В рамках настоящего изобретения, термин «ADC» относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, который относится к анти-CD228 антителу, которое связано с фрагментом лекарственного средства (например, MMAE или MMAF), как здесь описано.

[0075] Аббревиатуры «vc» и «val-cit» относятся к дипептиду валин-цитруллин.

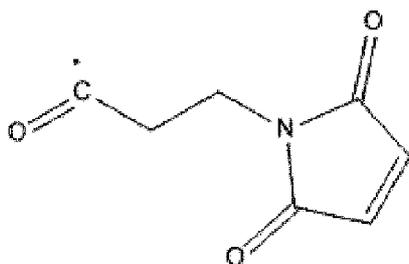
[0076] Аббревиатура «PAB» относится к саморасщепляющемуся спейсеру:



[0077] Аббревиатура «МС» относится к участку малеимидакапроила:



[0078] Аббревиатура «МР» относится к участку малеимидапропионила:



[0079] «Рак» относится к широкой группе различных заболеваний, характеризующихся неконтролируемым ростом аномальных клеток в организме. Термины «рак» или «раковая ткань» могут включать опухоль. Неконтролируемое деление и рост клеток приводит к образованию злокачественных опухолей, которые проникают в соседние ткани, и также могут метастазировать в отдаленные участки тела через лимфатическую или кровеносную систему. После метастазирования можно сказать, что отдаленные опухоли «произошли от» премеастизирующей опухоли.

[0080] Термин «антителозависимая клеточная цитотоксичность» или ADCC представляет собой механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителами клеток-мишеней с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки включают естественные клетки-киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки присоединяются к эффекторной Fc-области Ig, связанного с клетками-мишенями через их сайты связывания антигена. Гибель клетки-мишени, покрытой антителом, происходит в результате активности эффекторной клетки.

[0081] Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или ADCP, относится к процессу, при котором клетки, покрытые антителами, интернализуются полностью или

частично фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с эффекторной Fc-областью Ig.

[0082] Термин «комплемент-зависимая цитотоксичность» или CDC относится к механизму индукции гибели клеток, при котором эффекторная Fc-область антитела, связанного с мишенью, активирует серию ферментативных реакций, завершающихся образованием отверстий в мембране клетки-мишени. Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как комплексы на покрытых антителом клетках-мишенях, связываются и активируют C1q-компонент комплемента, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели клетки-мишени. Активация комплемента также может привести к отложению компонентов комплемента на поверхности клетки-мишени, которые способствуют ADCC посредством связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах.

[0083] «Цитостатический эффект» относится к ингибированию пролиферации клеток. «Цитостатический агент» относится к агенту, который оказывает цитостатическое действие на клетку, тем самым подавляя рост и/или экспансию определенной субпопуляции клеток. Цитостатические агенты можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

[0084] «Лечение» или «терапия» субъекта относится к любому типу проводимого вмешательства или процесса или введению активного агента субъекту с целью обращения, облегчения, ослабления, ингибирования, замедления или предотвращения возникновения, прогрессирования, развития, тяжести или рецидива симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления заболевание представляет собой рак.

[0085] «Субъект» включает человека и любое другое животное, отличное от человека. Термин «животное, отличное от человека» включает, не ограничиваясь этим, позвоночных, таких как «нечеловеческие» приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек. Термины «субъект» и «пациент» и «индивидуум» используются здесь взаимозаменяемо.

[0086] «Эффективное количество», или «терапевтически эффективное количество», или «терапевтически эффективная доза» лекарственного средства или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при использовании одного или в комбинации с другим терапевтическим агентом защищает субъекта от начала развития заболевания или способствует регрессу заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предотвращение утяжеления состояния или инвалидности в результате заболевания. Способность терапевтического агента стимулировать регресс заболевания можно оценить с использованием различных методов, известных практикующим специалистам в данной области, например, у людей во время клинических испытаний, на модельных животных

системах, прогнозирующих эффективность у людей, или посредством анализа активности агента в тестах *in vitro*.

[0087] В качестве примера для лечения опухолей терапевтически эффективное количество противоопухолевого средства ингибирует рост клеток или опухоли по меньшей мере примерно на 10%, по меньшей мере примерно на 20%, по меньшей мере примерно на 30%, по меньшей мере примерно на 40%, по меньшей мере примерно на 50%, по меньшей мере примерно на 60%, по меньшей мере примерно на 70% или по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98% или по меньшей мере примерно на 99%, у подвергшегося лечению субъекта(ов) (например, одного или более подвергшихся лечению субъектов) по сравнению с субъектом(ми), не подвергшимися лечению (например, одного или более субъектов, не подвергшихся лечению). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество противоопухолевого средства ингибирует рост клеток или опухоли на 100% у подвергшихся лечению субъектов (например, одного или более субъектов, подвергшихся лечению) по сравнению с субъектами, не подвергшимися лечению (например, одного или более субъектов, не подвергшихся лечению).

[0088] В еще одних вариантах осуществления настоящего изобретения регресс опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение периода по меньшей мере примерно 20 суток, по меньшей мере примерно 30 суток, по меньшей мере примерно 40 суток, по меньшей мере примерно 50 суток или по меньшей мере примерно 60 суток.

[0089] Терапевтически эффективное количество лекарственного средства (например, конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство) включает «профилактически эффективное количество», которое представляет собой любое количество лекарственного средства, которое при введении одного или в комбинации с противоопухолевым средством субъекту с риском развития рака (например, субъекту, имеющему предраковое состояние) или рецидива рака, подавляет развитие или рецидив рака. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает развитие или рецидив рака. «Подавление» развития или рецидива рака означает либо уменьшение вероятности развития или рецидива рака, либо полное предотвращение развития или рецидива рака.

[0090] В рамках настоящего изобретения, «субтерапевтическая доза» означает дозу терапевтического соединения (например, конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство), которая ниже, чем обычная или стандартная доза терапевтического соединения при введении одного для лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака).

[0091] «Паттерн иммунного ответа» относится к паттерну клинического ответа, часто наблюдаемому у онкологических пациентов, подвергшихся лечению иммунотерапевтическими средствами, которые индуцируют противоопухолевые эффекты за счет индукции иммунных ответов, специфичных для рака, или модификации естественных иммунных процессов. Такой паттерн ответа характеризуется положительным

терапевтическим эффектом, который следует за первоначальным увеличением опухолевой нагрузки или появлением новых очагов поражения, что при оценке традиционных химиотерапевтических агентов можно классифицировать как прогрессирование заболевания и является синонимом неэффективности лекарственного средства. Следовательно, для правильной оценки иммунотерапевтических средств может потребоваться длительный мониторинг эффектов этих агентов на целевое заболевание.

[0092] В качестве примера, «противоопухолевое средство» обеспечивает регрессию рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессу рака до точки его элиминации. «Обеспечение регрессии рака» означает, что введение эффективного количества лекарственного средства, одного или в комбинации с другим противоопухолевым средством, приводит к снижению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, уменьшению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, увеличению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или предупреждению утяжеления состояния или инвалидности в результате заболевания. Кроме того, термины «эффективный» и «эффективность» в отношении лечения включают как фармакологическую эффективность, так и физиологическую безопасность. Фармакологическая эффективность относится к способности препарата обеспечивать регресс рака у пациента. Физиологическая безопасность относится к уровню токсичности или другим неблагоприятным физиологическим эффектам на клеточном уровне, органном уровне и/или уровне организма (неблагоприятные эффекты), возникающим в результате введения лекарственного средства.

[0093] «Устойчивый ответ» относится к продолжительному воздействию на снижение роста опухоли после прекращения терапии. Например, размер опухоли может остаться неизменным или уменьшиться по сравнению с размером в начале фазы применения. В некоторых вариантах осуществления устойчивый ответ имеет продолжительность, которая по меньшей мере равна продолжительности лечения или по меньшей мере в 1,5, 2,0, 2,5 или 3 раза превышает продолжительность лечения.

[0094] В рамках настоящего изобретения, термин «полный ответ» или «CR» относится к исчезновению всех целевых очагов поражения; «частичный ответ» или «PR» относится по меньшей мере к 30% уменьшению суммы самых длинных диаметров (SLD) целевых очагов поражения, принимая в качестве эталона исходное значение SLD; и «стабильное заболевание» или «SD» не относится ни к достаточному уменьшению целевых очагов поражения, чтобы квалифицировать его как PR, ни к достаточному увеличению, чтобы квалифицировать его как PD, принимая в качестве эталона наименьшее значение SLD с момента начала лечения.

[0095] В рамках настоящего изобретения, термин «выживаемость без прогрессирования» или «PFS» относится к временному периоду во время и после лечения, в течение которого заболевание, подлежащее лечению (например, рак), не утяжеляется. Выживаемость без прогрессирования может включать период времени, в течение которого

пациенты испытывали полный или частичный ответ, и также период времени, в течение которого у пациентов было стабильное заболевание.

[0096] В рамках настоящего изобретения, термин «общий уровень ответа» или «OS» относится к сумме уровня полного ответа (CR) и уровня частичного ответа (PR).

[0097] В рамках настоящего изобретения, термин «общая выживаемость» или «OS» относится к проценту субъектов в группе, которые, вероятно, будут живы после определенного периода времени.

[0098] В рамках настоящего изобретения, выражение «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что вещество или композиция должны быть химически и/или токсикологически совместимыми с другими ингредиентами, входящими в состав, и/или с млекопитающим, которое подвергается лечению ими.

[0099] В рамках настоящего изобретения, выражение «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по настоящему изобретению. Примеры солей включают, не ограничиваясь этим, сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат «мезилат», этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, памоат (т.е. 4,4-метилен-(2-гидрокси-3-нафтоат)), соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь в своей структуре более одного заряженного атома. Случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

[0100] «Введение» или «проводить введение» относится к физическому введению терапевтического средства субъекту с использованием любого из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области. Типичные пути введения конъюгата анти-CD228 антители-лекарственное средство включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутрибрюшинный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии (например, внутривенной инфузии). В рамках настоящего изобретения, выражение «парентеральное введение» означает способы введения, отличные от энтерального и местного, обычно посредством инъекции, и включает, без ограничения, внутривенные, внутримышечные, внутриартериальные, интратекальные, внутрилимфатические, внутриочаговые, интракапсулярные, интраорбитальные, интракардиальные, внутрикожные,

внутрибрюшинные, транстрахеальные, подкожные, субкутикулярные, внутрисуставные, субкапсулярные, субарахноидальные, интраспинальные, эпидуральные и интрастернальные инъекции и инфузии, а также электропорацию *in vivo*. Терапевтический агент можно вводить непарентеральным путем или перорально. Другие непарентеральные пути введения включают местный, эпидермальный или мукозальный путь введения, например интраназально, интравагинально, ректально, сублингвально или местно. Введение также может выполняться, например, один раз, много раз и/или в течение одного или более продолжительных периодов.

[0101] Термины «исходный уровень» или «исходное значение», используемые здесь взаимозаменяемо, могут относиться к оценке или характеристике симптома до назначения терапии (например, конъюгатом анти-CD228 антитело-лекарственное средство, как здесь описано) или в начале назначения терапии. Исходное значение можно сравнить с референсным значением для оценки снижения или ослабления симптома CD228-ассоциированного заболевания, рассматриваемого здесь (например, рака). Термины «референс» или «референсное значение», используемые здесь взаимозаменяемо, могут относиться к оценке или характеристике симптома после проведения терапии (например, конъюгатом анти-CD228 антитело-лекарственное средство, как здесь описано). Референсное значение можно оценить один или более раз во время режима дозирования или цикла лечения или по завершении режима дозирования или цикла лечения. «Референсное значение» может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение, имеющее верхнюю и/или нижнюю границу; диапазон значений; среднестатистическое значение; медианное значение; среднее значение; или значение по сравнению с исходным значением.

[0102] Аналогично «исходное значение» может представлять собой абсолютное значение; относительное значение; значение, имеющее верхнюю и/или нижнюю границу; диапазон значений; среднестатистическое значение; медианное значение; среднее значение; или значение по сравнению с референсным значением. Референсное значение и/или исходное значение могут быть получены от одного субъекта, от двух разных субъектов или от группы субъектов (например, группы из двух, трех, четырех, пяти или более субъектов).

[0103] В рамках настоящего изобретения, термин «монотерапия» означает, что конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство является единственным противоопухолевым средством, вводимым субъекту во время цикла лечения. Однако субъекту можно вводить другие терапевтические средства. Например, противовоспалительные агенты или другие агенты, вводимые субъекту, страдающему раком, для лечения симптомов, связанных с раком, но не основного ракового заболевания, включая, например, воспаление, боль, потерю массы тела и общее недомогание, можно вводить во время периода монотерапии.

[0104] В рамках настоящего изобретения, «неблагоприятное событие» (НЯ) означает любой неблагоприятный и, как правило, непреднамеренный или нежелательный признак

(включая отклонение от нормы в лабораторных исследованиях), симптом или заболевание, связанное с применением медикаментозного лечения. Медикаментозное лечение может иметь один более ассоциированных НЯ, и каждое НЯ может иметь одинаковый или разный уровень тяжести. Ссылка на методы, способные «изменить нежелательные явления», означает режим лечения, который снижает частоту и/или тяжесть одного или более НЯ, ассоциированных с использованием другого режима лечения.

[0105] В рамках настоящего изобретения, «серьезное нежелательное явление» или «СНЯ» представляет собой нежелательное явление, которое соответствует одному из следующих критериев:

- является смертельным или угрожающим жизни (в определении серьезного неблагоприятного события «угрожающий жизни» относится к явлению, при котором пациент подвергался риску смерти на время явления; это не относится к явлению, которое гипотетически могло бы вызвать смерть, если бы оно было более серьезным;

- приводит к стойкой или тяжелой инвалидности/ нетрудоспособности;

- создает врожденную аномалию/врожденный дефект;

- является значимым с медицинской точки зрения, т. е. определяется как явление, которое представляет опасность для пациента или может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для предотвращения одного из вышеперечисленных исходов. При принятии решения о том, является ли НЯ «значимым с медицинской точки зрения», необходимо принять медицинское и научное заключение;

- требует госпитализации или продления имеющейся госпитализации, за исключением следующего: 1) планового лечения или наблюдения за основным заболеванием, не связанного с каким-либо ухудшением состояния; 2) планового или заранее запланированного лечения ранее имеющегося состояния, которое не связано с изучаемым показанием и не ухудшилось с момента подписания информированного согласия; и 3) социальных причин и временного ухода в отсутствие какого-либо ухудшения общего состояния пациента.

[0106] Использование альтернативы (например, «или») следует понимать как означающее одну, обе или любую их комбинацию. В рамках настоящего изобретения, неопределенные артикли «а» или «an» следует понимать как относящиеся к «одному или более» из любого указанных или перечисленных компонентов.

[0107] Термины «примерно» или «состоящий по существу из» относятся к значению или композиции, которое находится в пределах допустимого диапазона ошибки для конкретного значения или композиции, как определено специалистом в данной области, что будет частично зависеть от как значения или состав измеряется или определяется, т. е. ограничения системы измерения. Например, «примерно» или «состоящий по существу из» может означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в данной области. Альтернативно, «примерно» или «содержащий по существу» может означать диапазон до 20%. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, эти термины могут иметь значение до порядка или до 5-кратного значения.

Когда в заявке и формуле изобретения представлены конкретные значения или составы, если не указано иное, то следует предполагать, что значение «примерно» или «в основном состоит из» находится в пределах допустимого диапазона ошибки для этого конкретного значения или состава.

[0108] Ссылка на «примерно» значение или параметр в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на это значение или параметр как таковые. Например, описание, относящееся к «примерно X», охватывает и описывает «X».

[0109] В рамках настоящего изобретения, любой диапазон концентраций, процентный диапазон, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его доли (например, одну десятую и одну сотую целого числа), если не указано иное.

[0110] Различные аспекты раскрытия более подробно описаны в следующих подразделах.

## **II. Общая информация**

[0111] Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с CD228. Настоящее изобретение частично основано на открытии того факта, что конъюгаты антитело-лекарственное средство, включая конъюгаты пегилированный-ММАЕ антитело-лекарственное средство, нацеленные на CD228, особенно эффективны в уничтожении CD228+ экспрессирующих клеток. Было показано, что CD228 экспрессируется при различных формах рака, включая меланому, рак щитовидной железы, рак легких, рак печени, рак поджелудочной железы, рак головы и шеи, рак желудка, колоректальный рак, уротелиальный рак, рак молочной железы и рак шейки матки.

## **III. Молекулы-мишени**

[0112] Если не указано иное, то CD228 относится к человеческому CD228. Иллюстративной последовательности человеческого белка присвоен идентификационный номер UniProt ID NO. P08582.

## **IV. Антитела по изобретению**

[0113] Изобретение относится к антителам, таким как гуманизированные антитела, полученным из мышинового антитела L49. L49 представляет собой моноклональное антитело на основе мышинового иммуноглобулина G1 (IgG1) против CD228, которое было получено от мышей BALB/c, иммунизированных клеточными линиями карциномы легкого и меланомы (Siemers et al., 1997, Bioconjug. Chem. 8: 510-9).

[0114] Аффинность связывания гуманизированных форм мышинового антитела L49 (т.е. константа диссоциации,  $K_D$ ) предпочтительно составляет 5-2 раза от таковой у мышинового антитела L49 к CD228 человека. Гуманизированные антитела L49 специфически связываются с человеческим CD228, как и мышинное антитело, из которого они были получены. Эти антитела связывают CD228 как в нативной форме, так и в виде рекомбинантно экспрессированной, например, из клеток яичника китайского хомячка

(СНО) или клеток эмбриональной почки человека (НЕК). Предпочтительные гуманизированные антитела L49 имеют аффинность, такую же или выше (т.е. превышающую пределы погрешности измерения), аффинности L49 для человеческого CD228 (например, в 1,1-5 раз, 1,1-3 раза, 1,5-3 раза, 1,7-2,3 раза или 1,7-2,1 раза выше аффинности или примерно в 2 раза выше аффинности, чем у L49). Предпочтительные гуманизированные антитела L49 связываются с тем же эпитопом и/или конкурируют с мышинным L49 за связывание с CD228 человека.

[0115] Предпочтительные антитела по изобретению ингибируют рак (например, рост клеток, метастазирование и/или летальность для организмов), как показано на опухолевых клетках, размножающихся в культуре, на животной модели или в клинических испытаниях. Животные модели можно воспроизвести имплантацией линий опухолевых клеток человека, экспрессирующих CD228, в соответствующие штаммы грызунов с иммунодефицитом, например, бестимусным мышам nude или мышам SCID. Такие линии опухолевых клеток можно создать у иммунодефицитных грызунов-хозяев в виде солидной опухоли посредством подкожных инъекций или в виде диссеминированных опухолей посредством внутривенных инъекций.

[0116] После создания в организме хозяина эти опухолевые модели можно применять для оценки терапевтической эффективности анти-CD228 антител или их конъюгированных форм, как описано в примерах.

[0117] Обычно анти-CD228 антитела и/или конъюгаты анти-CD228 антитело-лекарственное средство по изобретению связываются с CD228, например человеческим CD228, и оказывают цитостатическое и цитотоксическое действие на злокачественные клетки, такие как раковые клетки. Анти-CD228 антитела по настоящему изобретению предпочтительно являются моноклональными, и могут быть мультиспецифическими, человеческими, гуманизированными или химерными антителами, одноцепочечными антителами, фрагментами Fab, фрагментами F(ab'), фрагментами, продуцированными библиотекой экспрессии Fab, и фрагментами, связывающими CD228, любого из вышеуказанного. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитела по изобретению специфически связываются с CD228. Молекулы иммуноглобулина по настоящему изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

[0118] В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения анти-CD228 антитела представляют собой антигенсвязывающие фрагменты (например, человеческие антигенсвязывающие фрагменты), как здесь описано, и включают, не ограничиваясь этим, Fab, Fab' и F(ab')<sub>2</sub>, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv) и фрагменты, содержащие либо V<sub>L</sub>-домен, либо V<sub>H</sub>-домен. Антигенсвязывающие фрагменты, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменную(ые) область(и) одна или в комбинации со всем или частично из следующего: шарнирной области, доменов CH1, CH2, CH3 и CL. В настоящее описание также включены

антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию вариабельной(ых) области(ей) с шарнирной областью, доменов CH1, CH2, CH3 и CL. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитела или их антигенсвязывающие фрагменты происходят от человека, мыши (например, мыши и крысы), осла, овцы, кролика, козы, морской свинки, верблюдовых, лошади или курицы.

[0119] Анти-CD228 антитела по настоящему изобретению могут быть моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими, или могут обладать большей мультиспецифичностью. Мультиспецифические антитела могут быть специфичными для разных эпитопов CD228 или могут быть специфичными как для CD228, так и для гетерологичного белка. См., например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt et al., 1991, J. Immunol., 147:60-69; патенты США № 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; Kostelny et al., 1992, J. Immunol., 148:1547-1553.

[0120] Анти-CD228 антитела по настоящему изобретению можно описать или определить с точки зрения конкретных CDR, которые они содержат. Точные границы аминокислотной последовательности конкретного CDR или FR можно легко определить с использованием любой из ряда хорошо известных систем, включая описанную Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (система нумерации «Kabat»); Al-Lazikani *et al.*, (1997) JMB 273,927-948 (система нумерации «Chothia»); MacCallum *et al.*, J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), “Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography,” J. Mol. Biol. 262, 732-745” (система нумерации «Contact»); Lefranc M.P. *et al.*, “IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,” Dev. Comp. Immunol., 2003 Jan; 27(1):55-77 (система нумерации «IMGT»); Honegger A. and Plückthun A., «Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool», J. Mol. Biol., 2001 Jun 8;309(3):657-70, (система нумерации «Aho»); и Martin *et al.*, «Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm», PNAS, 1989, 86(23):9268-9272, (система нумерации «AbM»). Границы конкретного CDR могут варьироваться в зависимости от системы, используемой для идентификации. В некоторых вариантах осуществления «CDR» или «определяющий комплементарность участок» или отдельные определенные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) данного антитела или его области (например, его вариабельной области) следует понимать, что он охватывает (или конкретный) CDR, как определено любой из вышеуказанных систем. Например, если указано, что конкретный CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующего CDR в данной аминокислотной последовательности области V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub>, то подразумевается, что такой CDR имеет последовательность соответствующего CDR (например, CDR-H3) в вариабельной области, определенную любой из вышеуказанных систем. Система для идентификации конкретного CDR или CDR может быть указана, например, CDR, определенный методом Kabat, Chothia, AbM или IMGT.

[0121] Последовательности CDR анти-CD228 антител и конъюгатов анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанных здесь, соответствуют системе нумерации по Kabat, описанной в монографии Kabat et al. (1991), «Sequences of Proteins of Immunological Interest», 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD.

[0122] В одном аспекте настоящее изобретение относится к анти-CD228 антителу, содержащему переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи включает: (i) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (ii) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (iii) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и/или где переменная область легкой цепи включает: (i) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, (ii) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и (iii) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, где CDR анти-CD228 антитела определены по системе нумерации Kabat.

[0123] Анти-CD228 антитело, описанное здесь, может содержать любую подходящую каркасную последовательность переменной области при условии, что антитело сохраняет способность связываться с CD228 (например, CD228 человека). В рамках настоящего изобретения, каркасные области тяжелой цепи обозначены «HC-FR1-FR4», и каркасные области легкой цепи обозначены «LC-FR1-FR4». В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело содержит каркасную последовательность переменной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 9, 10, 11 и 12 (HC-FR1, HC-FR2, HC-FR3 и HC-FR4 соответственно). В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело содержит каркасную последовательность переменной области легкой цепи SEQ ID NO: 13, 14, 15 и 16 (LC-FR1, LC-FR2, LC-FR3 и LC-FR4 соответственно).

[0124] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антител, описанных здесь, переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность:

QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLYIGYISDSGI  
 TYYNPSLKS RVTISRDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCARRTLATYYAMDYWGQGL  
 VTVSS (SEQ ID NO: 7), и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность  
 DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSDGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYRVS NRF  
 SGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 8).

[0125] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антител, описанных здесь, последовательности CDR тяжелой цепи включают следующее:

- a) CDR-H1 (SGYWN (SEQ ID NO: 1));
- b) CDR-H2 (YISDSGITYYNPSLKS (SEQ ID NO: 2)); и
- c) CDR-H3 (RTLATYYAMDY (SEQ ID NO: 3)).

[0126] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антител, описанных здесь, последовательности FR тяжелой цепи включают следующее:

- a) HC-FR1 (QVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGDSIT (SEQ ID NO: 9));
- b) HC-FR2 (WIRQPPGKGGLEYIG (SEQ ID NO: 10));
- c) HC-FR3 (RVTISRDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCAR (SEQ ID NO: 11)); и
- d) HC-FR4 (WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 12)).

[0127] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антител, описанных здесь, последовательности CDR легкой цепи включают следующее:

- a) CDR-L1 (RASQSLVHSDGNTYLH (SEQ ID NO: 4));
- b) CDR-L2 (RVSNRFS (SEQ ID NO: 5)); и
- c) CDR-L3 (SQSTHVPPT (SEQ ID NO: 6)).

[0128] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антител, описанных здесь, последовательности FR легкой цепи включают следующее:

- a) LC-FR1 (DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISC (SEQ ID NO: 13));
- b) LC-FR2 (WYQQRPGQSPRLLIY (SEQ ID NO: 14));
- c) LC-FR3 (GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYC (SEQ ID NO: 15)); и
- d) LC-FR4 (FGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)).

[0129] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-CD228 антителу и/или конъюгату анти-CD228 антитело-лекарственное средство, которые связываются с CD228 (например, человеческим CD228), где антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где антитело содержит:

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую:

- (1) HC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (2) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;
- (3) HC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;
- (4) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2;
- (5) HC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;
- (6) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и
- (7) HC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12, и/или

(b) вариабельную область легкой цепи, содержащую:

- (1) LC-FR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13;
- (2) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (3) LC-FR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14;
- (4) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5;
- (5) LC-FR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15;
- (6) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; а

также

- (7) LC-FR4, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16.

[0130] В одном аспекте настоящее изобретение относится к анти-CD228 антителу и/или конъюгату анти-CD228 антитело-лекарственное средство, содержащему

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, или содержащему вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В одном аспекте настоящее изобретение относится к анти-CD228 антителу, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и содержащему вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

[0131] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-CD228 антителу и/или конъюгату анти-CD228 антитело-лекарственное средство, содержащему вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, имеющая по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референсной последовательности и сохраняет способность связываться с CD228 (например, CD228 человека). В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 7 было заменено, инсерцировано и/или делецировано в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, инсерции или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) имеют место в областях за пределами CDR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В конкретном варианте осуществления вариабельная область тяжелой цепи включает один, два или три CDR, выбранных из: (a) CDR-H1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, (b) CDR-H2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и (c) CDR-H3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3.

[0132] В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к анти-CD228 антителу и/или конъюгату анти-CD228 антитело-лекарственное средство,

содержащему вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи, содержащая аминокислотную последовательность, имеющая по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референсной последовательности и сохраняет способность связываться с CD228 (например, CD228 человека). В некоторых вариантах осуществления в SEQ ID NO: 8 было заменено, инсерцировано и/или делецировано в общей сложности от 1 до 10 аминокислот. В некоторых вариантах осуществления замены, инсерции или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) имеют место в областях за пределами CDR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело содержит последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, включая посттрансляционные модификации этой последовательности. В конкретном варианте осуществления вариабельная область легкой цепи содержит один, два или три CDR, выбранных из: (a) CDR-L1, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, (b) CDR-L2, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и (c) CDR-L3, содержащего аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

[0133] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело- лекарственное средство содержит вариабельную область тяжелой цепи, как в любом из вариантов осуществления, описанных выше, и вариабельную область легкой цепи, как в любом из вариантов осуществления, описанных выше. В одном варианте осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8, включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты.

[0134] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство содержит: i) CDR1 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, CDR2 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, CDR3 тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и ii) CDR1 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, CDR2 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и CDR3 легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, где CDR анти-CD228 антитела определены по системе нумерации Kabat.

[0135] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство содержит: i) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с вариабельной областью тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и ii) аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85% идентичность последовательности с вариабельной областью легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи циклизуется с образованием пироглутаминовой кислоты.

[0136] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело или анти-CD228 антитело в конъюгате анти-CD228 антитело-лекарственное средство представляет собой моноклональное антитело.

[0137] Анти-CD228 антитела по настоящему изобретению также можно описать или определить с точки зрения их аффинности связывания с CD228 (например, с человеческим CD228). Предпочтительные аффинности связывания включают аффинности, где константа диссоциации или  $K_D$  ниже  $5 \times 10^{-2}$  М,  $10^{-2}$  М,  $5 \times 10^{-3}$  М,  $10^{-3}$  М,  $5 \times 10^{-4}$  М,  $10^{-4}$  М,  $5 \times 10^{-5}$  М,  $10^{-5}$  М,  $5 \times 10^{-6}$  М,  $10^{-6}$  М,  $5 \times 10^{-7}$  М,  $10^{-7}$  М,  $5 \times 10^{-8}$  М,  $10^{-8}$  М,  $5 \times 10^{-9}$  М,  $10^{-9}$  М,  $5 \times 10^{-10}$  М,  $10^{-10}$  М,  $5 \times 10^{-11}$  М,  $10^{-11}$  М,  $5 \times 10^{-12}$  М,  $10^{-12}$  М,  $5 \times 10^{-13}$  М,  $10^{-13}$  М,  $5 \times 10^{-14}$  М,  $10^{-14}$  М,  $5 \times 10^{-15}$  М или  $10^{-15}$  М.

[0138] В некоторых вариантах осуществления связывание анти-CD228 антитела по настоящему изобретению зависит от pH, так что антитело демонстрирует различное связывание в градиенте pH. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело проявляет максимальное связывание при pH примерно от 5,5 до примерно 6,3. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело проявляет максимальное связывание при pH примерно 5,6. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело проявляет максимальное связывание при pH примерно 6,3. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело проявляет минимальное связывание при pH примерно 5,1 или ниже.

[0139] Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, тяжелые цепи которых обозначены  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  и  $\mu$  соответственно. Классы  $\gamma$  и  $\alpha$  дополнительно делятся на подклассы, например, у человека экспрессируются следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. IgG1 антитела могут находиться во множестве полиморфных вариантов, называемых аллотипами (см. обзор в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 4, 1-7), любой из которых подходит для применения в некоторых вариантах осуществления, раскрытых здесь. Общие аллотипные варианты в человеческих популяциях обозначаются буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело может содержать Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область человеческого IgG. В дополнительных вариантах осуществления Fc-область человеческого IgG включает человеческий IgG1.

[0140] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство содержит вариабельную

область тяжелой цепи, как в любом из вариантов осуществления, описанных выше, и переменную область легкой цепи, как в любом из вариантов осуществления, описанных выше. В одном варианте осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA  
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP  
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY  
TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK  
LTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:17), и константную  
область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18),  
включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. В другом варианте  
осуществления антитело содержит константную область тяжелой цепи, содержащую  
аминокислотную последовательность:

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS  
GLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG  
PCVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS  
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV  
DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:19), и константную  
область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность:  
TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQD  
SKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18),  
включая посттрансляционные модификации этих последовательностей. SEQ ID NO: 19  
содержит замену серина на цистеин в аминокислотном положении 239 изотипа  
человеческого IgG1. Присутствие дополнительного остатка цистеина позволяет  
образовывать межцепочечную дисульфидную связь. Такое образование межцепочечной  
дисульфидной связи может вызывать стерические затруднения, тем самым снижая  
аффинность связывающего взаимодействия Fc-область-FcγR. Остаток цистеина, введенный  
в Fc- область константной области IgG или рядом с ней, также может служить сайтом для  
конъюгации с терапевтическими средствами (т. е. связывания цитотоксических  
лекарственных средств с использованием тиол-специфических реагентов, таких как  
малеимидные производные лекарственных средств). Присутствие терапевтического агента  
вызывает стерические затруднения, тем самым дополнительно снижая аффинность  
связывающего взаимодействия Fc-область-FcγR. Другие замены в любом из положений  
234, 235, 236 и/или 237 снижают аффинность к Fcγ-рецепторам, особенно FcγRI-рецептору  
(см., например, патенты США № 6624821, 5624821).

[0141] В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело или анти-CD228

антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство представляет собой гуманизированное антитело hL49 HALC. hL49 HALC содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи SEQ ID NO: 7 и последовательность вариабельной области легкой цепи SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело или анти-CD228 антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство представляет собой гуманизированное антитело hL49. hL49 содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

[0142] Антитела также включают производные, которые модифицированы, т. е. посредством ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу таким образом, что ковалентное присоединение не препятствует связыванию антитела с CD228 или проявлению цитостатического или цитотоксического действия на HD клетки. Например, но не в качестве ограничения, производные антител включают антитела, которые были модифицированы, например, гликозилированием, ацетилированием, ПЭГилированием, фосфорилированием, амидированием, дериватизацией известными защитными/блокирующими группами, протеолитическим расщеплением, связыванием с клеточным лигандом или другим белком и т. д. Любую из многочисленных химических модификаций можно провести известными методами, включая, не ограничиваясь этим, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т. д. Кроме того, производное может содержать одну или более не-классических аминокислот.

#### **Гуманизированные антитела**

[0143] Гуманизированное антитело представляет собой сконструированное антитело, в котором CDR из «нечеловеческого» «донорного» антитела пересажены в последовательности человеческого «акцепторного» антитела (см., например, Queen, патенты США № 5530101 и 5585089; Winter, патент США № 5225539; Carter, патент США № 6407213; Adair, патент США № 5859205; и Foote, патент США № 6881557). Последовательности акцепторного антитела могут представлять собой, например, последовательность зрелого человеческого антитела, композицию таких последовательностей, консенсусную последовательность, состоящую из последовательностей человеческого антитела, или последовательность области зародышевой линии. Предпочтительной акцепторной последовательностью для тяжелой цепи является  $V_H$  экзон  $V_H1-2$  зародышевой линии (также называемый в литературе HV1-2) (Shin et al., 1991, EMBO J., 10: 3641-3645), и для шарнирной области (JH), экзон JH-6 (Mattila et al., 1995, Eur. J. Immunol., 25: 2578-2582). Для легкой цепи предпочтительной

акцепторной последовательностью является экзон VK2-30 (также называемый в литературе KV2-30), и для шарнирной области экзон JK-4 (Hieter et al., 1982, *J. Biol. Chem.*, 257: 1516-1522). Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее некоторые или все CDR полностью по существу из донорного антитела и каркасные последовательности вариабельной области и константные области, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей человеческого антитела. Аналогично гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере один, два и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и также каркасную последовательность вариабельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, по существу из каркасной последовательности вариабельной области тяжелой цепи и константной области человека. Аналогично гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере один, два и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность вариабельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, если она присутствует, по существу из каркасной последовательности вариабельной области легкой цепи и константной области человека. За исключением нанотел и dAb, гуманизированное антитело включает гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе по существу происходит из соответствующего CDR в «нечеловеческом» антителе, когда по меньшей мере 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по системе нумерации Kabat) идентичны между соответствующими CDR. Последовательности каркасного участка вариабельной области цепи антитела или константной области цепи антитела по существу происходят из последовательности каркасного участка вариабельной области человека или константной области человека соответственно, когда по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определяемых по системе нумерации Kabat, идентичны.

[0144] Несмотря на то, что гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, как определено по системе нумерации Kabat) мышинового антитела, они также могут быть получены с меньшим, чем все CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5) CDR из мышинового антитела (например, Pascalis et al., *J. Immunol.*, 169: 3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36: 1079-1091, 1999; Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164: 1432-1441, 2000).

[0145] Некоторые аминокислоты из каркасных остатков вариабельной области человека могут быть выбраны для замены на основании их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование такого возможного влияния осуществляется путем моделирования, изучения характеристик аминокислот в определенных местах или эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

[0146] Например, если аминокислота в остатке каркасного участка зрелой вариабельной области мыши отличается от аминокислоты в выбранном остатке каркасного участка зрелой вариабельной области человека, то человеческая аминокислота каркасного

участка может быть заменена эквивалентной аминокислотой каркасного участка из мышинового антитела в случае, если имеются основания ожидать, что данная аминокислота:

- (1) нековалентно связывается непосредственно с антигеном,
- (2) находится рядом с CDR-участком,
- (3) иначе взаимодействует с CDR-участком (например, находится в пределах примерно 6 Å от CDR-участка); или
- (4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями.

[0147] Один аспект изобретения относится к гуманизированным формам мышинового антитела L49. Один такой гуманизированный вариант мышинового антитела L49 обозначен как HALC. HALC содержит зрелую вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и зрелую вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления N-концевой глутамин вариабельной области тяжелой цепи подвергается циклизации с образованием пироглутаминовой кислоты. Гуманизированные антитела по изобретению включают варианты гуманизованного антитела HALC, в которых зрелая вариабельная область гуманизированной тяжелой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичность с SEQ ID NO: 7, и зрелая вариабельная область гуманизированной легкой цепи показывает по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 8. Предпочтительно в таких антителах сохраняются некоторые или все обратные мутации, введенные в HALC. Другими словами по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или предпочтительно все 5 положений тяжелой цепи H27, H30, H47, H71 и H78 заняты D, T, Y, R и Y соответственно. Аналогично, положение L36 предпочтительно занято Y, и положение L46 предпочтительно занято L. В некоторых вариантах осуществления положение L2 предпочтительно занято F. В некоторых вариантах осуществления CDR-участки таких гуманизированных антител идентичны или по существу идентичны CDR-участкам донорного мышинового антитела. В предпочтительном варианте осуществления положение L28 CDR1 легкой цепи занято D. CDR-участки можно определить любой общепринятой системой нумерации (например, по Chothia), но предпочтительно, определить по системе нумерации Kabat. В одном варианте осуществления гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 7, и каркасы вариабельной области по меньшей мере с 95% идентичностью к каркасам вариабельной области SEQ ID NO: 7. В другом варианте осуществления гуманизованное антитело включает легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8, и каркасы вариабельной области по меньшей мере с 95% идентичностью к каркасам вариабельной области SEQ ID NO: 8. В дополнительном варианте осуществления гуманизованное антитело включает тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 7 и каркасы вариабельной области по меньшей мере с 95% идентичностью к каркасам вариабельной области SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8, и каркасы вариабельной области по меньшей мере с 95% идентичностью к каркасам вариабельной области SEQ ID NO: 8. В одном варианте осуществления гуманизованное

антитело включает тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 7, и каркасы варибельной области по меньшей мере с 98% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 7. В еще одном варианте осуществления гуманизованное антитело содержит легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8, и каркасы варибельной области по меньшей мере с 98% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 8. В дополнительном варианте осуществления гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 7, и каркасы варибельной области по меньшей мере с 98% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8 и каркасы варибельной области по меньшей мере с 98% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 8. В одном варианте гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 7 и каркасы варибельной области по меньшей мере с 99% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 7. В еще одном варианте гуманизованное антитело содержит легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8, и каркасы варибельной области по меньшей мере с 99% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 8. В дополнительном варианте осуществления гуманизованное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 7, и каркасы варибельной области по меньшей мере с 99% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 7, и легкую цепь, содержащую 3 CDR с SEQ ID NO: 8, и каркасы варибельной области по меньшей мере с 99% идентичностью к каркасам варибельной области SEQ ID NO: 8.

[0148] Гуманизованное антитело HALC содержит замену аспарагина на аспарагиновую кислоту в аминокислотном положении L28 по сравнению с мышинным антителом L49, которая находится в CDR1 легкой цепи. Данная замена элиминирует дезамидирование, наблюдаемое в гуманизованном варианте HALB L49, и имеет ограниченную изомеризацию. В некоторых вариантах осуществления любого из антител, описанных здесь, в варибельной области легкой цепи отсутствует эта замена в положении L28. В некоторых вариантах осуществления антител, описанных здесь, варибельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность: DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYRVS NRF SGVPDFRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 20). В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело представляет собой HALB, которое содержит варибельную область тяжелой цепи, содержащую SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, содержащую SEQ ID NO: 20.

[0149] Поскольку гуманизованные антитела демонстрируют любую вариацию от приведенного в качестве примера гуманизованного антитела HALC, то одной из возможностей таких дополнительных изменений являются дополнительные обратные мутации в каркасах варибельной области. Однако такие дополнительные обратные мутации не являются предпочтительными, поскольку они, как правило, не повышают аффинность, и введение большего количества мышинных остатков может повысить риск

иммуногенности.

[0150] Другая возможная вариация заключается в замене определенных остатков в CDR мышинового антитела соответствующими остатками из последовательностей CDR человека, обычно из CDR человеческих акцепторных последовательностей, используемых при конструировании приведенных в качестве примеров гуманизированных антител. В некоторых антителах только часть CDR, а именно подгруппа остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR, необходима для сохранения связывания в гуманизированном антителе. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не входящие в CDR, можно идентифицировать на основе результатов предшествующих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 часто не являются необходимыми) из CDR-участков по Kabat, лежащих вне гипервариабельных петель по Chothia (Chothia, J. Mol. Biol., 196: 901, 1987), молекулярным моделированием и/или эмпирически, или как описано в публикации Gonzales et al., Mol. Immunol., 41: 863 (2004). В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых один или более остатков донорных CDR отсутствуют или в которых пропущены полностью донорные CDR, аминокислота, занимающая это положение, может представлять собой аминокислоту, занимающую соответствующее положение (согласно системе нумерации Kabat) в последовательности акцепторного антитела. Число таких замен акцепторных на донорные аминокислоты в CDR, которые необходимо включить, отражает баланс соображений в отношении конкуренции. Такие замены потенциально преимущественны для уменьшения количества мышинных аминокислот в гуманизированном антителе и, следовательно, снижения потенциальной иммуногенности. Однако замены также могут вызвать изменения аффинности, и предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Положения для замены в CDR и заменяемые аминокислоты также можно выбрать эмпирически.

[0151] Хотя, это и не является предпочтительным, можно осуществить другие аминокислотные замены, например, в остатках каркаса, не контактирующих с CDR, или даже в некоторых аминокислотных остатках, потенциально контактирующих с CDR, в CDR. Часто замены, сделанные в вариантных гуманизированных последовательностях, являются консервативными по отношению к замененным аминокислотам HALC. Предпочтительно замены по отношению к HALC (консервативные или неконсервативные) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или эффективность гуманизированного mAb, т. е. его способность связываться с человеческим CD228 и ингибировать рост опухолевых клеток.

[0152] Варианты обычно отличаются от последовательностей зрелой вариабельной области тяжелой и легкой цепи HALC небольшим числом (например, обычно не более чем на 1, 2, 3, 5 или 10 в зрелой вариабельной области легкой цепи или тяжелой цепи, или оба) замен, делеций или инсерций.

#### **Выбор константной области**

[0153] Вариабельные области тяжелой и легкой цепей гуманизированных антител могут быть связаны по меньшей мере с участком константной области человека. Выбор

константной области частично зависит от того, насколько требуется антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплемент-зависимая цитотоксичность. Например, человеческие изотипы IgG1 и IgG3 обладают высокой комплемент-зависимой цитотоксичностью, человеческий изотип IgG2 обладает слабой комплемент-зависимой цитотоксичностью. IgG4 лишен комплемент-зависимой цитотоксичности. Человеческие IgG1 и IgG3 также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем человеческие IgG2 и IgG4. Константные области легкой цепи могут представлять собой тип лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепи связаны через спейсер.

[0154] Человеческие константные области показывают аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между различными субъектами, т. е. константные области могут различаться у разных субъектов в одном или более полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью одного или более других изотипов. [0155] Одна или более аминокислот на амино- или карбокси-концах легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут быть пропущены или дериватизированы в части или во всех молекулах. Замены могут быть проведены в константных областях для снижения или повышения эффекторной функции, такой как комплемент-опосредованная цитотоксичность или ADCC (см., например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 4005, 2006) или для пролонгации периода полураспада у людей (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem., 279: 6213, 2004).

[0156] Иллюстративная замена включает аминокислотную замену нативной аминокислоты на остаток цистеина, введенный в аминокислотное положение 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутацию S239C в изотипе человеческого IgG1 (заявка на патент США 20100158909). Присутствие дополнительного остатка цистеина позволяет образовывать межцепочечную дисульфидную связь. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызывать стерические затруднения, тем самым снижая аффинность связывания взаимодействия Fc-область-FcγR. Остаток(и) цистеина, введенный в или в непосредственной близости от Fc-области константной области IgG, также может служить в качестве сайтов для конъюгации с терапевтическими средствами (т.е. связывания цитотоксических лекарственных средств с использованием тиол-специфических реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств). Присутствие терапевтического средства вызывает стерические затруднения, тем самым дополнительно снижая аффинность связывания взаимодействия Fc-область-FcγR. Другие замены в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 снижают аффинность к Fcγ-рецепторам, особенно FcγRI-рецептору (см., например, патенты США №

6624821, № 5624821)

[0157] Время полураспада антитела *in vivo* может также оказывать влияние на его эффекторные функции. Период полураспада антитела можно увеличить или уменьшить, чтобы изменить его терапевтическую активность. FcRn представляет собой рецептор, структурно подобный антигену МНС класса I, который нековалентно связывается с  $\beta$ 2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз в ткани (Ghetie and Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.*, 18: 739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.*, 25: 97-113). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6,0 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет IgG возвращаться в кровоток (Ghetie and Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.*, 18: 739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.*, 25: 97-113). Была картирована область человеческого IgG1, участвующая в связывании FcRn (Shields et al, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 6591-604). Замены аланина в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 человеческого IgG1 усиливают связывание FcRn (Shields et al, 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 6591-604). Молекулы IgG1, несущие эти замены, имеют более длительный период полураспада в сыворотке. Следовательно, такие модифицированные молекулы IgG1 могут быть способны выполнять свои эффекторные функции и, следовательно, проявлять свою терапевтическую эффективность в течение более длительного периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие примерные замены для повышения связывания с FcRn включают Gin в положении 250 и/или Leu в положении 428. Для всех положений в константной области используется нумерация EU.

[0158] Олигосахариды, ковалентно связанные с консервативным Asn297, участвуют в способности Fc-области IgG связываться с Fc $\gamma$ R (Lund et al, 1996, *J. Immunol.*, 157: 4963-69; Wright and Morrison, 1997, *Trends Biotechnol.*, 15: 26-32). Конструирование такой гликоформы на IgG может значительно повысить IgG-опосредованную ADCC. Добавление модификаций в виде разделенного пополам N-ацетилглюкозамина (Umana et al., 1999, *Nat. Biotechnol.*, 17: 176-180; Davies et al., 2001, *Biotech. Bioeng.*, 74: 288-94) к этой гликоформе или удаление фукозы (Shields et al. al, 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 26733-40; Shinkawa et al, 2003, *J. Biol. Chem.*, 278: 6591-604; Niwa et al., 2004, *Cancer Res.*, 64: 2127-33) из этой гликоформы являются двумя примерами конструирования Fc IgG, которые повышают связывание между Fc IgG и Fc $\gamma$ R, тем самым усиливая Ig-опосредованную ADCC активность. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело или анти-CD228 антитело в конъюгате антитело-лекарственное средство, описанные здесь, имеет гликан, присоединенный к консервативному остатку Asn297 константной области, где нумерация аминокислотных остатков в константной области соответствует индексу ЕС, как описано в монографии Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). В некоторых вариантах осуществления гликан является биантенным. В некоторых вариантах осуществления гликан является кор-фукозилированным. В некоторых вариантах осуществления в гликане отсутствуют концевые остатки галактозы. В некоторых вариантах осуществления гликан

является биантенным и кор-фукозилированным. В некоторых вариантах осуществления гликан является биантенным и не имеет концевых остатков галактозы. В некоторых вариантах осуществления гликан является кор-фукозилированным и не имеет концевых остатков галактозы. В некоторых вариантах осуществления гликан является биантенным, кор-фукозилированным и не имеет остатков галактозы. В некоторых вариантах осуществления в популяции анти-CD228 антител или анти-CD228 антител конъюгатов антитело-лекарственное средство, описанных здесь, консервативные остатки Asn297 константных областей, где нумерация аминокислотных остатков в константной области соответствует системе нумерации по индексу ЕС, как описано Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991), преимущественно заняты биантенными, кор-фукозилированными гликанами без концевых остатков галактозы.

[0159] Системная замена гидрофильных аминокислот Fc-области человеческого IgG1 привела к образованию вариантов IgG с измененной аффинностью связывания с Fc $\gamma$ R (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 6591-604). При сравнении с родительским IgG1 подгруппа этих вариантов, включающих замены Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333 Lys334 на Ala, демонстрируют повышенную аффинность связывания с Fc $\gamma$ R и активностью ADCC (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 6591-604; Okazaki et al., 2004, *J. Mol. Biol.*, 336: 1239-49).

[0160] Активность антител в связывании комплемента (связывании с C1q и CDC активности) можно повысить заменами в Lys326 и Glu333 (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.*, 166: 2571-2575). Такие же замены в остоле человеческого IgG2 могут привести к изменению изоформа антитела, который слабо связывается с C1q и является дефицитным в активации комплемента, с получением изоформа, который может связываться с C1q и опосредовать CDC (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.*, 166: 2571 -75). Несколько других методов также применялись для повышения активности антител в связывании комплемента. Например, пересадка участка карбоксиконцевого хвоста из 18 аминокислот IgM на карбоксиконец IgG значительно усиливает их CDC активность. Это наблюдается даже в случае IgG4, который обычно не проявляет детектируемой активности CDC (Smith et al., 1995, *J. Immunol.*, 154: 2226-36). Также замена Ser444, расположенного рядом с карбоксиконцом тяжелой цепи IgG1, на Cys-индуцированную димеризацию «хвост-в-хвост» IgG 1, приводит к 200-кратному повышению CDC активности по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes et al., 1992, *J. Immunol.*, 148: 2918-22). Кроме того, конструкция биспецифического диатела со специфичностью в отношении C1q также придает CDC активность (Kontermann et al., 1997, *Nat. Biotech.*, 15: 629-31).

[0161] Активность комплемента можно снизить мутацией по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи на остаток, имеющий другую боковую цепь, например Ala. Другие алкилзамещенные неионные остатки, такие как Gly, He, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Tyr, Trp и Pro вместо любого из трех остатков, также снижают или отменяют связывание C1q. Ser, Thr,

Cys и Met можно использовать в остатках 320 и 322, но не 318, для снижения или отмены активности связывания Clq.

[0162] Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может модифицировать, но не отменять, активность связывания Clq. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к элиминации литической активности, но лишь незначительно снижает (примерно в три раза) аффинность к Clq. Такое изменение разрушает сайт гликозилирования и элиминирует присутствие углеводов, необходимых для активации комплемента. Любая другая замена в этом сайте также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любые их комбинации также снижают связывание Clq: D270A, K322A, P329A и P31 IS (см. WO 06/036291).

[0163] Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую пермутацию остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах. Также может присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций относительно природной константной области человека, таких как указанные выше, для уменьшения связывания Fc $\gamma$  рецептора или увеличения связывания с FcRN.

[0164] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанные здесь, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанные здесь, содержит константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанные здесь, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанные здесь, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19. В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело и/или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанные здесь, содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18.

#### V. Экспрессия рекомбинантных антител

[0165] Гуманизированные антитела обычно получают рекомбинантной экспрессией. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают регуляторную последовательность экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антител, включая природные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно регуляторные последовательности экспрессии

представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфектировать эукариотические клетки-хозяева. После включения вектора в подходящего хозяина, хозяина поддерживают в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей, и для сбора и очистки перекрестно реагирующих антител.

[0166] Клетки млекопитающих являются предпочтительным хозяином для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). Ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, был разработан в данной области, и он включает линии клеток СНО (например, DG44), различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки являются «нечеловеческими». Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать в себя регуляторные последовательности экспрессии, такие как ориджин репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.*, 89:49 (1986)) и необходимые сайты процессинга информации, такие как сайты связывания рибосомы, сайты сплайсинга РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминаторов транскрипции. Предпочтительные регуляторные последовательности экспрессии представляют собой промоторы, происходящие от эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, вируса папилломы крупного рогатого скота и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.*, 148: 1149 (1992).

[0167] После экспрессии антитела можно очистить в соответствии со стандартными процедурами в данной области, включая очистку ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и т.п. (см. в общем Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

## **VI. Нуклеиновые кислоты**

[0168] Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любую из гуманизированных тяжелых и легких цепей, описанных выше. Обычно нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый со зрелой тяжелой и легкой цепями. Кодирующие последовательности нуклеиновых кислот могут находиться в функциональной связи с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, такими как промотор, энхансер, сайт связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут находиться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать, например, твердофазным синтезом или ПЦР с использованием перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелую и легкую цепи, могут быть соединены в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, в экспрессионном векторе, или могут быть отдельными, например, каждая клонирована в свой собственный экспрессионный вектор.

[0169] В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к

нуклеиновым кислотам, кодирующим анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как здесь описано. Кроме того, настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как здесь описано. Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, экспрессирующим нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как здесь описано. Кроме того, настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как здесь описано.

[0170] Анти-CD228 антитела, описанные здесь, могут быть получены хорошо известными рекомбинантными методами с использованием хорошо известных экспрессионных векторных систем и клеток-хозяев. В одном варианте осуществления антитела получают в клетке CHO с использованием экспрессионной векторной системы GS, описанной в публикации De la Cruz Edmunds et al., 2006, *Molecular Biotechnology*, 34; 179-190, EP216846, патенте США № 5981216, WO 87/04462, EP323997, патенте США № 5591639, патенте США № 5658759, EP 338841, патенте США № 5879936 и патенте США № 5891693.

[0171] Моноклональные анти-CD228 антитела, описанные здесь, можно, например, получить гибридным методом, впервые описанным Kohler et al., *Nature*, 256, 495 (1975), или можно получить методами рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также можно выделить из фаговых библиотек антител с использованием методик, описанных, например, в публикациях Clackson et al., *Nature*, 352, 624-628 (1991) и Marks et al., *J. Mol. Biol.*, 222 (3): 581-597 (1991). Моноклональные антитела можно получить из любого подходящего источника. Таким образом, например, моноклональные антитела можно получить из гибридом, полученных из В-клеток селезенки мышей, полученных от мышей, иммунизированных представляющим интерес антигеном, например, в форме клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей представляющий интерес антиген. Моноклональные антитела также могут быть получены из гибридом, полученных из экспрессирующих антитела клеток иммунизированных людей или млекопитающих, не относящихся к человеку, таких как крысы, собаки, приматы и т. д.

## VII. Конъюгаты антитело-лекарственное средство

[0172] Анти-CD228 антитела можно конъюгировать с цитотоксическими или цитостатическими группами (включая их фармацевтически совместимые соли) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Особенно подходящими фрагментами для конъюгации с антителами являются цитотоксические агенты (например, химиотерапевтические препараты), ферменты, превращающие пролекарства, радиоактивные изотопы или соединения или токсины (эти группы в совокупности относятся к терапевтическому средству). Например, анти-CD228 антитело может быть конъюгировано с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический препарат, или токсином (например, цитостатическим или цитоцидным агентом, например, таким как

абрин, рицин А, экзотоксин *pseudomonas* или дифтерийный токсин).

[0173] Анти-CD228 антитело можно конъюгировать с ферментом, превращающим пролекарство. Фермент, превращающий пролекарство, может быть рекомбинантно слит с антителом или химически конъюгирован с ним с использованием известных методов. Типичными ферментами, превращающими пролекарства, являются карбоксипептидаза G2, бета-глюкуронидаза, пенициллин-V-амидаза, пенициллин-G-амидаза,  $\beta$ -лактамаза,  $\beta$ -глюкозидаза, нитроредуктаза и карбоксипептидаза А.

[0174] Способы конъюгирования терапевтических агентов с белками, в частности с антителами, хорошо известны (см., например, Arnon et al., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., «Antibodies For Drug Delivery», in *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», in *Monoclonal Antibodies'84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); «Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); и Thorpe et al, 1982, *Immunol. Rev.*, 62:119-58. См. также, например, РСТ публикацию WO 89/12624).

[0175] Терапевтическое средство можно конъюгировать таким образом, чтобы снизить его активность, если оно не отщепляется от антитела (например, гидролизом, деградацией антитела или расщепляющим агентом). Такое терапевтическое средство присоединено к антителу с помощью расщепляемого линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде опухолевой клетки, экспрессирующей CD228, но по существу не чувствителен к внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от антитела, когда он интернализируется опухолевыми клетками, экспрессирующими CD228 (например, в эндосомах или, например, в силу чувствительности к рН или чувствительности к протеазам, в лизосомальной среде или в кавеоларной среде).

[0176] Обычно ADC включает линкерную область между терапевтическим средством и анти-CD228 антителом. Как отмечалось выше, обычно линкер расщепляется во внутриклеточных условиях таким образом, что в результате расщепления линкера высвобождается терапевтическое средство от антитела во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, эндосоме или кавеоле). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, который расщепляется внутриклеточным ферментом пептидазой или протеазой, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Обычно пептидильный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics*, 83: 67-123). Наиболее типичными являются пептидильные линкеры, которые расщепляются ферментами, находящимися в клетках, экспрессирующих CD228. Например, можно использовать пептидильный линкер, который расщепляется тиол-зависимой протеазой катепсином-В,

которая высоко экспрессируется в опухолевой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Gly-Phe-Leu-Gly (SEQ ID NO: 30)). Другие такие линкеры описаны, например, в патенте США № 6214345. В конкретных вариантах осуществления пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, включает линкер Val-Cit или дипептид Phe-Lys (см., например, патент США 6214345, в котором описан синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического агента является то, что агент обычно ослабляется при конъюгировании, и стабильность конъюгатов в сыворотке обычно является высокой.

[0177] Расщепляемый линкер может быть pH-чувствительным, т. е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях pH. Как правило, pH-чувствительный линкер гидролизуется в кислых условиях. Например, может быть использован кислотолабильный линкер, который гидролизуется в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т.п.). (См., например, патенты США № 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83: 67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.*, 264: 14653-14661.) Такие линкеры являются относительно стабильными в условиях нейтрального pH, например, в крови, но нестабильны при pH ниже 5,5 или 5,0, приблизительно pH лизосомы. В некоторых вариантах осуществления гидролизуемый линкер представляет собой тиоэфирный линкер (такой как, например, простой тиоэфир, присоединенный к терапевтическому агенту через ацилгидразоновую связь (см., например, патент США № 5622929)).

[0178] Другие линкеры могут расщепляться в восстанавливающих условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают линкеры, которые могут быть получены с использованием SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио) бутирата) и SMPT (N-сукцинимидилоксикарбонил-альфа-метил-альфа(2-пиридилдитио)толуола), SPDB и SMPT. {См., например, Thorpe et al, 1987, *Cancer Res.*, 47: 5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. См. также патент США № 4880935).

[0179] Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.*, 15: 1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al, 1995, *Bioorg-Med-Chem.*, 3 (10): 1299-1304) или аналог 3'-N-амида (Lau et al, 1995, *Bioorg-Med-Chem.*, 3 (10): 1305-12). Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.*, 15: 1387-93), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.*, 3 (10): 1299-1304) или аналог 3'-N-амида (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.*, 3 (10): 1305-12).

[0180] Линкер также может представлять собой нерасщепляемый линкер, такой как малеимидо-алкилен- или малеимид-ариловый линкер, который непосредственно присоединен к терапевтическому агенту (например, лекарственному средству). Активное

лекарственное средство-линкер высвобождается при деградации антитела.

[0181] Как правило, линкер по существу не чувствителен к внеклеточной среде, означая, что не более чем примерно 20%, обычно не более чем примерно 15%, более типично не более чем примерно 10% и даже более типично не более примерно 5%, не более чем примерно 3% или не более чем примерно 1% линкеров в образце ADC расщепляется, когда ADC находится во внеклеточной среде (например, в плазме).

[0182] Насколько линкер является по существу чувствительным к внеклеточной среде, можно определить, например, независимой инкубацией с плазмой как (а) ADC («образца ADC»), так и (b) равного молярного количества неконъюгированного антитела или терапевтического средства («контрольный образец») в течение заданного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 ч), и затем сравнением количества неконъюгированного антитела или терапевтического средства, присутствующего в образце ADC, с количеством, присутствующим в контрольном образце, измеренных, например, с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии.

[0183] Линкер также может способствовать клеточной интернализации. Линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгировании с терапевтическим агентом (т.е. в среде линкер-терапевтическое средство ADC или производного ADC, как здесь описано). Альтернативно линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгировании как с терапевтическим агентом, так и с анти-CD228 антителом (т.е. в среде ADC, как здесь описано).

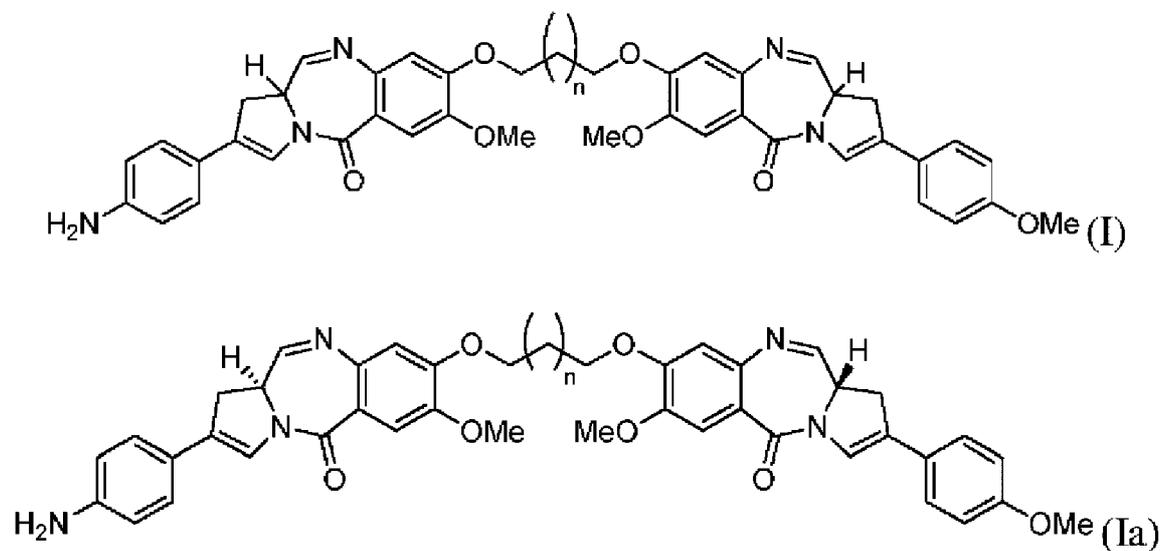
[0184] Анти-CD228 антитело может быть конъюгировано с линкером через гетероатом антитела. Эти гетероатомы могут находиться в антителе в его естественном состоянии или могут быть введены в антитело. В некоторых аспектах анти-CD228 антитело будет конъюгировано с линкером через атом азота остатка лизина. В других аспектах анти-CD228 антитело будет конъюгировано с линкером через атом серы остатка цистеина. Остаток цистеина может быть естественным или введенным в антитело. Способы конъюгирования линкеров и лекарственное средство-линкеры с антителами через остатки лизина и цистеина известны в данной области.

[0185] Иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина (т.е. лекарственный компонент представляет собой лекарственный препарат ауристин). Ауристины связываются с тубулином, и было показано, что они нарушают полимеризацию микротрубочек, ядерное и клеточное деление и обладают противораковой активностью. Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатина содержит линкер между лекарственным средством ауристином и анти-CD228 антителом. Линкер может представлять собой, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер, углеводный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый при разложении антитела). Ауристины включают ауристин Т, ММАF и ММАЕ. Синтез и структура типичных ауристатинов описаны в публикациях патентов и заявок на патент США № 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687,

которые в полном объеме и для всех целей включены здесь посредством ссылки.

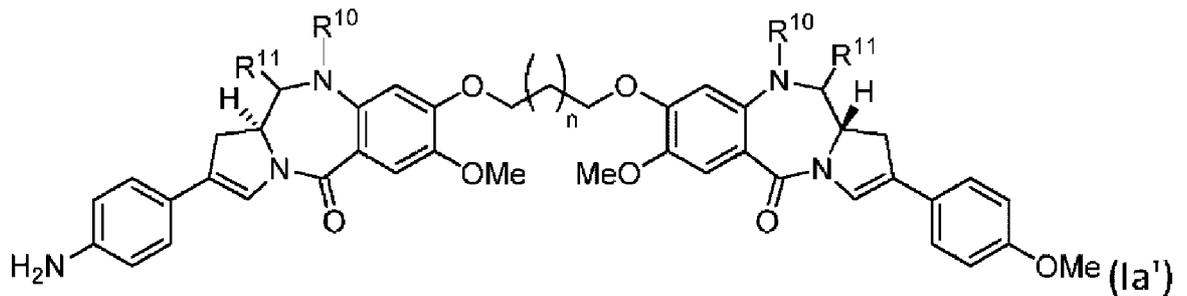
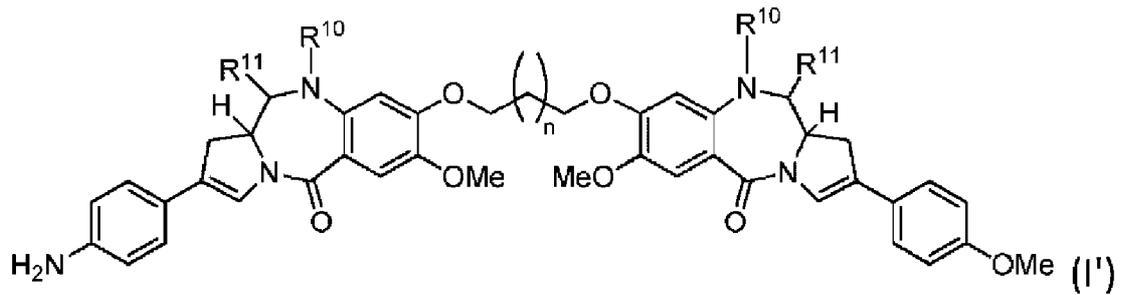
[0186] Другие иллюстративные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают майтанзиноидные конъюгаты антитело-лекарственное средство (т. е. лекарственный компонент представляет собой лекарственное средство майтанзиноид) и бензодиазепиновые конъюгаты антитело-лекарственное средство (т. е. лекарственный компонент представляет собой бензодиазепин (например, димеры пирроло[1,4]бензодиазепина (димер PBD), димеры индолинобензодиазепина и димеры оксазолидинобензодиазепина)).

[0187] В некоторых вариантах осуществления димер PBD для применения в настоящем изобретении представлен формулой I. Предпочтительная стереохимия димера PBD показана в формуле Ia:



или фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват соли; где нижний индекс  $n$  равен 1 или 3.

[0188] Сольваты формул (I) и (Ia) обычно образуются присоединением воды или спиртового растворителя через функциональную иминогруппу одного или обоих мономеров PBD с образованием карбиноламина(ов) и/или простых эфиров карбиноламина. Например, в положении N10-C11 может находиться имин ( $N=C$ ), карбиноламин ( $NH-CH(OH)$ ) или простой карбиноламиновый эфир ( $NH-CH(OMe)$ ), представленные формулами I' и Ia' ниже:



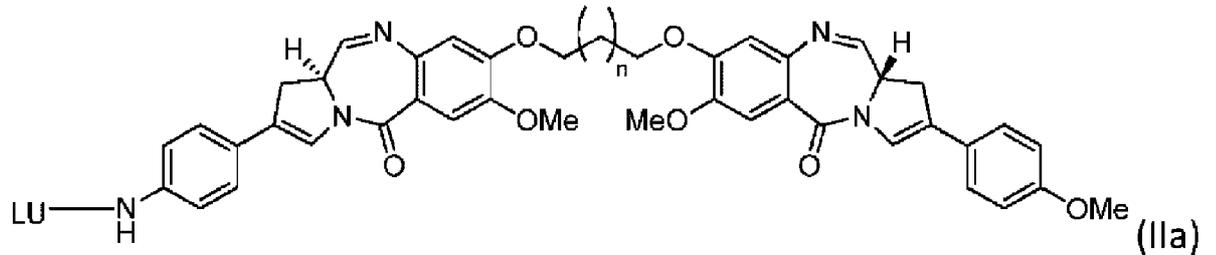
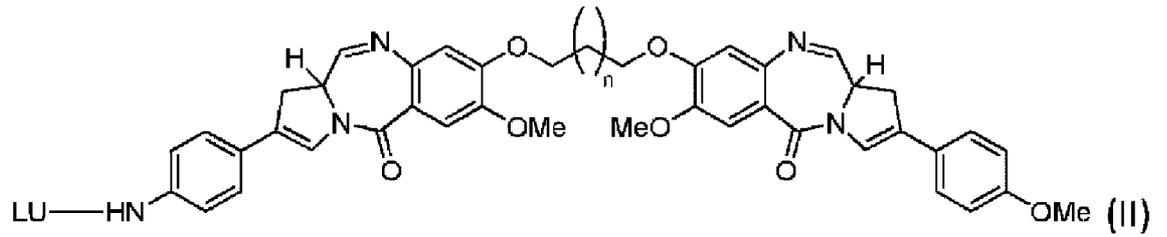
где либо:

(a)  $R^{10}$  представляет собой H, и  $R^{11}$  представляет собой OH или  $OR^A$ , где  $R^A$  представляет собой насыщенный  $C_{1-4}$  алкил (предпочтительно метил); или

(b)  $R^{10}$  и  $R^{11}$  образуют двойную азот-углеродную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны; или

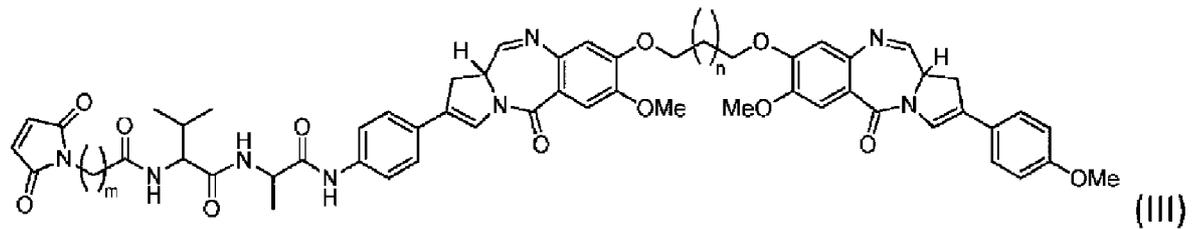
(c) один из  $R^{10}$  представляет собой H, и  $R^{11}$  представляет собой OH или  $OR^A$ , где  $R^A$  представляет собой насыщенный  $C_{1-4}$  алкил (предпочтительно метил); и другой из  $R^{10}$  и  $R^{11}$  образует двойную азот-углеродную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

[0189] Димер PBD формулы I или Ia (или его фармацевтическая соль, сольват или сольват его соли) обычно связан с антителом через линкерную единицу, LU. Линкерная единица функционирует, высвобождая димер PBD формулы I или Ia (или его фармацевтическую соль, сольват или сольват этой соли) в сайте-мишени (например, внутри опухолевой клетки). Соединение PBD лекарственное средство-линкер для применения в настоящем изобретении представлено ниже формулой II (предпочтительная стереохимия показана на Ia), где LU представляет собой линкерную единицу. Линкерная единица может представлять собой, например, расщепляемую пептидную линкерную единицу (например, линкер, содержащий пептид валин-аланин) или расщепляемую дисульфидную линкерную единицу:



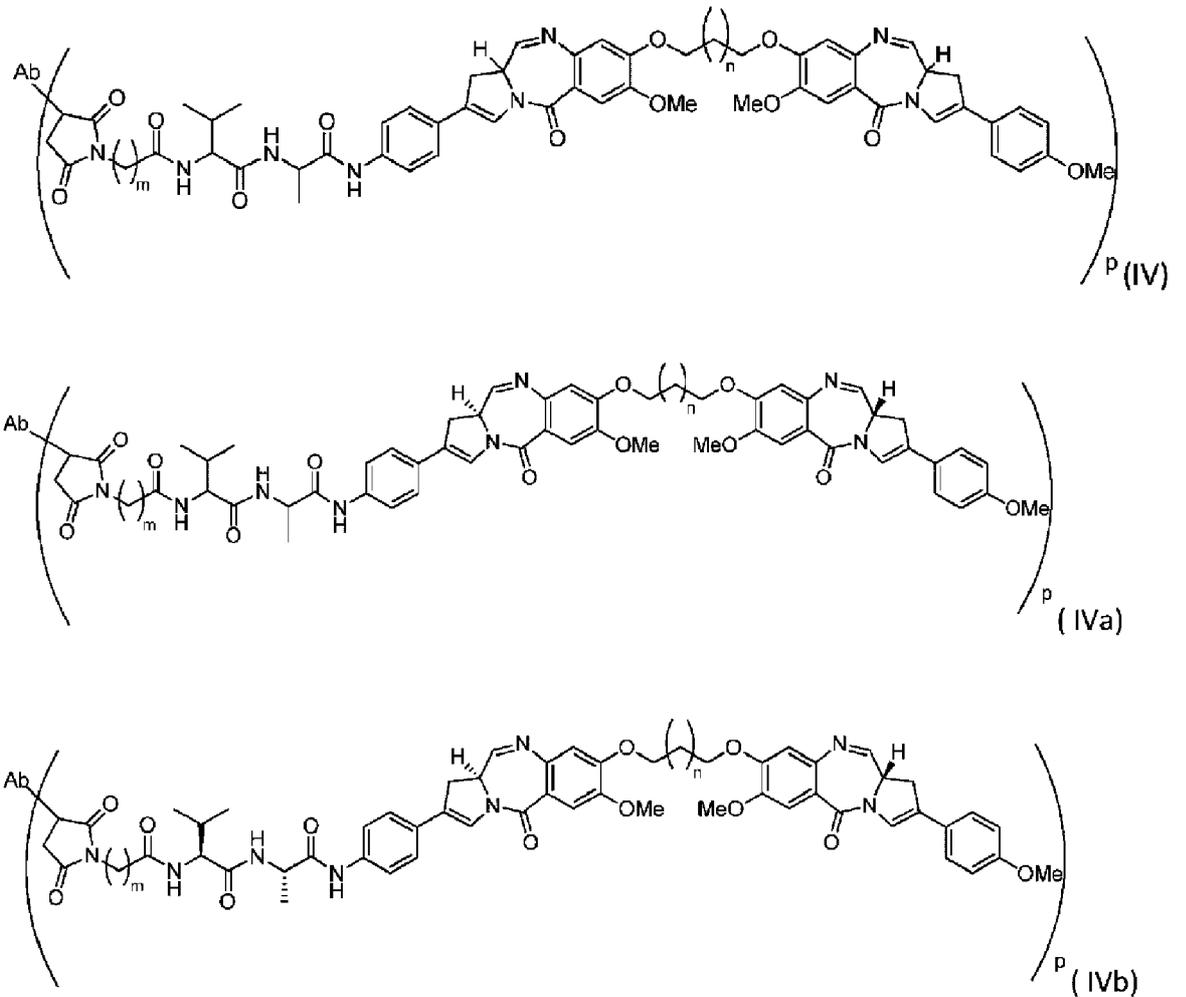
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват соли; где нижний индекс  $n$  равен 1 или 3.

[0190] Предпочтительное соединение PBD лекарственное средство-линкер для применения в настоящем изобретении представлено формулой III ниже:



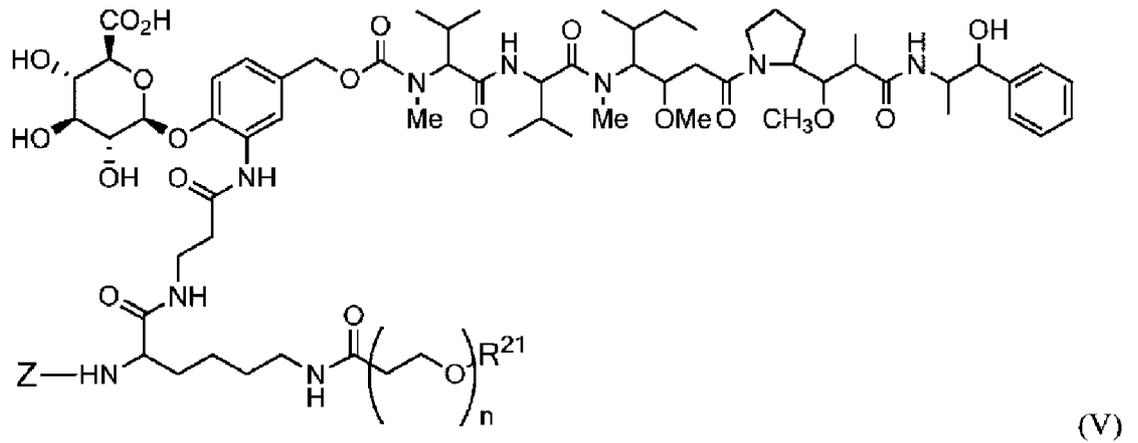
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват соли; где нижний индекс  $n$  равен 1 или 3, и нижний индекс  $m$  представляет собой целое число от 2 до 5.

[0191] PBD лекарственное средство-линкер конъюгировано с анти-CD228 антителом для получения CD228-нацеленного конъюгата антитело-лекарственное средство. Например, антитело можно конъюгировать с лекарственным средством-линкером формулы II или формулы III. Типичный CD228-нацеленный конъюгат антитело-лекарственное средство показан ниже в формулах IV, IVa и IVb:



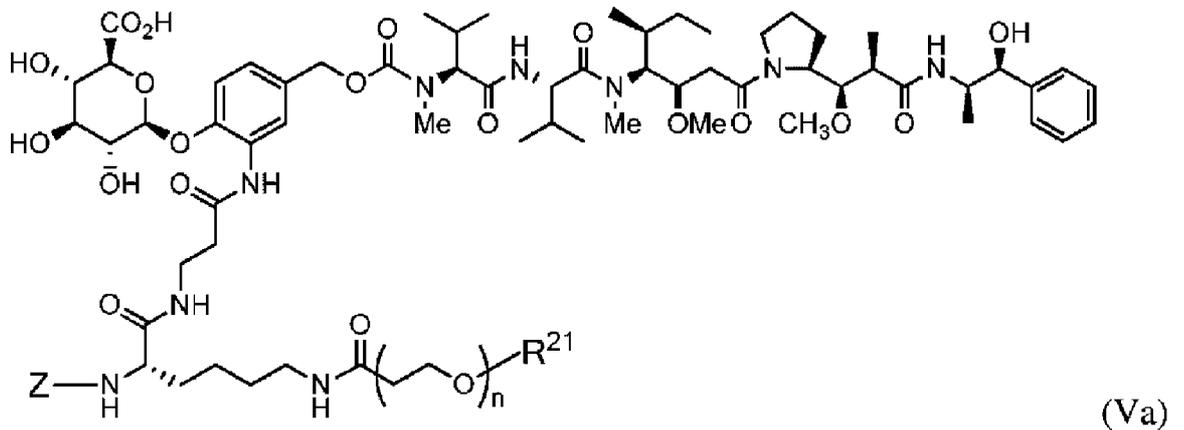
или фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват соли; где нижний индекс  $n$  равен 1 или 3; нижний индекс  $m$  представляет собой целое число от 2 до 5; и нижний индекс  $p$  равен 1-4.

[0192] Примерные лекарственные средства-линкеры включают лекарственные средства-линкеры на основе MMAE. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что включение полиэтиленгликолевого полимера в виде боковой цепи в расщепляемый  $\beta$ -глюкуронид- лекарственное средство MMAE-линкер обеспечивает конъюгаты антитела и лекарственного средства со сниженным клиренсом из плазмы и повышенной противоопухолевой активностью на моделях ксенотрансплантатов по сравнению с не-ПЭГилированным контролем. Следовательно, особенно пригодные лекарственные средства-линкеры для связывания с антителами по настоящему изобретению имеют следующую формулу V:



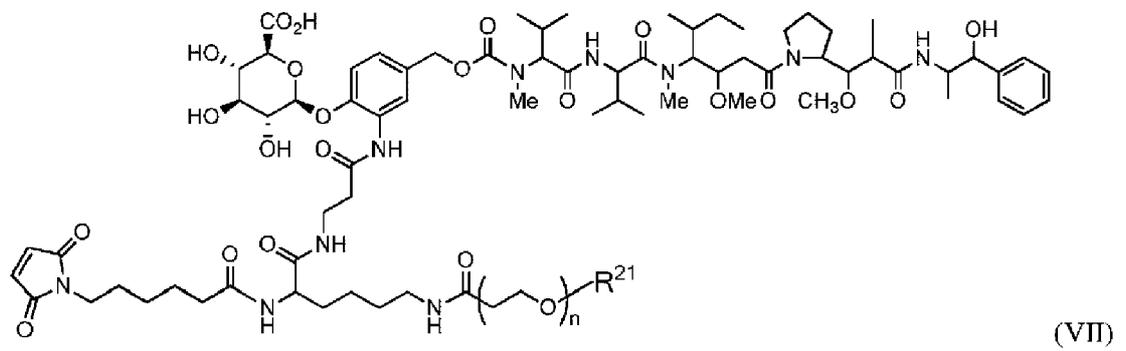
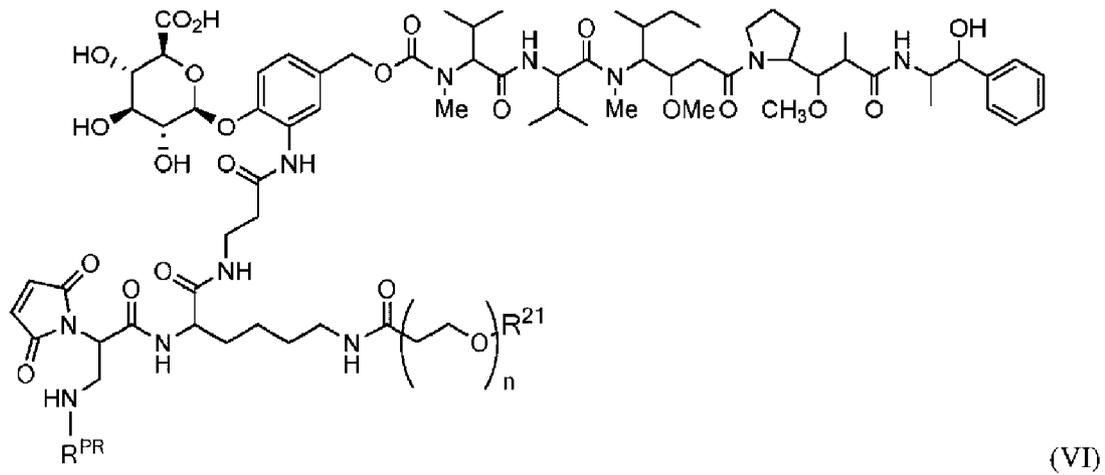
или его фармацевтически приемлемая соль.

[0193] Предпочтительная стереохимия такого лекарственного средства-линкера показана ниже в формуле Va:



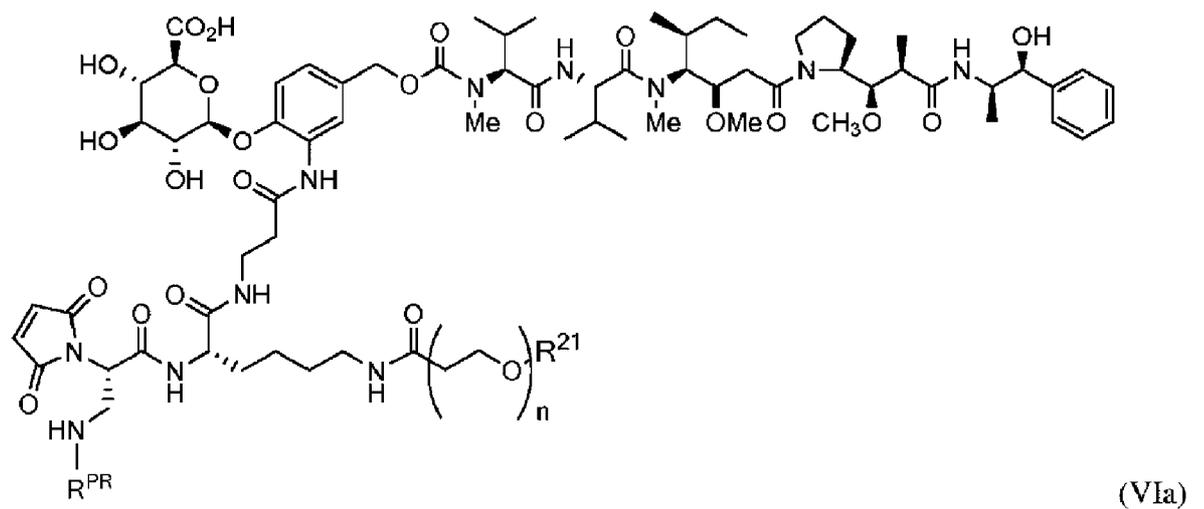
или его фармацевтически приемлемая соль, где для формул V и Va Z представляет собой органический фрагмент, имеющий реакционноспособный сайт, способный взаимодействовать с функциональной группой на антителе с образованием ковалентного присоединения к нему, n находится в диапазоне от 8 до 36 и наиболее предпочтительно в диапазоне от 8-14 (наиболее предпочтительно равен 12), R<sup>21</sup> представляет собой кэпирующую единицу для полиэтиленгликолевой группы, предпочтительно -CH<sub>3</sub> или -CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>CO<sub>2</sub>H.

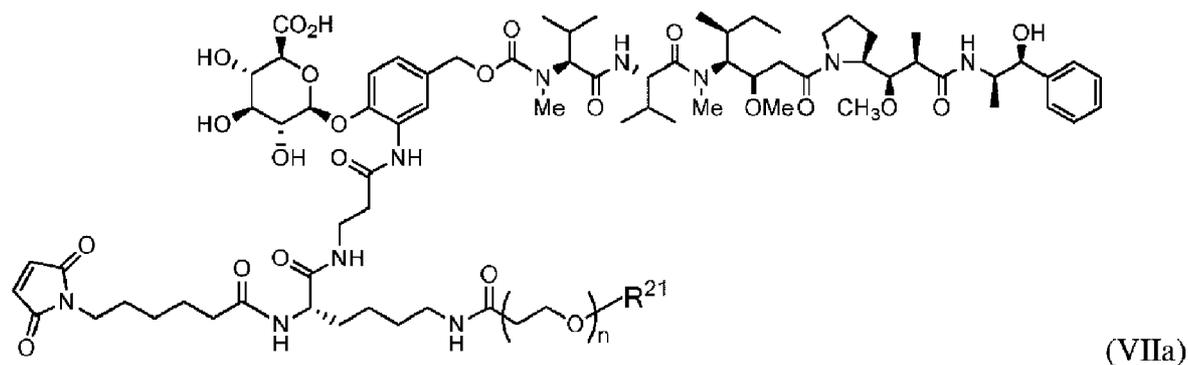
[194] Предпочтительная Z-группа представляет собой малеимидосодержащую группу. Особенно предпочтительные Z-группы показаны в лекарственных средствах-линкерах ниже:



или его фармацевтически приемлемая приемлемая соль.

[0195] Предпочтительная стереохимия таких лекарственных средств-линкеров показана ниже:





(VIIa)

или его фармацевтически приемлемая соль, где для формул VI, VIa, VII и VIIa  $n$  находится в диапазоне от 8 до 36 и наиболее предпочтительно в диапазоне от 8 до 14 (наиболее предпочтительно равен 12),  $R^{PR}$  представляет собой атом водорода или защитную группу, например, кислотолабильную защитную группу, например BOC,  $R^{21}$  представляет собой кэпирующую единицу для полиэтиленгликолевой группы, предпочтительно  $-CH_3$  или  $-CH_2CH_2CO_2H$ .

[0196] Как отмечалось выше,  $R^{PR}$  может представлять собой атом водорода или защитную группу. В рамках настоящего изобретения, защитные группы относятся к группам, которые селективно блокируют, временно или постоянно, реакционноспособный сайт в многофункциональном соединении. Защитная группа представляет собой подходящую защитную группу, когда она способна предотвратить или избежать нежелательных побочных реакций или преждевременной потери защитной группы в реакционных условиях, необходимых для осуществления желаемого химического превращения в другом месте молекулы, и во время очистки вновь образованной молекулы, когда это необходимо, и которую можно удалить в условиях, которые не оказывают отрицательного влияния на структуру или стереохимическую целостность данной вновь образованной молекулы. Подходящие аминозащитные группы включают кислотолабильные азотзащитные группы, включая группы, описанные Isidro-Llobel et al. «Amino acid-protecting groups» Chem. Rev. (2009) 109: 2455-2504. Обычно кислотолабильная азотзащитная группа превращает первичную или вторичную аминогруппу в ее соответствующий карбамат, и включает трет-бутил, аллил и бензилкарбаматы.

[0197] Как отмечалось выше,  $R^{21}$  представляет собой кэпирующую единицу для полиэтиленгликолевой группы. Специалистам в данной области будет понятно, что полиэтиленгликолевые единицы могут быть на концах кэпированы широким разнообразием органических групп, обычно относительно инертных. Алкильные и замещенные алкильные группы являются предпочтительными.

[0198] Обычно к каждому антителу прикрепляется от 1 до 16 соединений лекарственного средство-линкер.

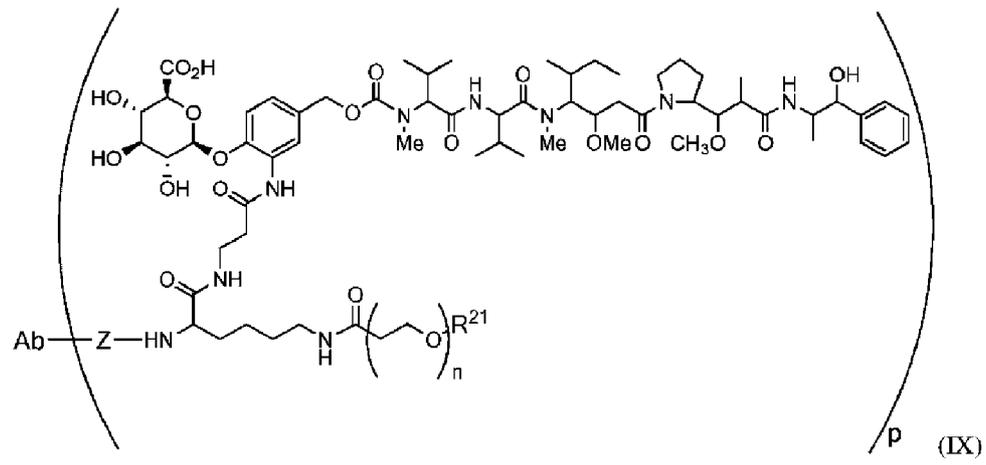
[0199] В отношении CD228-нацеленных конъюгатов антитело-лекарственное средство нижний индекс  $p$  представляет собой лекарственную нагрузку и, в зависимости от

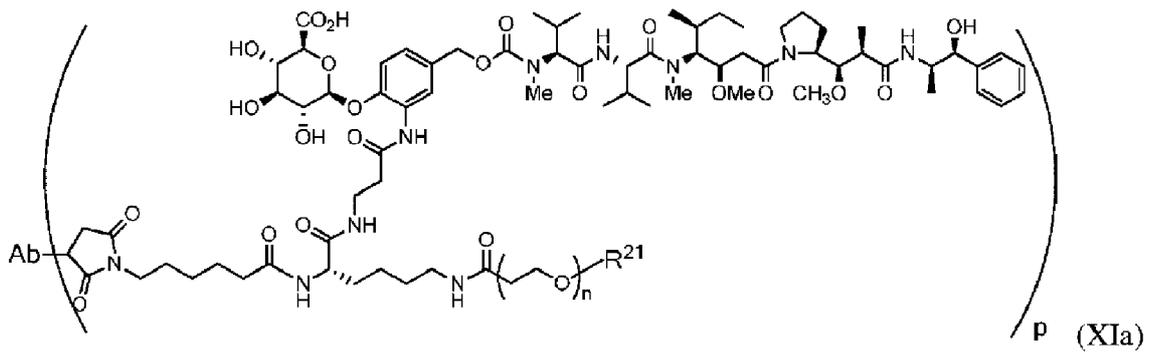
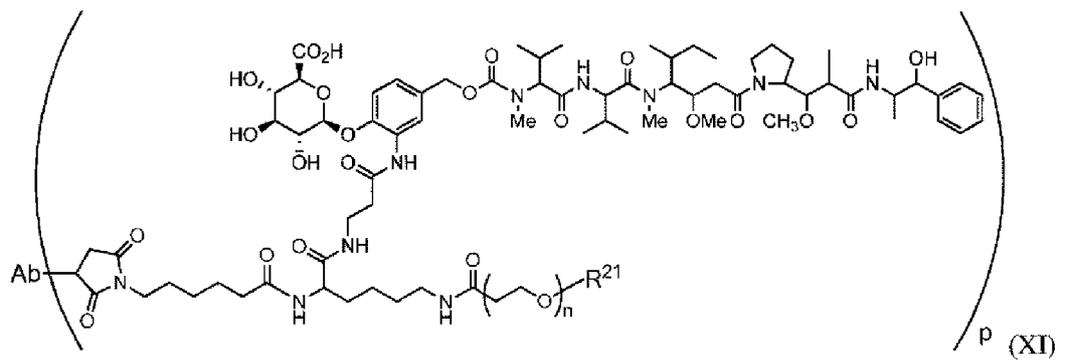
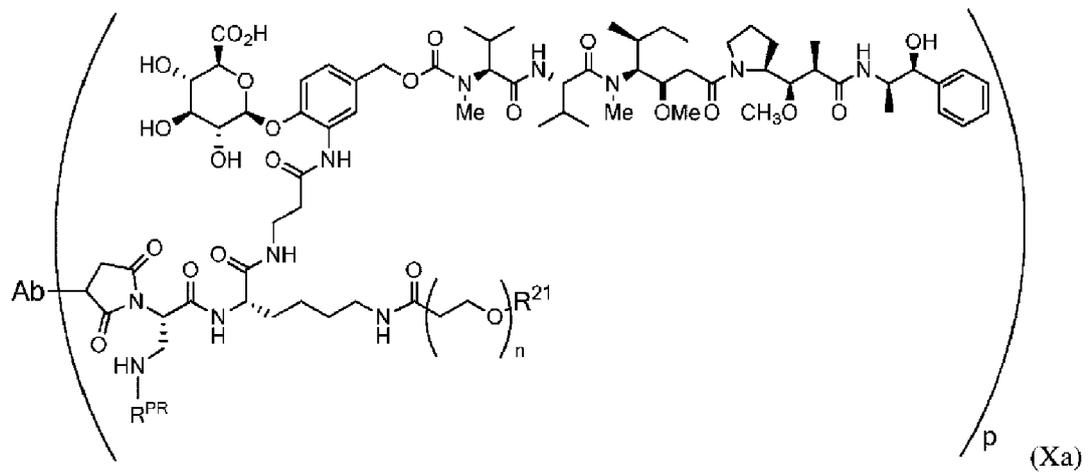
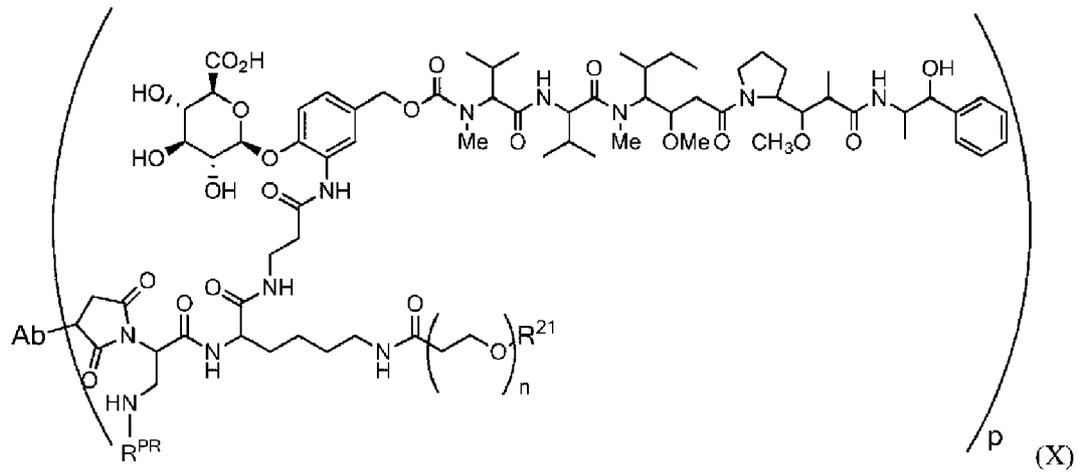
контекста, может обозначать количество молекул лекарственное средство-линкер, присоединенных к отдельной молекуле антитела, и как таковое является целым числом или может представлять среднюю нагрузку лекарственным средством и, как таковое, может быть целым или нецелым числом, но обычно является нецелым числом. Средняя лекарственная нагрузка представляет собой среднее количество молекул лекарственного средства-линкера на одно антитело в популяции антител. Часто, но не всегда, когда подразумевается антитело, например, моноклональном антителе, то имеется в виду популяция молекул антитела. В композиции, содержащей популяцию молекул конъюгата антитело-лекарственное средство, средняя лекарственная нагрузка является важным показателем качества, поскольку она определяет количество лекарственного средства, которое может быть доставлено в клетку-мишень. Процент неконъюгированных молекул антител в композиции включается в среднее значение лекарственной нагрузки.

[0200] В предпочтительных аспектах настоящего изобретения средняя лекарственная нагрузка в композиции, содержащей популяцию соединений конъюгат антитело-лекарственное средство, составляет от 1 до примерно 16, предпочтительно примерно от 2 до примерно 14, более предпочтительно примерно от 2 до примерно 10. Для РВД конъюгатов антитело-лекарственное средство, таких как приведены здесь в качестве примеров, особенно предпочтительная средняя лекарственная нагрузка составляет примерно 2. В некоторых аспектах фактическая лекарственная нагрузка для отдельных молекул антитела в популяции соединений конъюгат антитело-лекарственное средство составляет от 1 до 4, от 1 до 3 или от 1 до 2, с преобладающей лекарственной нагрузкой, равной 2. В предпочтительных аспектах средняя лекарственная нагрузка, равная 2, достигается с использованием методов сайт-специфической конъюгации (например, сконструированные цистеины, введенные в антитело, в том числе в положении 239, согласно системе нумерации по индексу ЕС).

[0201] Для ADC с ПЭГилированными MMAE, таких как приведены здесь в качестве примеров, особенно предпочтительная средняя лекарственная нагрузка составляет примерно 8. В иллюстративных вариантах осуществления лекарственные средства-линкеры конъюгированы с остатками цистеина восстановленных межцепочечных дисульфидов. В некоторых аспектах фактическая лекарственная нагрузка для отдельных молекул антител в популяции соединений конъюгат антитело-лекарственное средство составляет от 1 до 10 (или от 6 до 10, или от 6 до 8) с преобладающей лекарственной нагрузкой, равной 8. Более высокая лекарственная нагрузка может быть достигнута, например, если, в дополнение к межцепочечным дисульфидам, лекарственное средство-линкер конъюгировано с введенными остатками цистеина (такими как остаток цистеина, введенный в положение 239 согласно нумерации по индексу ЕС).

[0202] Примеры ADC включают следующее:





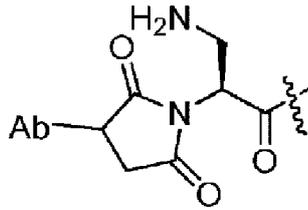
или его фармацевтически приемлемая соль, где  $n$  находится в диапазоне от 8 до 36 и наиболее предпочтительно в диапазоне от 8 до 14 (наиболее предпочтительно равен 12),  $R^{PR}$  представляет собой атом водорода или защитную группу, например кислотолабильную защитную группу, например  $BOC$ ,  $R^{21}$  представляет собой кэпирующую единицу для полиэтиленгликолевой группы, предпочтительно  $-CH_3$  или  $-CH_2CH_2CO_2H$ ,  $Ab$  представляет собой анти-CD228 антитело, и  $p$  представляет собой целое число от 1 до 16, предпочтительно от 1 до 14, от 6 до 12, от 6 до 10 или от 8 до 10, когда относится к отдельным молекулам антител или к средней лекарственной нагрузке примерно от 4 или примерно от 6 до примерно 14, предпочтительно примерно 8, когда подразумевается популяция молекул антител.

[0203] Как отмечалось выше, группа ПЭГ (полиэтиленгликоля) в соединении лекарственное средство-линкер может составлять от 8 до 36, однако было установлено, что особенно предпочтительным является ПЭГ, состоящий из 12 единиц этиленоксида. Было обнаружено, что более длинные цепи ПЭГ могут приводить к более медленному клиренсу, тогда как более короткие цепи ПЭГ могут приводить к снижению активности. Следовательно, нижний индекс  $n$  во всех вышеприведенных вариантах осуществления предпочтительно составляет от 8 до 14, от 8 до 12, от 10 до 12 или от 10 до 14, и наиболее предпочтительно составляет 12.

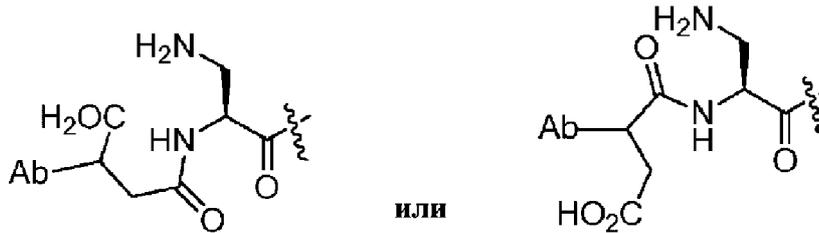
[0204] Полидисперсные ПЭГи, монодисперсные ПЭГи и дискретные ПЭГи можно использовать для получения ПЭГилированных конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Полидисперсные ПЭГи представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные ПЭГи обычно очищены от гетерогенных смесей и, следовательно, имеют одну длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные единицы ПЭГ представляют собой дискретные ПЭГи, соединения, которые синтезируются постадийно, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные ПЭГи представляют собой одну молекулу с определенной длиной цепи. Как и в случае с индексом « $r$ », когда подразумеваются популяции конъюгатов антитело-лекарственное средство, значение нижнего индекса « $n$ » может представлять собой среднее число и может быть целым или нецелым числом.

[0205] В предпочтительных вариантах осуществления ковалентное присоединение антитела к соединению лекарственное средство-линкер осуществляется через сульфгидрильную функциональную группу антитела, взаимодействующую с малеимидной функциональной группой линкера лекарственного средства с образованием тиозамещенного сукцинимиды. Сульфгидрильная функциональная группа может присутствовать в единице лиганда в естественном состоянии лиганда, например, в остатке природного происхождения (межпочечные дисульфидные остатки), или может быть введена в лиганд посредством химической модификации или биологической инженерии, или их комбинацией. Следует понимать, что антитело с замещенным сукцинимидом может находиться в гидролизованной форме(ах). Например, в предпочтительных вариантах осуществления ADC состоит из сукцинимидной группы, которая при связывании с

антителом представлена формулой:



или состоит из соответствующей кислотно-амидной группы, которая при связывании с антителом представлена формулой:



Волнистая линия указывает на связь с остальной частью лекарственного средства-линкера.

[0206] Пригодные классы цитотоксических агентов для конъюгирования с анти-CD228 антителами включают, например, антитубулиновые агенты, агенты, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, сенсibilизаторы химиотерапии и т.п. Другие иллюстративные классы цитотоксических агентов включают антрациклины, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды и алкалоиды барвинка. Некоторые иллюстративные цитотоксические агенты включают ауристатины (например, ауристатин Т, ауристатин Е, АРР, монометилауристатин F (ММАF), липофильный монометилаурстатин F, монометилауристатин Е (ММАЕ)), связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, энедиины и лекситокарпсмины), таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), алкалоиды барвинка, ингибитор никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPTi), тубулизин М, доксорубицин, морфолинодоксорубицин и цианоморфолинодоксорубицин.

[0207] Цитотоксический агент может представлять собой химиотерапевтический препарат, например, такой как доксорубицин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митомицин С или этопозид. Агент также может быть аналогом СС-1065, калихеамицином, майтанзином, аналогом доластатина 10, ризоксином или палитоксином.

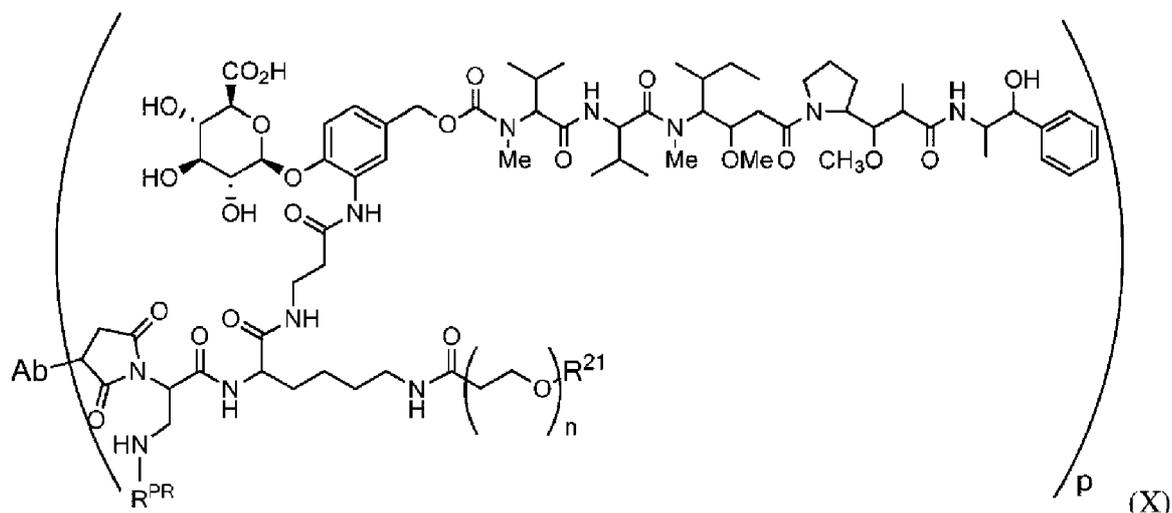
[0208] Цитотоксический агент также может представлять собой ауристатин. Ауристатин может быть производным ауристатина Е, например сложным эфиром, образованным между ауристатином Е и кетокислотой. Например, ауристатин Е может взаимодействовать с парацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой с образованием АЕВ и АЕVB соответственно. Другие типичные ауристатины включают ауристатин Т, АРР, ММАF и ММАЕ. Синтез и структура различных ауристатинов описаны, например, в US 2005-0238649 и US2006-0074008.

[0209] Цитотоксический агент может представлять собой агент, связывающийся с малой бороздкой ДНК (см., например, патент США № 6130237). Например, связывающийся с малой бороздкой агент может быть производным или ендином СВІ (например, калихеамицином).

[0210] Цитотоксический или цитостатический агент может представлять собой анти tubулиновый агент. Примеры анти tubулиновых средств включают таксаны (например, Taxol® (паклитаксел), Taxotere® (доцетаксел)), Т67 (Tularik), алкилоиды барвинка (например, винкристин, винбластин, виндезин и винорелбин) и ауристатины (например, ауристин Е, АFР, ММАF, ММАЕ, АЕВ, АЕVВ). Примеры ауристатинов показаны ниже в формулах III-XIII. Другие подходящие анти tubулиновые агенты включают, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колцимид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастатины, дискодермоид и элеутробин.

[0211] Цитотоксический агент может представлять собой майтанзиноид, другая группа анти tubулиновых агентов (например, DM1, DM2, DM3, DM4). Например, майтанзиноид может представлять собой майтанзин или майтанзин, содержащий линкер лекарственного средства, такой как DM-1 или DM-4 (ImmunoGen, Inc.; см. также Chari et al., 1992, Cancer Res.)

[0212] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело по изобретению конъюгировано с монометилауристатином Е через линкер MDpg-PEG (12)-gluc, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



или его фармацевтически приемлемая соль, где  $n$  находится в диапазоне от 8 до 36 и наиболее предпочтительно в диапазоне от 8 до 14 (наиболее предпочтительно равен 12),  $R^{PR}$  представляет собой атом водорода или защитную группу, например, кислотолабильную защитную группу, например BOC,  $R^{21}$  представляет собой кэпирующую единицу для полиэтиленгликолевой группы, предпочтительно  $-CH_3$  или  $-CH_2CH_2CO_2H$ , Ab представляет собой анти-CD228 антитело, и  $p$  представляет собой целое число от 1 до 16, предпочтительно от 1 до 14, от 6 до 12, от 6 до 10 или от 8 до 10, когда относится к

отдельным молекулам антител или к средней лекарственной нагрузке примерно от 4 или примерно 6 до примерно 14, предпочтительно примерно 8, когда подразумевается популяция молекул антител. В некоторых вариантах осуществления анти-CD228 антитело представляет собой hL49, и полученный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой hL49-Mdpr-PEG(12)-gluc-MMAE. hL49-Mdpr-PEG(12)-gluc-MMAE также обозначается как hL49-5088. Термин hL49-5088 (8) относится к hL49-5088 со средней лекарственной нагрузкой примерно 8 лекарственных средств-линкеров на антитело.

### **VIII. Терапевтическое применение**

[0213] Антитела по изобретению, одни или в виде их конъюгатов анти-CD228 антитело-лекарственное средство, можно применять для лечения рака у субъекта. Некоторые такие типы злокачественных опухолей показывают детектируемые уровни CD228, измеренные либо на уровне белка (например, с помощью иммуноанализа с использованием одного из приведенных в качестве примеров антител), либо на уровне мРНК. Некоторые такие типы злокачественных опухолей показывают повышенные уровни CD228 по сравнению с доброкачественной тканью того же типа, предпочтительно у одного и того же пациента. Примерный уровень CD228 на опухолевых клетках, поддающихся лечению, составляет 5000-500000 молекул CD228 на клетку, хотя можно лечить клетки с более высокими или более низкими уровнями. Необязательно, уровень CD228 в злокачественной опухоли измеряют до проведения лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и не отвечал на лечение, где один или более терапевтических агентов не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и у него имел место рецидив после лечения, где один или более терапевтических агентов не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и во время лечения у него наблюдали прогрессирование заболевания, где один или более терапевтических агентов не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак на поздней стадии. В некоторых вариантах осуществления рак на поздней стадии представляет собой рак 3 или 4 стадии. В некоторых вариантах осуществления рак на поздней стадии представляет собой метастатический рак. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рецидивирующий рак. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал стандартную терапию для лечения рака, и предшествующее лечение было неэффективным. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[0214] Примеры рака, ассоциированного с экспрессией CD228 и поддающегося лечению, включают меланому и другие карциномы, в том числе рак поджелудочной железы, рак легкого, такой как немелкоклеточный рак легкого, рак щитовидной железы, рак

пищевода, рак головы и шеи, рак молочной железы, такой как тройной негативный рак молочной железы, колоректальный рак, мезотелиома и холиангиокарцинома. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения меланомы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления меланома представляет собой кожную меланому. В некоторых вариантах осуществления кожная меланома выбрана из группы, состоящей из поверхностно-распространяющейся меланомы, узловой меланомы, акральной лентигозной меланомы, злокачественной лентиго-меланомы и десмопластической меланомы. В некоторых вариантах осуществления кожная меланома представляет собой поверхностно-распространяющуюся меланому. В некоторых вариантах осуществления кожная меланома представляет собой узловую меланому. В некоторых вариантах осуществления кожная меланома представляет собой акральную лентигозную меланому. В некоторых вариантах осуществления акральная лентигозная меланома представляет собой подногтевую меланому. В некоторых вариантах осуществления кожная меланома представляет собой злокачественную лентиго-меланому. В некоторых вариантах осуществления кожная меланома представляет собой десмопластическую меланому. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию кожной меланомы ингибитором PD-1 или PD-L1. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 выбран из группы, состоящей из ниволумаба (OPDIVO®, BMS-936558 или MDX-1106), пембролизумаба (KEYTRUDA®, MK-3475), пидилизумаба (CT-011) и цемиплимаба (REGN2810). В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию ингибитором PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 выбран из группы, состоящей из атезолизумаба (TECENTRIQ®, MPDL3280A), авелумаба (BAVENCIO®), дурвалумаба и BMS-936559. В некоторых вариантах осуществления меланома представляет собой подкожную меланому. В некоторых вариантах осуществления изобретения подкожная меланома представляет собой меланому глаза или меланому слизистой оболочки. В некоторых вариантах осуществления изобретения меланома представляет собой некожную меланому. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения рака поджелудочной железы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой экзокринный рак или нейроэндокринный рак. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой экзокринный рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения экзокринный рак поджелудочной железы выбран из группы, состоящей из аденокарциномы поджелудочной железы, ацинарно-клеточной карциномы, цистаденокарциномы, панкреатобластомы, аденосквамозной карциномы, карциномы из перстневидных клеток, гепатоидной карциномы, коллоидной карциномы, недифференцированной карциномы и муцинозно-кистозного новообразования поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект получал одну или

более предшествующих линий терапии экзокринного рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал одну линию терапии экзокринного рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал более одной линии терапии экзокринного рака поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой аденокарциному поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления аденокарцинома поджелудочной железы представляет собой протоковую аденокарциному поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой ацинарно-клеточную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой цистаденокарциному. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой панкреатобластому. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой аденосквамозную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой карциному из перстневидных клеток. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой гепатоидную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой коллоидную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой недифференцированную карциному. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой муцинозно-кистозное новообразование поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак поджелудочной железы представляет собой нейроэндокринный рак. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения рака легкого у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения немелкоклеточного рака легкого у субъекта. В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого имеет мутантную форму рецептора эпидермального фактора роста (EGFR). В некоторых вариантах осуществления немелкоклеточный рак легкого имеет EGFR дикого типа. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию на основе препарата платины для лечения немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия на основе препарата платины выбрана из группы, состоящей из карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, недаплатина, тетранитрата триплатина, фенантриплатина, пикоплатина и сатраплатина. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой карбоплатин. В некоторых вариантах осуществления препаратом на основе платины является цисплатин. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой оксалиплатин. В некоторых вариантах осуществления препаратом на основе платины является недаплатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия на основе препарата платины представляет собой тетранитрат триплатина. В некоторых вариантах осуществления

терапия на основе препарата платины представляет собой фенантриплатин. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой пикоплатин. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой сатраплатин. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-L1 немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-1 выбран из группы, состоящей из ниволумаба (OPDIVO®, BMS-936558 или MDX-1106), пембролизумаба (KEYTRUDA®, MK-3475), пидилизумаба (CT-011) и цемиплимаба (REGN2810). В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию ингибитором PD-L1. В некоторых вариантах осуществления ингибитор PD-L1 выбран из группы, состоящей из атезолизумаба (TECENTRIQ®, MPDL3280A), авелумаба (BAVENCIO®), дурвалумаба и BMS-936559. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию на основе препарата платины и ингибитора PD-1 или PD-L1 для лечения немелкоклеточного рака легкого. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения рака щитовидной железы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения рака пищевода у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения рака головы и шеи у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения рака молочной железы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы выбран из группы, состоящей из HER2-положительного, HER2-негативного, эстрогеновый рецептор-положительного (ER), ER-негативного, прогестероновый рецептор-положительного (PR), PR-отрицательного и тройного негативного рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой HER2-положительный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой HER2-негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал одну или более линий терапии HER2-негативного рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления одна или более предшествующих линий терапии включали лечение таксаном. В некоторых вариантах осуществления таксан выбран из группы, состоящей из паклитаксела, доцетаксела и кабазитаксела. В некоторых вариантах осуществления таксан представляет собой паклитаксел. В некоторых вариантах осуществления таксан представляет собой доцетаксел. В некоторых вариантах осуществления таксан представляет собой кабазитаксел. В некоторых вариантах осуществления субъект с HER2-негативным раком молочной железы является положительным по гормональному рецептору. В некоторых вариантах осуществления субъект с HER2-негативным, гормональный рецептор-положительным

раком молочной железы ранее получал терапию ингибитором CDK4/6. В некоторых вариантах осуществления субъект с HER2-негативным, гормональный рецептор-положительным раком молочной железы ранее получал лечение гормонально-направленной терапией. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой ER-положительный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой ER-негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой PR-положительный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак молочной железы представляет собой PR-негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения тройного негативного рака молочной железы у субъекта. Тройной негативный рак молочной железы представляет собой термин, используемый в данной области, для рака без детектируемых эстрогеновых и прогестероновых рецепторов и без избыточной экспрессии HER2/neu. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения колоректального рака у субъекта. В некоторых вариантах осуществления изобретения колоректальный рак выбран из группы, состоящей из колоректальной аденокарциномы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, первичной колоректальной лимфомы, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта и лейомиосаркомы. В некоторых вариантах осуществления изобретения колоректальный рак представляет собой колоректальную аденокарциному. В некоторых вариантах осуществления изобретения колоректальный рак представляет собой стромальную опухоль желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления колоректальный рак представляет собой первичную колоректальную лимфому. В некоторых вариантах осуществления изобретения колоректальный рак представляет собой карциноидную опухоль желудочно-кишечного тракта. В некоторых вариантах осуществления колоректальный рак представляет собой лейомиосаркому. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал два или более курса терапии колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал две линии терапии колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал более двух линий терапии колоректального рака. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения мезотелиомы у субъекта. В некоторых вариантах осуществления мезотелиома выбрана из группы, состоящей из мезотелиомы плевры, мезотелиомы брюшины, мезотелиомы перикарда и мезотелиомы яичка. В некоторых вариантах осуществления мезотелиома представляет собой мезотелиому плевры. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию на основе препарата платины для лечения мезотелиомы плевры. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия на основе препарата платины выбрана из группы, состоящей из карбоплатина, цисплатина, оксалиплатина, недаплатина,

тетранитрата триплатина, фенантриплатина, пикоплатина и сатраплатина. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой карбоплатин. В некоторых вариантах осуществления препаратом на основе платины является цисплатин. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой оксалиплатин. В некоторых вариантах осуществления препаратом на основе платины является надаплатин. В некоторых вариантах осуществления изобретения терапия на основе препарата платины представляет собой тетранитрат триплатина. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой фенантриплатин. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой пикоплатин. В некоторых вариантах осуществления терапия на основе препарата платины представляет собой сатраплатин. В некоторых вариантах осуществления субъект ранее получал терапию пеметрекседом по поводу мезотелиомы плевры. В некоторых вариантах осуществления мезотелиома представляет собой мезотелиому брюшины. В некоторых вариантах осуществления мезотелиома представляет собой мезотелиому перикарда. В некоторых вариантах осуществления мезотелиома представляет собой мезотелиому яичка. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используются в способах лечения холангиокарциномы. Лечение может быть применимым для пациентов с такими первичными или метастатическими опухолями. Лечение также может применяться для пациентов, которые невосприимчивы к обычным методам лечения, или у которых возник рецидив после ответа на такое лечение. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[0215] Антитела по настоящему изобретению, такие как гуманизированные антитела, одни или в виде их конъюгатов, вводят в эффективном режиме, означающем дозировку, способ введения и частоту введения, который замедляет начало, снижает тяжесть, подавляет дальнейшее утяжеление, и/или ослабляет по меньшей мере один признак или симптом рака. Если пациент уже страдает раком, то режим можно назвать терапевтически эффективным режимом. Если пациент подвержен повышенному риску развития рака по сравнению с популяцией в целом, но у него еще не проявляются симптомы заболевания, то режим можно назвать профилактически эффективным. В некоторых случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может наблюдаться у отдельного пациента относительно исторического контроля или прошлого опыта у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклинических или клинических испытаниях на популяции пациентов, подвергшихся лечению, по сравнению с контрольной популяцией пациентов без лечения.

[0216] Примерные дозы моноклонального антитела составляют от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента, обычно от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг или от 1 мг/кг до 10 мг/кг 1, или от 2 мг/кг до 30 мг/кг, от 2

мг/кг до 20 мг/кг, от 2 мг/кг до 15 мг/кг, от 2 мг/кг до 12 мг/кг, или от 2 мг/кг до 10 мг/кг, или от 3 мг/кг до 30 мг/кг, от 3 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 до 15 мг/кг, от 3 до 12 мг/кг или от 3 до 10 мг/кг. Примерные дозы моноклональных антител или их конъюгатов антитела-лекарственное средство составляют от 1 мг/кг до 7,5 мг/кг, или от 2 мг/кг до 7,5 мг/кг, или от 3 мг/кг до 7,5 мг/кг веса тела субъекта, или 0,1 -20 или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) или 10-1500 или 200-1500 мг в виде фиксированной дозы. В некоторых способах пациенту вводят дозу по меньшей мере 1,5 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг или по меньшей мере 3 мг/кг, которую вводят один раз в три недели или чаще. Дозировка зависит от частоты введения, состояния пациента и ответа на предшествующее лечение, если таковое имело место, от того, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, и также от того, является ли заболевание острым или хроническим, среди других факторов.

[00217] Введение может быть парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, внутриартериальным, интракраниальным, интратекальным, внутрибрюшинным, местным, интраназальным или внутримышечным. Введение также может быть локализованным непосредственно в опухоль. Введение в системный кровоток посредством внутривенного или подкожного введения является предпочтительным. Внутривенное введение может осуществляться, например, инфузией в течение периода, такого как 30-90 мин, или однократной болюсной инъекцией.

[0218] Частота введения зависит от периода полураспада антитела или конъюгата в кровотоке, состояния пациента и пути введения, среди других факторов. Частота может представлять собой раз в день, раз в неделю, раз в месяц, раз в три месяца, или с нерегулярными интервалами в зависимости от изменений в состоянии пациента или прогрессирования рака, подлежащего лечению. Примерная частота внутривенного введения находится в диапазоне от двух раз в неделю до одного раза в три месяца, в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое дозирование. Другие примерные частоты для внутривенного введения находятся в диапазоне от одного раза в неделю до трех раз в месяц, в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. Для подкожного введения примерная частота введения составляет от один раз в день или месяц, хотя также возможно более или менее частое дозирование.

[0219] Количество вводимых доз зависит от природы рака (например, проявляется ли он острыми или хроническими симптомами) и ответа на лечение заболевания. При острых расстройствах или обострениях хронического заболевания часто бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда однократной болюсной дозы, необязательно в разделенной форме, достаточно для лечения острого заболевания или обострения хронического заболевания. Лечение можно повторять при рецидиве острого заболевания или обострения. При хронических заболеваниях антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в три месяца, раз в шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или в течение всей жизни пациента.

[0220] Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и по существу изотоничными и производятся в условиях GMP. Фармацевтические композиции могут быть предоставлены в виде разовой лекарственной формы (т.е. дозировки для однократного введения). Фармацевтические композиции можно формулировать с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, эксципиентов или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекции антитела можно формулировать в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (для уменьшения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать формообразующие агенты, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие агенты. Альтернативно антитела могут находиться в лиофилизированной форме для смешивания с подходящим носителем, например стерильной апиrogenной водой, перед использованием. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 1-100 мг/мл, например 10 мг/мл.

[0221] Лечение антителами по изобретению можно комбинировать с химиотерапией, лучевой терапией, лечением стволовыми клетками, хирургическим вмешательством и другими видами лечения, эффективными против подлежащего лечению расстройства. Пригодные классы других средств, которые можно вводить с антителами и конъюгатами анти-CD228 антитело-лекарственное средство, как здесь описано, включают, например, антитела к другим рецепторам, экспрессируемым на опухолевых клетках, антитубулиновые агенты (например, ауристатины), агенты, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и трехъядерные катионные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, сенсibilизаторы химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, преформирующие соединения, пуриновые антиметаболиты, пурамицины, радиационные сенсibilизаторы, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и т.п.

[0222] Лечение анти-CD228 антителом или конъюгатом антитело-лекарственное средство, необязательно в комбинации с любыми другими средствами или схемами, описанными выше, самостоятельно или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может повысить среднюю выживаемость без прогрессирования заболевания или общую выживаемость пациентов с опухолями (например, меланомой, раком поджелудочной железы, немелкоклеточным раком легкого, раком щитовидной железы, раком головы и шеи, тройным негативным раком молочной железы, колоректальным раком, мезотелиомой, холиангиокарциномой), в частности, при рецидиве или рефрактерной форме по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже 100% или больше по сравнению с таким же лечением (например, химиотерапией), но

без одного анти-CD228-антитела или в виде конъюгата. В дополнение или в качестве альтернативы, лечение (например, стандартная химиотерапия), включающее только анти-CD228 антитело или в виде конъюгата, может повысить уровень полного ответа, уровень частичного ответа или уровень объективного ответа (полный+частичный) у пациентов с опухолями по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно 50%, 60%-70% или даже 100% по сравнению с таким же лечением (например, химиотерапией), но без одного анти-CD228 антитела или в виде конъюгата.

[0223] Как правило, в клинических испытаниях (например, исследованиях фазы II, фазы II/III или фазы III) вышеуказанное повышение средней выживаемости без прогрессирования заболевания и/или уровня ответа у пациентов, получавших стандартную терапию плюс анти-CD228 антитело одного или в виде конъюгата по сравнению с контрольной группой пациентов, получающих только стандартную терапию (или плюс плацебо), являются статистически значимыми, например, на уровне  $p=0,05$  или  $0,01$  или даже  $0,001$ . Уровни полного и частичного ответа определяется объективными критериями, обычно используемыми в клинических испытаниях препаратов против рака, например, в соответствии с перечнем или принятым Национальным институтом рака и/или Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов.

#### **IX. Изделия и наборы**

[0224] В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к изделию или набору, который включает анти-CD228 антитело или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанные здесь. Изделие или набор могут дополнительно содержать инструкции по применению анти-CD228 антитела или конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанных здесь, в способах по настоящему изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления изделие или набор содержат инструкции по применению анти-CD228 антитела или конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанных здесь, в способах лечения рака (например, меланомы и других карцином, включая рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак молочной железы, такой как тройной негативный рак молочной железы, колоректальный рак, мезотелиома или холиангиокарцинома) у субъекта, включающих введение субъекту эффективного количества анти-CD228 антитела или конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство, описанных здесь. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой меланому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой немелкоклеточный рак легкого. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак щитовидной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой тройной негативный рак молочной железы. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой рак прямой кишки. В некоторых вариантах

осуществления рак представляет собой мезотелиому. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой холиангиокарциному. В некоторых вариантах осуществления субъектом является человек.

[0225] Изделие или набор могут дополнительно содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как одно- или двухкамерные шприцы) и пробирки. В некоторых вариантах осуществления контейнер представляет собой флакон. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер содержит состав.

[0226] Изделие или набор могут дополнительно содержать этикетку или листок-вкладыш, который находится на контейнере или связан с ним, может включать указания для восстановления и/или применения состава. Этикетка или листок-вкладыш могут дополнительно указывать, что состав пригоден или предназначен для подкожного, внутривенного (например, внутривенной инфузии) или других способов введения для лечения рака у субъекта (например, меланомы и других карцином, включая рак поджелудочной железы, немелкоклеточный рак легкого, рак щитовидной железы, рак головы и шеи, рак молочной железы, например, тройной негативный рак молочной железы, рак толстого кишечника, мезотелиому или холиангиокарциному). Контейнер, содержащий состав, может представлять собой флакон для одноразового использования или флакон для многократного использования, что позволяет многократно вводить восстановленный препарат. Изделие или набор могут дополнительно включать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель. Изделие или набор могут дополнительно включать другие материалы, желательные с коммерческой, терапевтической и пользовательской точек зрения, включая другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по применению.

[0227] Изделие или набор по настоящему изобретению, необязательно, дополнительно включает контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где анти-CD228 антитело или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство является первым лекарственным средством, и указанное изделие или набор дополнительно содержат инструкции, на этикетке или во вкладыше в упаковку, по лечению субъекта вторым лекарственным средством в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство предназначено для устранения или уменьшения тяжести одного или более нежелательных явлений.

[0228] В некоторых вариантах осуществления изобретения анти-CD228 антитело или конъюгат анти-CD228 антитело-лекарственное средство находится в контейнере в виде лиофилизированного порошка. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок находится в герметично закрытом контейнере, таком как флакон, ампула или пакетики, с указанием количества активного агента. Когда фармацевтический препарат вводят инъекцией, то может быть, например, предоставлена ампула со стерильной водой для инъекций или физиологическим раствором, необязательно в виде части набора, так чтобы ингредиенты можно было смешать перед введением. Такие

наборы могут дополнительно включать, если желательно, один или более различных традиционных фармацевтических компонентов, таких как, например, контейнеры с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т. д., что будет очевидно для специалистов в данной области. Печатные инструкции, либо в виде вкладышей, либо в виде этикеток, с указанием количества компонентов для введения, руководства по применению и/или руководства по смешиванию компонентов также могут быть включены в набор.

#### **Х. Другие применения**

[0229] Анти-CD228 антитела, описанные здесь, такие как гуманизированные анти-CD228 антитела, можно использовать для детектирования CD228 в контексте клинической диагностики или лечения или в исследованиях. Экспрессия CD228 на злокачественной опухоли указывает на то, что опухоль поддается лечению антителами по настоящему изобретению. Антитела также могут продаваться в качестве исследовательских реагентов для проведения лабораторных исследований по выявлению клеток, несущих CD228, и их реакции на различные стимулы. В таких применениях моноклональные антитела можно пометить флуоресцентными молекулами, спин-меченными молекулами, ферментами или радиоизотопами и могут быть предоставлены в виде набора со всеми необходимыми реагентами для проведения анализа на CD228. Антитела, описанные здесь, можно использовать для детектирования экспрессии белка CD228 и определения того, поддается ли рак лечению с использованием ADC CD228. Например, hL49 (HALC) можно использовать для детектирования экспрессии CD228 на клетках меланомы, клетках злокачественных опухолей поджелудочной железы, клетках немелкоклеточного рака легких, клетках рака щитовидной железы и клетках рака головы и шеи. Антитела также можно использовать для очистки CD228, например, с помощью аффинной хроматографии.

[0230] Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, регистрационные номера и тому подобное, цитированные выше или ниже, включены посредством ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный элемент был специально и индивидуально указан как включенный посредством ссылки. Если разные варианты последовательности связаны с регистрационным номером в разное время, то подразумевается вариант, связанный с идентификационным номером на дату вступления в силу настоящей заявки. Дата вступления в силу означает более раннюю из дат фактической подачи или даты подачи приоритетной заявки со ссылкой на регистрационный номер, если это применимо. Аналогичным образом, если разные варианты публикации, веб-сайта и т.п. публикуются в разное время, то подразумевается вариант, опубликованный последним на дату вступления в силу заявки, если не указано иное. Любой признак, стадия, элемент, вариант осуществления или аспект изобретения может использоваться в сочетании с любым другим, если специально не указано иное. Несмотря на то, что настоящее изобретение было описано довольно подробно с помощью иллюстраций и примеров, с целью ясности и понимания, будет очевидно, что определенные изменения и модификации могут быть осуществлены в пределах объема прилагаемой формулы

изобретения.

### **XI. Последовательности переменных областей**

[0231] В каждой из следующих последовательностей переменной области CDR подчеркнуты согласно системе нумерации Kabat, и CDR выделены жирным шрифтом и курсивом согласно системе нумерации IMGT.

[232] Мышиная L49 vH

***EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISD***  
***SGITYYNPSLKSSRISITRDTSKNQYYLQLNFVTAEDTATYNCARRTLATYYAMDYWGQ***  
**GTSVTVSS (SEQ ID NO:21)**

[233] Mu IGHV3-8 vH

***EVQLQESGPSLVKPSQTLSTCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYSG***  
***STYYNPSLKSSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTTEDTATYYCAR (SEQ ID NO:22)***

[234] Hu IGHV4-59/HJ4

***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYSWSWIRQPPGKGLEWIGYIYYSGS***  
***TNYNPSLKSRVTVISVDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARYFDYWGQGLVTVSS***  
**(SEQ ID NO:23)**

[235] hvHA

***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKLEYIGYISDSGI***  
***TYYNPSLKSRVTVISRDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCARRTLATYYAMDYWGQGL***  
***VTVSS (SEQ ID NO:7)***

[236] hvHB

***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQFPGNKLEYMGYISDSG***  
***ITYYNPSLKSRVTVISRDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCARRTLATYYAMDYWGQGL***  
***VTVSS (SEQ ID NO:24)***

[237] hvHC

***QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQFPGNKLEYMGYISDSG***  
***ITYYNPSLKSRVTVISRDTSKNQYSLKLSFVTAADTAVYNCARRTLATYYAMDYWGQGL***  
***VTVSS (SEQ ID NO:25)***

[238] Mu L49 vL

***DFVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRASOSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYR***  
***VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGTKLEIK (SEQ***  
***ID NO:26)***

[239] Mu IGKV1-110 vL

***DVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSOSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK***  
***VSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVP (SEQ ID NO:27)***

[240] Hu IGKV2-30/KJ2

***DVVMQTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSOSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYKV***  
***SNRDSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIK***  
**(SEQ ID NO:28)**

[241] hvLA

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASOSLVHSNGNTYLHWFQQRPGQSPRRLIYR  
ISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSOSTHVPPTFGQGTKLEIK  
 (SEQ ID NO:29)

[242]hvLB

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASOSLVHSNGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYR  
ISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSOSTHVPPTFGQGTKLEIK  
 (SEQ ID NO:20)

[243]hvLC

DFVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASOSLVHSDGNTYLHWYQQRPGQSPRLLIYR  
ISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSOSTHVPPTFGQGTKLEIK  
 (SEQ ID NO:8).

Xii. Примерные варианты осуществления

[0244] варианты осуществления, обеспеченные здесь, представляют собой:

1. Выделенное анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи включает:

(i) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(ii) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; а

также

(iii) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и

Где вариабельная область легкой цепи включает:

(i) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; а

также

(iii) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 1, где антитело является гуманизированным.

3. Гуманизированное анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, при условии, что положение H27 занято D, положение H30 занято T, положение H47 занято Y, положение H71 занято R, и положение H78 занято Y, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8, при условии, что положение L2 занято F, положение L36 занята Y, и положение L46 занято L.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 3, при дополнительном условии, что положение L28 занято D.

5. Гуманизированное анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR согласно системе нумерации Kabat с SEQ ID NO: 7, где положение H27 занято D, положение H30 занято T,

положение H47 занято Y, положение H71 занято R, и положение h78 занято Y, и переменную область легкой цепи, содержащую три CDR согласно системе нумерации Kabat с SEQ ID NO: 8, где положение L2 занято F, положение L36 занято Y, и положение L46 занято L.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 10, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, Fv, диатела, линейного антитела, и одноцепочечного фрагмента антитела.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 12, где переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, и переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13, где константная область тяжелой цепи имеет изотип IgG1.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13 или варианту осуществления 14, где константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 17, и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13 или 14, где константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека, которая имеет пониженное связывание с Fcγ рецептором по сравнению с природной константной областью человека.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 13 или 14, где константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 19 (S239C), и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-17, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

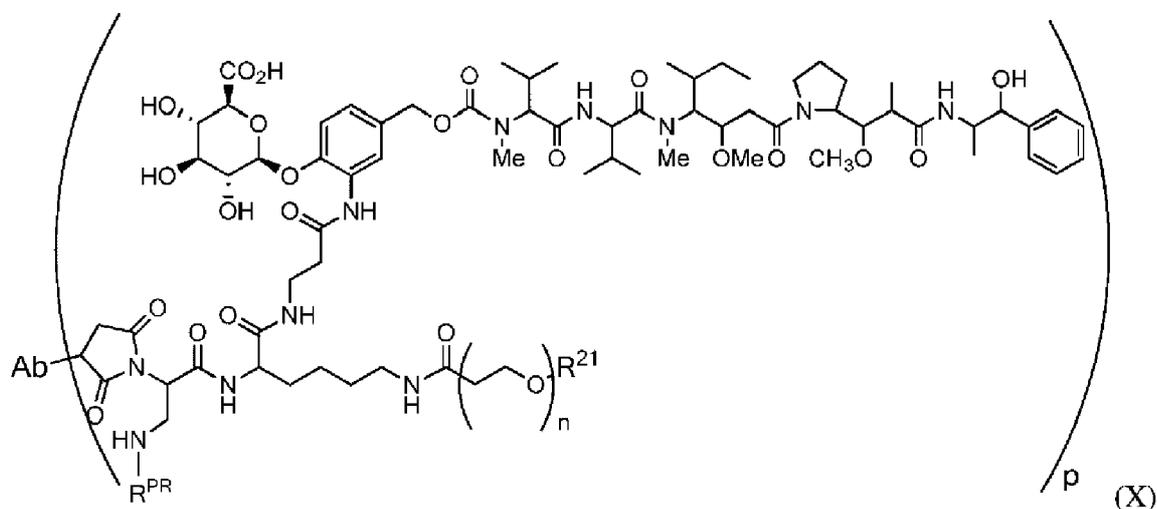
19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 18, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом через линкер.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 19, где линкер представляет собой линкер MDpr-PEG(12)-gluc.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-20, где цитотоксический или цитостатический агент представляет собой монометилауристин.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 21, где монометилауристин представляет собой монометилауристин е (MMAE).

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 22, где линкер присоединен к монометилауристину E с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего структуру:



где Ab представляет собой антитело hL49, n равно 12, R<sup>PR</sup> представляет собой атом водорода, R<sup>21</sup> представляет собой CH<sub>3</sub>, и p означает число от 1 до 16.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 23, где среднее значение p в популяции конъюгата антитело-лекарственное средство составляет примерно 8.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-24, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

26. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельную область тяжелой цепи и/или вариabельную область легкой цепи, как определено в любом из вариантов осуществления 1-17.

27. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 26.

28. Вектор по варианту осуществления 27, где вектор является экспрессионный вектором.

29. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по варианту осуществления 26.

30. Клетка-хозяин по варианту осуществления 29, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

31. Способ получения анти-CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 29 или варианту осуществления 30 в условиях, подходящих для получения анти-CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

32. Способ по варианту осуществления 31, дополнительно включающий выделение анти-CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцированного клеткой-хозяином.

33. Способ получения конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство, включающий культивирование клетки-хозяина по варианту осуществления 29 или варианту осуществления 30 в условиях, подходящих для получения анти-CD228 антитела; выделение полученного анти-CD228 антитела из клетки-хозяина; и конъюгирование анти-CD228 антитела с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

34. Способ по варианту осуществления 33, где анти-CD228 антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом через линкер.

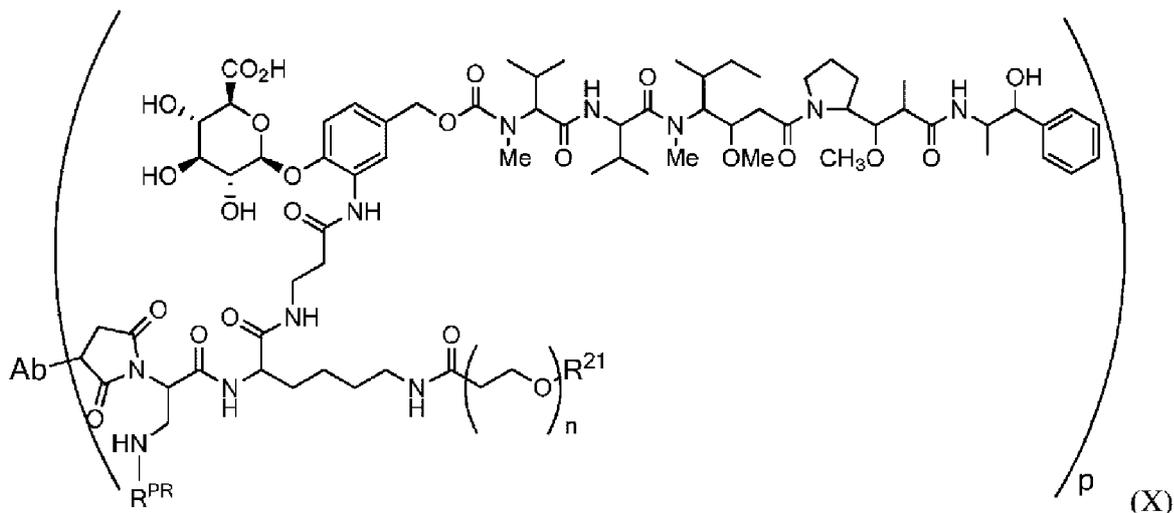
35. Способ по варианту осуществления 34, где линкер представляет собой линкер mdpr-peg (12)-gluc.

36. Способ по любому из вариантов осуществления 33-35, где цитотоксический или цитостатический агент представляет собой монометилауристин.

37. Способ по варианту осуществления 36, где монометилауристин представляет собой монометилауристин e (mmae).

38. Способ по варианту осуществления 37, где линкер присоединен к монометилауристину E с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство,

имеющего структуру:



где Ab представляет собой антитело hL49,  $n$  равно 12,  $R^{PR}$  представляет собой атом водорода,  $R^{21}$  представляет собой  $CH_3$ , и  $p$  означает число от 1 до 16.

39. Способ по варианту осуществления 38, где среднее значение  $p$  в популяции конъюгата антитело-лекарственное средство составляет примерно 8.

40. Способ по любому из вариантов осуществления 33-39, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

41. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-25.

42. Способ по варианту осуществления 41, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и не отвечал на лечение, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

43. Способ по варианту осуществления 41, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и у него имел место рецидив после лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

44. Способ по варианту осуществления 41, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и имел прогрессирование заболевания во время лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

45. Способ по любому из вариантов осуществления 41-44, где рак представляет собой рак на поздней стадии.

46. Способ по варианту осуществления 45, где рак на поздней стадии представляет собой рак стадии 3 или 4.

47. Способ по варианту осуществления 45 или 46, где рак на поздней стадии представляет собой метастатический рак.

48. Способ по любому из вариантов осуществления 41-47, где рак представляет собой рецидивирующий рак.

49. Способ по любому из вариантов осуществления 41-48, где рак является неоперабельным.

50. Способ по любому из вариантов осуществления 41-49, где субъект ранее получал лечение стандартной терапевтической терапией по поводу рака, и предшествующее лечение было неэффективным.

51. Способ по любому из вариантов осуществления 41-50, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, колоректального рака, рака легких, рака щитовидной железы, рака молочной железы, холиангиокарциномы, рака пищевода и рака головы и шеи.

52. Способ по варианту осуществления 51, где рак представляет собой меланому.

53. Способ по варианту осуществления 52, где меланома представляет собой кожную меланому.

54. Способ по варианту осуществления 53, где кожная меланома выбрана из группы, состоящей из поверхностно-распространяющейся меланомы, узловой меланомы, акральной лентигинозной меланомы, злокачественной лентиго-меланомы и десмопластической меланомы.

55. Способ по варианту осуществления 54, где акральная лентигинозная меланома представляет собой подногтевую меланому.

56. Способ по любому из вариантов осуществления 53-55, где субъект ранее получал терапию ингибитором pd-1 или pd-l1.

57. Способ по варианту осуществления 56, где субъект ранее получал терапию ингибитором pd-1.

58. Способ по варианту осуществления 52, где меланома представляет собой подкожную меланому.

59. Способ по варианту осуществления 58, где подкожная меланома представляет собой меланому глаза или меланому слизистой оболочки.

60. Способ по варианту осуществления 52, где меланома представляет собой некожную меланому.

61. Способ по варианту осуществления 51, где рак представляет собой мезотелиому.

62. Способ по варианту осуществления 61, где мезотелиома выбрана из группы, состоящей из мезотелиомы плевры, мезотелиомы брюшины, мезотелиомы перикарда и мезотелиомы яичка.

63. Способ по варианту осуществления 62, где мезотелиома представляет собой мезотелиому плевры.

64. Способ по варианту осуществления 63, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.

65. Способ по варианту осуществления 64, где терапия на основе платины представляет собой цисплатин.

66. Способ по любому из вариантов осуществления 63-65, где субъект ранее получал терапию пеметрекседом.

67. Способ по варианту осуществления 51, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

68. Способ по варианту осуществления 67, где немелкоклеточный рак легкого имеет мутантную форму рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

69. Способ по варианту осуществления 67, где немелкоклеточный рак легкого имеет EGFR дикого типа.

70. Способ по варианту осуществления 69, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.

71. Способ по варианту осуществления 69 или 70, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-L1.

72. Способ по варианту осуществления 71, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1.

73. Способ по варианту осуществления 51, где рак молочной железы выбран из группы, состоящей из HER2-положительного, HER2-негативного, эстрогеновый рецептор-положительного (ER), ег-негативного, прогестероновый рецептор-положительного (PR), PR-негативного и тройного негативного рака молочной железы.

74. Способ по варианту осуществления 73, где рак молочной железы представляет собой HER2-негативный рак молочной железы.

75. Способ по варианту осуществления 74, где субъект получал одну или более предшествующих линий терапии HER2-негативного рака молочной железы.

76. Способ по варианту осуществления 75, где одна или более предшествующих линий терапии включали лечение таксаном.

77. Способ по варианту осуществления 75 или 76, где субъект является гормональный рецептор-положительным.

78. Способ по варианту осуществления 77, где субъект ранее получал терапию ингибитором CDK4/6.

79. Способ по варианту осуществления 77 или 78, где субъект ранее получал гормонально-направленную терапию.

80. Способ по варианту осуществления 51, где колоректальный рак выбран из группы, состоящей из колоректальной аденокарциномы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, первичной колоректальной лимфомы, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта и лейомиосаркомы.

81. Способ по варианту осуществления 80, где субъект ранее получал две или более линии терапии колоректального рака.

82. Способ по варианту осуществления 51, где рак поджелудочной железы представляет собой экзокринный рак или нейроэндокринный рак.

83. Способ по варианту осуществления 82, где экзокринный рак выбран из группы, состоящей из аденокарциномы поджелудочной железы, ацинарно-клеточной карциномы,

цистаденокарциномы, панкреатобластомы, аденосквамозной карциномы, карциномы из перстневидных клеток, гепатоидной карциномы, коллоидной карциномы, недифференцированной карциномы и муцинозно-кистозного новообразования поджелудочной железы.

84. Способ по варианту осуществления 83, где аденокарцинома поджелудочной железы представляет собой протоковую аденокарциному поджелудочной железы.

85. Способ по варианту осуществления 83 или 84, где субъект ранее получал одну или более линий терапии рака поджелудочной железы.

86. Способ по любому из вариантов осуществления 41-85, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель.

87. Способ по любому из вариантов осуществления 41-86, где субъектом является человек.

88. Набор, содержащий:

(а) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-25; и

(б) инструкции по применению антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитело-лекарственное средство в соответствии со способом по любому из вариантов осуществления 41-87.

89. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-25 и один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из физиологически приемлемого носителя, разбавителя, эксципиента и вспомогательного вещества.

90. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-25 для применения в лечении рака у субъекта.

91. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 90, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и не отвечал на лечение, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

92. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 90, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и у него имел место рецидив после лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

93. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 90, где

субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и имел прогрессирование заболевания во время лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

94. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-93, где рак представляет собой рак на поздней стадии.

95. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 94, где рак на поздней стадии представляет собой рак стадии 3 или 4.

96. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 94 или 95, где рак на поздней стадии представляет собой метастатический рак.

97. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-96, где рак представляет собой рецидивирующий рак.

98. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-97, где рак является неоперабельным.

99. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-98, где субъект ранее получал лечение стандартной терапевтической терапией по поводу рака, и предшествующее лечение было неэффективным.

100. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-99, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, колоректального рака, рака легкого, рака щитовидной железы, рака молочной железы, холиангиокарциномы, рака пищевода и рака головы и шеи.

101. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 100, где рак представляет собой меланому.

102. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 101, где меланома представляет собой кожную меланому.

103. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 102, где кожная меланома выбрана из группы, состоящей из поверхностно-распространяющейся меланомы, узловой меланомы, акральной лентигозной меланомы, злокачественной лентиго-меланомы и десмопластической меланомы.

104. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 103, где акральная лентигозная меланома представляет собой подногтевую меланому.

105. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 102-104, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-11.

106. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 105, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1.

107. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 101, где меланома представляет собой подкожную меланому.

108. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 107, где подкожная меланома представляет собой меланому глаза или меланому слизистой

оболочки.

109. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 101, где меланома представляет собой некожную меланому.

110. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 100, где рак представляет собой мезотелиому.

111. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 110, где мезотелиома выбрана из группы, состоящей из мезотелиомы плевры, мезотелиомы брюшины, мезотелиомы перикарда и мезотелиомы яичка.

112. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 111, где мезотелиома представляет собой мезотелиому плевры.

113. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 112, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.

114. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 113, где терапия на основе платины представляет собой цисплатин.

115. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 112-114, где субъект ранее получал терапию пеметрекседом.

116. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 100, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

117. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 116, где немелкоклеточный рак легкого имеет мутантную форму рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

118. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 116, где немелкоклеточный рак легкого имеет EGFR дикого типа.

119. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 118, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.

120. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 118 или 119, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-11.

121. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 120, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1.

122. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 100, где рак молочной железы выбран из группы, состоящей из HER2-положительного, HER2-негативного, эстрогеновый рецептор-положительного (ER), er-негативного, прогестеронового рецептор-положительного (PR), PR-негативного и тройного негативного рака молочной железы.

123. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 122, где рак молочной железы представляет собой HER2-негативный рак молочной железы.

124. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 123, где субъект получил одну или более предшествующих линий терапии HER2-негативного рака молочной железы.

125. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 124,

где одна или более предшествующих линий терапии включали лечение таксаном.

126. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 124 или 125, где субъект является гормональный рецептор-положительным.

127. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 126, где субъект ранее получал терапию ингибитором CDK4/6.

128. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 126 или 127, где субъект ранее получал гормонально-направленную терапию.

129. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 128, где колоректальный рак выбран из группы, состоящей из колоректальной аденокарциномы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, первичной колоректальной лимфомы, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта и лейомиосаркомы.

130. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 129, где субъект ранее получал две или более линии терапии колоректального рака.

131. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 100, где рак поджелудочной железы представляет собой экзокринный рак или нейроэндокринный рак.

132. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 131, где экзокринный рак выбран из группы, состоящей из аденокарциномы поджелудочной железы, ацинарно-клеточной карциномы, цистаденокарциномы, панкреатобластомы, аденосквамозной карциномы, карциномы из перстневидных клеток, гепатоидной карциномы, коллоидной карциномы, недифференцированной карциномы и муцинозно-кистозного новообразования поджелудочной железы.

133. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 132, где аденокарцинома поджелудочной железы представляет собой протоковую аденокарциному поджелудочной железы.

134. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по варианту осуществления 132 или 133, где субъект ранее получал одну или более линий терапии рака поджелудочной железы.

135. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-134, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель.

136. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 90-135, где субъектом является человек.

137. Применение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 18-25 в производстве лекарственного средства для лечения рака у субъекта.

138. Применение по варианту осуществления 137, где субъект ранее лечился одним

или более терапевтическими средствами и не отвечал на лечение, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

139. Применение по варианту осуществления 137, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и у него имел место рецидив после лечения, где один или более терапевтических агентов не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

140. Применение по варианту осуществления 137, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и имело прогрессирование заболевания во время лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

141. Применение по любому из вариантов осуществления 137-140, где рак представляет собой рак на поздней стадии.

142. Применение по варианту осуществления 141, где рак на поздней стадии представляет собой рак стадии 3 или 4.

143. Способ по варианту осуществления 141 или 142, где рак на поздней стадии представляет собой метастатический рак.

144. Применение по любому из вариантов осуществления 137-143, где рак представляет собой рецидивирующий рак.

145. Применение по любому из вариантов осуществления 137-144, где рак является неоперабельным.

146. Применение по любому из вариантов осуществления 137-145, где субъект ранее получал лечение стандартной терапевтической терапией по поводу рака, и предшествующее лечение было неэффективным.

147. Применение по любому из вариантов осуществления 137-146, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, колоректального рака, рака легких, рака щитовидной железы, рака груди, холиангиокарциномы, рака пищевода и рака головы и шеи.

148. Применение по варианту осуществления 147, где рак представляет собой меланому.

149. Применение по варианту осуществления 148, где меланома представляет собой кожную меланому.

150. Применение по варианту осуществления 149, где кожная меланома выбрана из группы, состоящей из поверхностно-распространяющейся меланомы, узловой меланомы, акральной лентигинозной меланомы, злокачественной лентиго-меланомы и десмопластической меланомы.

151. Применение по варианту осуществления 150, где акральная лентигинозная меланома представляет собой подногтевую меланому.

152. Применение по любому из вариантов осуществления 149-151, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-11.

153. Применение по варианту осуществления 152, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1.

154. Применение по варианту осуществления 148, где меланома представляет собой подкожную меланому.

155. Применение по варианту осуществления 154, где подкожная меланома представляет собой меланому глаза или меланому слизистой оболочки.

156. Применение по варианту осуществления 148, где меланома представляет собой некожную меланому.

157. Применение по варианту осуществления 147, где рак представляет собой мезотелиому.

158. Применение по варианту осуществления 157, где мезотелиома выбрана из группы, состоящей из мезотелиомы плевры, мезотелиомы брюшины, мезотелиомы перикарда и мезотелиомы яичка.

159. Применение по варианту осуществления 158, где мезотелиома представляет собой мезотелиому плевры.

160. Применение по варианту осуществления 159, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.

161. Применение по варианту осуществления 160, где терапия на основе платины представляет собой цисплатин.

162. Применение по любому из вариантов осуществления 158-161, где субъект ранее получал терапию пеметрекседом.

163. Применение по варианту осуществления 147, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.

164. Применение по варианту осуществления 163, где немелкоклеточный рак легкого имеет мутантную форму рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).

165. Применение по варианту осуществления 163, где немелкоклеточный рак легкого имеет EGFR дикого типа.

166. Применение по варианту осуществления 165, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.

167. Применение по варианту осуществления 165 или 166, где субъект ранее получал терапию ингибитором pd-1 или pd-11.

168. Применение по варианту осуществления 167, где субъект ранее получал терапию ингибитором pd-1.

169. Применение по варианту осуществления 147, где рак молочной железы выбран из группы, состоящей из HER2-положительного, HER2-негативного, эстрогеновый рецептор-положительного (ER), ER-негативного, прогестероновый рецептор-положительного (PR), PR-негативного и тройного негативного рака молочной железы.

170. Применение по варианту осуществления 169, где рак молочной железы представляет собой HER2-негативный рак молочной железы.

171. Применение по варианту осуществления 170, где субъект получал одну или

более предшествующих линий терапии HER2-негативного рака молочной железы.

172. Применение по варианту осуществления 171, где одна или более предшествующих линий терапии включали лечение таксаном.

173. Применение по варианту осуществления 171 или 172, где субъект является гормональный рецептор-положительным.

174. Применение по варианту осуществления 173, где субъект ранее получал терапию ингибитором CDK4/6.

175. Применение по варианту осуществления 173 или 174, где субъект ранее получал гормонально-направленную терапию.

176. Применение по варианту осуществления 147, где колоректальный рак выбран из группы, состоящей из колоректальной аденокарциномы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, первичной колоректальной лимфомы, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта и лейомиосаркомы.

177. Применение по варианту осуществления 176, где субъект ранее получал две или более линии терапии колоректального рака.

178. Применение по варианту осуществления 147, где рак поджелудочной железы представляет собой экзокринный рак или нейроэндокринный рак.

179. Применение по варианту осуществления 178, где экзокринный рак выбран из группы, состоящей из аденокарциномы поджелудочной железы, ацинарно-клеточной карциномы, цистаденокарциномы, панкреатобластомы, аденосквамозной карциномы, карциномы из перстневидных клеток, гепатоидной карциномы, коллоидной карциномы, недифференцированной карциномы и муцинозно-кистозного новообразования поджелудочной железы.

180. Применение по варианту осуществления 179, где аденокарцинома поджелудочной железы представляет собой протоковую аденокарциному поджелудочной железы.

181. Применение по варианту осуществления 179 или 180, где субъект ранее получал одну или более линий терапии рака поджелудочной железы.

182. Применение по любому из вариантов осуществления 137-181, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель.

183. Применение по любому из вариантов осуществления 137-182, где субъектом является человек.

[0245] Изобретение будет более полно понято со ссылкой на следующие примеры. однако их не следует рассматривать как ограничивающие объем изобретения. понятно, что примеры и варианты осуществления, описанные в данном документе, предназначены только для иллюстративных целей, и что различные модификации или изменения в их свете будут предложены специалистам в данной области техники и должны быть включены в

сущность и объем данной заявки и объем прилагаются претензии.

#### ПРИМЕРЫ

Пример 1: экспрессия CD228 в линиях опухолевых клеток

[0246] количественное определение числа копий CD228 на клеточной поверхности различных линий опухолевых клеток определяли с использованием мышиных mAb к CD228 в качестве первичного антитела и проточного цитометрического непрямого анализа DAKO QiFiKit, как описано производителем (DAKO A/S, Glostrup, Дания) и оценивали с использованием проточного цитометра attune nxt. Полученное количество молекул CD228, экспрессированных в расчете на клетку, показано в таблице 1.

Молекулы CD228 на клетку для различных клеточных линий	
Клеточная линия	Количество молекул CD228 на клетку
A2058	51000
RPMI-7951	0
PRMI-7951+CD228	400000
SK-MEL-5	134000
SK-MEL-28	450000
Colo853	92000
IGR37	24000
A375	16000
HPAF-II	34000
COLO818	210000
H3677	40000
IGR39	6200
MALME3M	149754
SH4	106000
SK-MEL-2	264197
SK-MEL-24	151000
SK-MEL-3	26000
WM115	1000
WM266.4	46700
JL-1	185708
NCI-H2452	908219
NCI-H2052	334559
MSTO211h	9416

SW1463	18683
SW1116	59064
SW48	16776
SW480	11197
SK-CO-1	104398
T84	28486
Colo205	4084
HCT15	3701
HCT116	40466
LoVo	7441
LS174T	667
Cal851	175893
HCC70	91994
HCC1937	16467
HCC1143	115430
MDA-MB-231	174640
BT-474	968
SK-BR-3	1722
HT1080	35224
Capan1	19250
A549	18799
CorL23	47446
Calu-1	59000
Sk-Mes-1	18000
NCIH226	843430
NCIH441	79460
CORL105	236804
92-1	7879
Mel202	12527
MP46	14733
MP41	23074
MP65	51397
MM28	108400

Пример 2: Иммуногистохимический анализ экспрессии CD228

[0247] Микроматрицы опухолевых тканей были получены из коммерческих источников. Ткани, фиксированные в формалине и залитые в парафин (FFPE), были приобретены в US Biomax Inc. Все образцы были обработаны на автоматической системе для окрашивания Bond-Max™ (Leica).

[0248] Срезы FFPE на предметных стеклах, депарафинизировали с использованием раствора Bond™ Dewax (Leica, номер по каталогу AR9222) при 72°C и регидратировали. Извлечение антигена проводили с использованием раствора 2 для демаскировки антигена в ткани на основе ЭДТА Bond™ (Leica, номер по каталогу AR9640) в течение 20 мин при 95-100°C перед инкубацией с первичным анти-CD228 антителом (Sigma; номер по каталогу HPA004880). Соответствующий по изотипу кроличий IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля для фонового окрашивания. Для автоматического окрашивания ИHC использовали либо набор Refine DAB, либо набор для детектирования на основе щелочной фосфатазы: набор для детектирования Bond™ Polymer AP Red (Leica, номер по каталогу DS9305). Срезы инкубировали с кроличьими моноклональными первичными антителами mAb против кроличьего CD228 в течение 45 мин при 1 мкг/мл с предварительным 30-мин белковым блоком (DAKO номер по каталогу # X0909). После развития хромогенного окрашивания срезы контрастировали гематоксилином и закрывали покровным стеклом. Срезы анализировал и оценивал патолог, и изображения получали с помощью микроскопа Zeiss Axiovert 200M (Carl Zeiss, Inc., Thornwood, NY).

[0249] На фиг. 1 показан высокий уровень экспрессии CD228 в образцах опухоли меланомы, полученных от пациентов, что дает веское обоснование для лечения этих опухолей с использованием ADC CD228.

[0250] На фиг. 2 показан высокий уровень экспрессии CD228 в образцах опухоли мезотелиомы, полученных от пациентов, что дает веское обоснование для лечения этих опухолей с использованием ADC CD228.

[0251] На фиг. 3 показан высокий уровень экспрессии CD228 в образцах от пациентов с колоректальным раком, что дает веское обоснование для лечения этих опухолей с использованием CD228 ADC.

[252] На фиг. 4 показан высокий уровень экспрессии CD228 в образцах от пациентов с тройным негативным (HR-, PgR-, Her2-) раком молочной железы (верхняя панель) и образцах от пациентов с Her2-HR+ раком молочной железы (нижняя панель), что дает веское обоснование для лечения этих опухолей с использованием ADC CD228.

[0253] На фиг. 5 показан высокий уровень экспрессии CD228 в образцах пациентов с раком поджелудочной железы, что дает веское обоснование для лечения этих опухолей с использованием ADC CD228.

[0254] На фиг. 6 показан высокий уровень экспрессии CD228 в образцах от пациентов с плоскоклеточным немелкоклеточным раком легкого (верхняя панель) и образцах пациентов с немелкоклеточной аденокарциномой легкого (нижняя панель), что дает веское обоснование для лечения этих опухолей с использованием CD228 ADC.

[0255] Резюме по результатам иммуногистохимических экспериментов сравнивали

с уровнями РНК CD228, указанными в Атласе генома рака для различных типов опухолей. Определяли порог положительности РНК CD228, применив ИС распространенность меланомы к TCGA. Как следует из данных на фиг. 7, большинство типов опухолей имеют тесную корреляцию между экспрессией РНК и иммуногистохимией, за исключением HER2-/HR+ рака молочной железы. TNBC=тройной негативный рак молочной железы. NSCLC=немелкоклеточный рак легкого. Adeno=аденокарцинома. Squamous=плоскоклеточная карцинома. TCGA=Атлас генома рака.

Пример 3: конъюгаты анти-CD228 антитело-лекарственное средство

[0256] Различные анти-CD228 антитела конъюгировали с лекарственным средством MMAE через линкер MDpr-PEG(12)-gluc, так что средняя лекарственная нагрузка на одно антитело составляла примерно 8. Способ конъюгации описан в публикации заявки на патент США 2018/0092984. Опухолевые клетки инкубировали с конъюгатами анти-CD228 антитело-лекарственное средство (ADC) в течение 96-144 ч при 37°C. В качестве отрицательного контроля использовали ADC человеческого IgG. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью Cell Titer Glo в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресцентный сигнал измеряли на флуоресцентном планшетном ридере Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Данные нормализовали к необработанным клеткам, и значения x50 рассчитывали с использованием программного обеспечения Graph Pad. Результаты представлены в таблице 2 в виде IC<sub>50</sub>, концентрация соединения, необходимая для снижения жизнеспособности на 50% по сравнению с клетками, обработанными носителем (контроль=100%). Химерные ADC L49 (cL49) и мыши (mL49) превосходили все другие ADC против CD228, особенно в линиях клеток с более низкой экспрессией CD228.

Таблица 2

IC<sub>50</sub> конъюгатов анти-CD228-антитело-лекарственное средство против различных опухолевых клеток

Антитело	Линкер лекарственного средства	Нагрузка лека рств енн ым сред ством	Клеточные линии меланомы (# молекул CD228 на клетку)				
			A2058 (51000)	RPMI -7951 (0)	RPMI-7951 +p97 (400000)	SK-MEL-5 (134000)	SK-MEL-28 (450000)
mL49	MDpr-PEG(12)-gluc-	8	12	>1000	3	5	3

	MMAE						
cL49	MDpr- PEG(12)- gluc- MMAE	8	5	>1000	2	2	2
mL235	MDpr- PEG(12)- gluc- MMAE	8	780	>1000	17	305	114
Santa Cruz (#271633)	MDpr- PEG(12)- gluc- MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000
R&D (#893416)	MDpr- PEG(12)- gluc- MMAE	8	444	>1000	4	55	6
Biolegend (#363101)	MDpr- PEG(12)- gluc- MMAE	8	718	>1000	2	100	7
hIgG	MDpr- PEG(12)- gluc- MMAE	8	>1000	>1000	>1000	>1000	>1000

Пример 4: Гуманизация мышиного антитела L49

[0257] Мышиное антитело mL49 (Siemers et al., 1997, *Bioconjug. Chem.*, 8: 510-9) использовали в качестве отправной точки или донорное антитело для гуманизации. Подходящими человеческими акцепторными последовательностями были геномные последовательности, предоставленные hIGHV4-59 и hIGHJ4 для тяжелой цепи и hIGKV2-30 и hIGKJ2 для легкой цепи. Человеческие акцепторные последовательности показывают 70% (тяжелая цепь) и 84% (легкая цепь) идентичности с донорными последовательностями в каркасах варибельной области, когда CDR определены согласно системе нумерации Kabat.

[0258] Выравнивание донорных последовательностей выявило 26 положений в тяжелой цепи и 13 положений в легкой цепи, в которых последовательность акцепторного

каркаса человека отличалась от последовательности донорного каркаса и которые могут влиять на связывание антитела в результате прямого контакта с антигеном, влияя на конформация CDR или влияя на упаковку между тяжелой и легкой цепями, когда CDR определены в соответствии со системой нумерации Kabat. Три гуманизированных тяжелых цепи (HA, HB и HC) и три гуманизированные легкие цепи (LA, LB и LC) получали включением обратных мутаций в различных пермутациях определенных положений. См. фиг. 8-11 и таблицы 3-6.

Таблица 3

Гуманизирующие мутации в вариантах тяжелой цепи hL49

Вариант vH	Последовательность экзона акцептора HV	Остатки мышинной донорной области каркасной	Остатки человеческого акцепторного CDR
hvHA	IGHV4-59/HJ4	H27, H30, H47, H71, H78	нет
hvHB	IGHV4-59/HJ4	H27, H30, H40, H47, H48, H67, H71, H78	нет
hvHC	IGHV4-59/HJ4	H27, H30, H40, H47, H48, H67, H71, H78, H82B, H91	нет

Таблица 4

Специфические мутации мышинного каркаса в вариантах тяжелой цепи hL49

Вариант	27	30	40	47	48	67	71	78	82B	91	% человеческих
hvHA	D	T		Y			R	Y			88,8
hvHB	D	T	F	Y	M	I	R	Y			85,7
hvHC	D	T	F	Y	M	I	R	Y	F	N	83,7

Таблица 5

Гуманизирующие мутации в вариантах легкой цепи каппа hL49

Вариант vK	Последовательность акцепторного экзона KV	Остатки мышинной донорной области каркасной	Остатки человеческого акцепторного CDR
hvLA	IGKV2-30/KJ2	L2	нет
hvLB	IGKV2-30/KJ2	L2, L36, L46	нет
hvLC	IGKV2-30/KJ2	L2, L36, L46	L28

Таблица 6

## Специфические мутации мышиноного каркаса в вариантах легкой цепи каппа hL49

Вариант	2	36	46	% человеческих
hvLA	F			91,0
hvLB	F	Y	L	89,0
hvLC	F	Y	L	90,0

[0259] Затем экспрессировали гуманизированные антитела, представляющие каждую пермутацию этих цепей (9 вариантов) гуманизированных тяжелых и легких цепей. Затем антитела сравнивали с использованием анализа пептидных карт лабильных химических модификаций, обнаруженных в пептиде L2 для hL49 HALB (Asn (N) - потенциал дезамидирования аспарагина) и hL49 HALC (Asp (D) - потенциал для изомеризации аспартата) после инкубации в течение 1 недели в условиях температуры и pH, показанных в таблице 7. hL49 HALC (N28D) элиминирует дезамидирование, наблюдаемое в hL49 HALB, а также имеет ограниченную изомеризацию. Общие модификации пептида L2 снижаются с 13% до 2%.

Таблица 7

## Анализ пептидных карт гуманизированных анти-CD228 антител

hL49 ес	Темп ерату ра (°C)	pH	% немодифиц ированного пептида L2	% деамидиров оанного Asn 33	% изомеризи рованного Asp 33	% сукцимидир ованного Asn/Asp 33	% клипирован ного Asn/Asp 33	% общего модифицир ованного пептида L2
HALB	4	7,4	88,9	6,7	NA	3,5	1,0	11,1
	37	7,4	87,2	8,3	NA	3,5	0,9	12,8
	37	6,5	86,7	9,1	NA	3,6	0,6	13,3
	37	4,4	87,1	8,7	NA	3,5	0,6	12,9
HALC	4	7,4	98,0	NA	0,2	1,5	0,1	2,0
	37	7,4	98,1	NA	0,2	1,5	0,0	1,9
	37	6,5	98,0	NA	0,3	1,7	0,1	2,0
	37	4,4	97,9	NA	0,3	1,8	0,1	2,1

[0260] Кривые связывания для каждого полученного антитела определяли с помощью анализа конкурентного связывания. Вкратце,  $1 \times 10^5$  клеток RPMI-7951, стабильно экспрессирующих человеческий CD228, разводили аликвотами на лунку 96-луночных планшетов с v-образным дном на льду. Клетки инкубировали в течение 1 ч с 5 нМ AlexaFluor-647 (AF) родительских мышинных mAb CD228 и возрастающими концентрациями (от 0,06 нМ до 1000 нМ) немеченых гуманизированных mAb CD228 с

различными комбинациями гуманизированных легких цепей LA-LB и гуманизированных тяжелых цепей HA-HC. Клетки центрифугировали и промывали 3 раза PBS/BSA. Клетки центрифугировали и ресуспендировали в 125 мкл PBS/BSA. Флуоресценцию анализировали проточной цитометрией с использованием процента насыщенного флуоресцентного сигнала для определения процента связывания меченых мышинных mAb CD228. Кривые связывания рекомбинантных человеческих антител к CD228 показаны на фиг. 12A-12F.

[0261] Затем определяли  $K_D$  для каждого полученного антитела с помощью анализа насыщаемого связывания. Вкратце,  $1 \times 10^5$  клеток RPMI-7951, стабильно экспрессирующих человеческий CD228, помещали в аликвоты на лунку 96-луночных планшетов с v-образным дном. Каждое анти-CD228 антитело добавляли в концентрациях от 0,05 пМ до 340 нМ и инкубировали на льду в течение 60 мин. Клетки осаждали и промывали  $3 \times$  PBS/BSA с последующим добавлением 10 мкг/мл PE-меченного вторичного козьего антитела против человеческого IgG и инкубировали на льду в течение еще 60 мин. Клетки центрифугировали и промывали  $3 \times$  PBS/BSA и ресуспендировали в 125 мкл PBS/BSA. Флуоресценцию анализировали проточной цитометрией с использованием процента насыщенного флуоресцентного сигнала для определения процента связывания и последующего расчета кажущейся  $K_D$ . Кривые связывания рекомбинантных человеческих антител к CD228 показаны на фиг. 13 и  $K_D$  для cL49ec (химерный L49 с мутацией S239C в константной области легкой цепи), hL49 HALA G1, hL49 HALB G1 и hL49 HALC G1 показаны в таблице 8. Антитело под названием «HALC», «hL49», или «hL49-HALC», который включает тяжелую цепь «HA» и легкую цепь «LC», был выбран для использования во всех других экспериментах.

Таблица 8

 $K_D$  гуманизированных анти-CD228 антител

	cL49ec	hL49 HALA G1	hL49 HALB G1	hL49 HALC G1
$K_D$ (нМ)	5,8	5,3	7,8	4,0

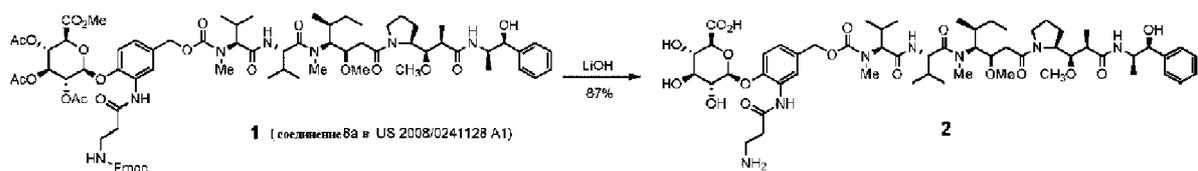
Пример 5: конъюгаты hL49-HALC антитело-лекарственное средство с различными линкерами лекарственного средства

#### А. Конъюгирование антител и лекарственного средства

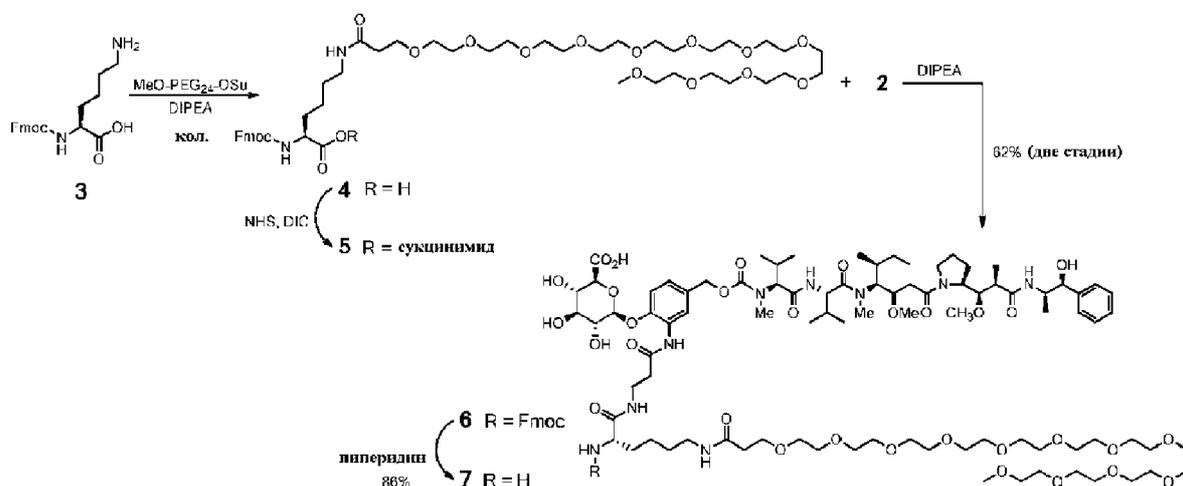
[0262] hL49-HALC конъюгировали с 8 нагрузками либо MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE, ауристатином T, тубулизином M, либо липофильным MMAF, с 2 нагрузками MC-VC-MMAE или MDpr-gluc-MMAE, или 2 нагрузками PBD. Метод конъюгации описан в публикации заявки на патент США 2018/0092984. Все коммерчески доступные безводные растворители использовали без дополнительной очистки. ПЭГ реагенты получали от Quanta BioDesign (Powell, Ohio). Аналитическую тонкослойную хроматографию выполняли на алюминиевых пластинах с силикагелем 60 F254 (EMD Chemicals, Gibbstown, N.J.). Радиальную хроматографию выполняли на аппарате Chromatotron (Harris Research, Palo

Alto, Calif.). Колоночную хроматографию выполняли на системе флэш-очистки Biotage Isolera One (Charlotte, N.C.). Аналитическую ВЭЖХ проводили на системе для подачи растворителя Varian ProStar 210, конфигурированной с детектором Varian ProStar 330 PDA. Образцы элюировали с колонки с обращенной фазой C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 мкм, 80 Å. Подкисленная подвижная фаза состояла из ацетонитрила и воды, которые содержали 0,05% трифторуксусной кислоты или 0,1% муравьиной кислоты (указано для каждого соединения). Соединения элюировали в линейном градиенте подкисленного ацетонитрила от 5% на 1 мин после инъектирования до 95% на 11 мин с последующим изократическим элюированием 95% ацетонитрилом до 15 мин (скорость потока=1,0 мл/мин). Анализ ЖХ-МС выполняли на двух различных системах. Система 1 для ЖХ-МС состояла из масс-спектрометра ZMD Micromass, подключенного к прибору для ВЭЖХ HP Agilent 1100, оборудованному обращенно-фазовой колонкой C12 Phenomenex Synergi 2,0×150 мм, 4 мкм, 80 Å. Подкисленный элюент состоял из линейного градиента ацетонитрила от 5% до 95% в 0,1%-ной водной муравьиной кислоте в течение 10 мин с последующим изократическим элюированием 95% ацетонитрилом в течение 5 мин (скорость потока=0,4 мл/мин). Система ЖХ-МС 2 состояла из масс-спектрометра Waters Xevo G2 Tof, соединенного с модулем разделения Waters 2695 с фотодиодным детектором на матрице Waters 2996; колонка, подвижные фазы, градиент и скорость потока были такими же, как для системы ЖХ-МС 1. UPLC-MS выполняли на масс-детекторе Waters SQ, подключенном к Acquity Ultra Performance LC, снабженному Acquity UPLC BEH C18 2×50 колонкой с обращенной фазой 1,7 мкм. Подкисленная подвижная фаза (0,1% муравьиной кислоты) состояла из градиента от 3% ацетонитрила/97% воды до 100% ацетонитрила (скорость потока=0,5 мл/мин). Препаративную ВЭЖХ выполняли на системе для подачи растворителя Varian ProStar 210, конфигурированной с детектором Varian ProStar 330 PDA. Продукты очищали на колонке с обращенной фазой C12 Phenomenex Synergi 10,0×250 мм, 4 мкм, 80 Å, элюируя 0,1% муравьиной кислотой в воде (растворитель А) и 0,1% муравьиной кислотой в ацетонитриле (растворитель В). Метод очистки состоял из следующего градиента растворителя А к растворителю В: 90:10 от 0 до 5 мин; С 90:10 до 10:90 от 5 до 80 мин; с последующим изократическим элюированием 10:90 в течение 5 мин. Скорость потока составляла 4,6 мл/мин при мониторинге при 254 нм. Препаративную ВЭЖХ для соединений на схемах 3 и 4 проводили с 0,1% трифторуксусной кислотой в обеих подвижных фазах вместо 0,1% муравьиной кислоты.

### Схема 1.



метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил) фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (2): в колбу, содержащую известное (соединение 8a в US 2008/0241128 A1) промежуточное соединение глюкуронид-ММАЕ 2 (40 мг, 26,8 мкмоль) добавляли 0,9 мл метанола и 0,9 мл тетрагидрофурана. Затем раствор охлаждали на ледяной бане и по каплям добавляли гидроксида лития моногидрат (6,8 мг, 161 мкмоль) в виде раствора в 0,9 мл воды. Затем реакционную смесь перемешивали на льду в течение 1,5 ч, за это время результаты ЖХ/МС показали полное превращение в продукт. Затем добавляли ледяную уксусную кислоту (9,2 мкл, 161 мкмоль) и концентрировали реакционную смесь досуха. Препаративная ВЭЖХ дала промежуточное соединение глюкуронид-ММАЕ-линкер 3 с полным снятием защиты (26 мг, 87%) в виде маслянистого остатка. Аналитическая ВЭЖХ (0,1% муравьиная кислота):  $t_R$  9,3 мин. Система ЖХ-МС 1:  $t_R$  11,10 мин,  $m/z$  (ES<sup>+</sup>) найдено 1130,48 (M+H)<sup>+</sup>,  $m/z$  (ES<sup>-</sup>) найдено 1128,63 (M-H)<sup>-</sup>.



[0264] (S)-44-((((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азапентатетраконтан-45-овая кислота (4): в колбу, содержащую N<sub>α</sub>-Fmoc-лизин 3 (59 мг, 161 мкмоль), добавляли 2,9 мл безводного дихлорметана, и затем метокси-PEG12-OSu (100 мг, 146 мкмоль). Затем добавляли DIPEA (127 мкл, 730 мкмоль) и реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре с последующей ТСХ и ЖХ/МС. Через 2 ч результаты ЖХ/МС показали превращение в продукт. Реакционный раствор разбавляли дихлорметаном и очищали хроматографией на силикагеле. Стационарную фазу элюировали дихлорметаном с возрастающими количествами метанола (от 0% до 20%) с получением желаемого продукта 4 (153 мг, 112%). UPLC-MS:  $t_R$  1,77 мин,  $m/z$  (ES<sup>+</sup>) найдено 939,58 (M+H)<sup>+</sup>.

[0265] (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 44-((((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-38-оксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39-азапентатетраконтан-45-оат (5): в колбу загружали N<sub>α</sub>-Fmoc-лизин (PEG12)-ОН 4 (153 мг, 163 мкмоль) и 1,6 мл безводного тетрагидрофурана. Добавляли N-гидроксисукцинимид (28 мг, 245 мкмоль), и затем диизопропилкарбодиимид (38 мкл, 245 мкмоль). Реакционную

смесь герметично закрывали в атмосфере азота и перемешивали в течение ночи. Неочищенную реакционную смесь разбавляли дихлорметаном и очищали на силикагеле, элюируя дихлорметаном с возрастающими количествами метанола (от 0% до 10%) с получением желаемого активированного сложного эфира 5 (155 мг). Вещество переносили без дальнейшей характеристики. UPLC-MS:  $t_R$  1,92 мин,  $m/z$  ( $ES^+$ ) найдено 1036,48 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

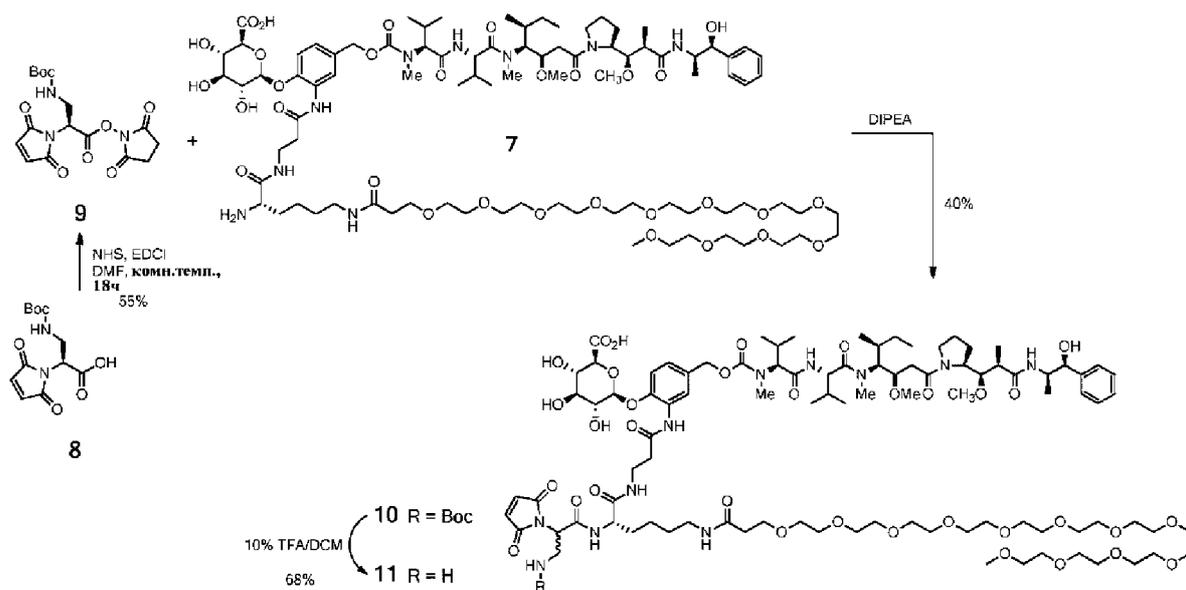
[0266] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-(((9H-флуорен-9-ил)метокси)карбонил)амино)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-дiazанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-сек-бутил) -12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (6): промежуточное соединение глюкуронид-ММАЕ-линкер 2 (92 мг, 81 мкмоль) со снятой защитой растворяли в безводном диметилформамиде (1,6 мл) и добавляли в колбу, содержащую N<sub>α</sub>-Fmoc-лизин(PEG12)-OSu 5 (101 мг, 97 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (70 мкл, 405 мкмоль), затем реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре. Через 4,5 ч результаты ЖХ-МС показали превращение в продукт. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением промежуточного соединения 6 Fmoc-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (111 мг, 62% за две стадии) в виде маслянистого остатка. UPLC-MS:  $t_R$  2,01 мин,  $m/z$  ( $ES^+$ ) найдено 2050,92 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

[0267] (2S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-амино-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-дiazанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-сек-бутил) -12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (7): промежуточное соединение 6 Fmoc-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (111 мг, 54 мкмоль) растворяли в 2,2 мл безводного диметилформамида с последующим добавлением 0,5 мл пиперидина. Реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота в течение 3 ч и затем концентрировали досуха. Продукт очищали препаративной ВЭЖХ с получением промежуточного соединения 7 H-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ (85 мг, 86%) в виде маслянистого остатка. UPLC-MS:  $t_R$  1,50 мин,  $m/z$  ( $ES^+$ ) найдено 1829,31 ( $M+H$ )<sup>+</sup>.

[0268] (S)-2,5-диоксопирролидин-1-ил 3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил) пропаноат (9): (S)-N<sub>α</sub>-малеимино-N<sub>β</sub>-Вос-диаминопропановая кислота 8 (Nature Biotechnology, 2014, 32, 1059-1062) (400 мг, 1,4 ммоль) растворяли в 7 мл безводного диметилформамида. Добавляли N-гидроксисукцинимид (178 мг, 1,5 ммоль), и затем 1-этил-3-(3-диметиламинопропил)карбодимид (298 мг, 1,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере азота в течение 3 ч. Водную обработку проводили

разбавлением 120 мл воды; затем водный слой трижды экстрагировали 60 мл этилацетата. Затем объединенный органический слой промывали насыщенным раствором соли, сушили над сульфатом натрия и концентрировали досуха. Продукт очищали флэш-хроматографией на колонке, элюируя смесью гексан:этилацетат (от 50:50 до 0:100) с получением NHS-эфира (S)-N<sub>α</sub>-малеимида-N<sub>β</sub>-Вос-диаминопропановой кислоты [MDPr(Вос)-OSu] 9 (297 мг, 55%). Система ЖХ-МС 1: t<sub>R</sub> 12,23 мин, m/z (ES +) найдено 282,0599 (M+H-Вос группа)<sup>+</sup>. Система ЖХ-МС 2: t<sub>R</sub> 11,30 мин, m/z (ES +) найдено 2580,2515 (M+H)<sup>+</sup>.

Схема 3.



[0269] (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((S)-3-((трет-бутоксикарбонил)амино)-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-39,46-дiazанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-сек-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксопропил) пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (10): MDPr(Вос)-OSu 9 (20 мг, 53 мкмоль) растворяли в 2,2 мл безводного диметилформамида и добавляли в колбу, содержащую промежуточное соединение линкер H-Lys(PEG12)-глюкуронид-MMAE 7 (86 мг, 44 мкмоль). Затем добавляли диизопропилэтиламин (15 мкл, 88 мкмоль), затем реакционную смесь перемешивали в атмосфере азота при комнатной температуре в течение 2,5 ч. Реакцию гасили 15 мкл ледяной уксусной кислоты и очищали препаративной ВЭЖХ с получением промежуточного соединения 10 MDPr(Вос)-Lys(PEG12)-глюкуронид-MMAE (37 мг, 40%) в виде смеси диастереомеров. Диастереомеры разделяли хиральной хроматографией. UPLC-MS: t<sub>R</sub> 1,84 мин, m/z (ES +) найдено 2095,44 (M+H)<sup>+</sup>.

[0270] (2R/S,3S,4S,5R,6S)-6-(2-((S)-44-((R)-3-амино-2-(2,5-диоксо-2,5-дигидро-1H-пиррол-1-ил)пропанамидо)-38,45-диоксо-2,5,8,11,14,17,20,23,26,29,32,35-додекаокса-

39,46- диазанонатетраконтанамидо)-4-((5S,8S,11S,12R)-11-((S)-сек-бутил)-12-(2-((S)-2-((1R,2R)-3-(((1S,2R)-1-гидрокси-1-фенилпропан-2-ил)амино)-1-метокси-2-метил-3-оксипропил)пирролидин-1-ил)-2-оксоэтил)-5,8-диизопропил-4,10-диметил-3,6,9-триоксо-2,13-диокса-4,7,10-триазатетрадецил)фенокси)-3,4,5-тригидрокситетрагидро-2H-пиран-2-карбоновая кислота (11): колбу, содержащую промежуточное соединение MDrg(Woc)-Lys(PEG12)-глюкуронид-ММАЕ 10 (34 мг, 16 мкмоль), охлаждали до 0°C на ледяной бане в атмосфере азота. По каплям добавляли раствор 10% трифторуксусной кислоты в дихлорметане (0,8 мл). Затем реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 ч, за это время результаты ЖХ-МС показали полное снятие Woc-защиты. Затем реакционную смесь концентрировали до неочищенного остатка и очищали препаративной ВЭЖХ с получением линкера MDrg-Lys (PEG12)-глюкуронид-ММАЕ 11 (22 мг, 68%). UPLC-MS:  $t_R$  1,50 мин,  $m/z$  (ES<sup>+</sup>) найдено 1995,18 (M+H)<sup>+</sup>.

[271] Соединение 11 конъюгировали через его межцепочечные тиолы с анти-CD228 антителом при средней лекарственной нагрузке 8 лекарственных средств на антитело с использованием способов, известных в данной области (см., например, патент США № 7659241).

#### В. Цитотоксичность ADC hL49-HALC *in vitro*

[272] Опухолевые клетки инкубировали с каждым конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC) в течение 96-144 ч при 37°C. Несвязанный (обозначенный h00 или IgG) ADC использовали в качестве отрицательного контроля. Жизнеспособность клеток измеряли с помощью Cell Titer Glo в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресцентный сигнал измеряли на флуоресцентном планшетном ридере Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Данные нормализовали к необработанным клеткам, и значения  $\times 50$  рассчитывали с использованием программного обеспечения Graph Pad. Результаты представлены в таблице 9 в виде IC<sub>50</sub>, концентрация соединения, необходимая для снижения жизнеспособности на 50% по сравнению с клетками, обработанными носителем (контроль=100%). ADC hL49 достигают однозначных значений IC<sub>50</sub> в нг/мл на панели клеточных линий с экспрессией CD228 в диапазоне от 16000 до 450000.

IC<sub>50</sub> конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство против различных опухолевых клеток

Антитело	Линкер лекарственного средства	Нагрузка лекарственным средством	Клеточные линии меланомы (# молекул CD228 на клетку)					
			SKMEL28 (450000)	SKMEL5 (134000)	Colo853 (92000)	A2058 (51000)	IGR37 (24000)	A375 (16000)
hL49-HALC	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE	8	2,8	2,5	3,7	7,3	13,7	14,9
hL49-HALC	Ауристатин Т	8	0,4	0,2	0,7	0,5	1,3	0,5
hL49-HALC	Тубулизин М	8	3	0,4	2	1	16	2
hL49-HALC	Липофильный MMAF	8	0,3	0,05	0,2	0,3	2,0	0,7
hL49-HALC	PBD	2	32	14	68	5	52	12
hL49-HALC	MC-VC-MMAE	4	5,9	3,9	8,5	1823	223	1556
hL49-HALC	MDpr-gluc-MMAE	4	1,4	1,8	2,0	7,5	14,7	11,5

[0273] В аналогичных экспериментах определяли процент жизнеспособных клеток после обработки различными концентрациями hL49, конъюгированного с линкерами различных лекарственных средств с различными количествами MMAE. Полученный процент жизнеспособных клеток для клеток A2058, обработанных hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), hL49-MP-gluc-MMAE (4), hL49-MP-gluc-MMAE (8) при различных концентрациях конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) показаны на фиг. 14А. MP-gluc-MMAE с 8 нагрузками превосходит MP-gluc-MMAE с 4 нагрузками и линкер лекарственного средства МС-val-cit-РАВ-MMAE *in vitro*. MP-gluc-MMAE с 4 нагрузками превосходит линкер лекарственного средства МС-val-cit-РАВ-MMAE *in vitro*, несмотря на то, что он содержит идентичное количество того же лекарственного средства (MMAE).

[0274] Результирующий процент жизнеспособных клеток для клеток A375, обработанных hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), hL49-MP-gluc-MMAE (4), hL49-MP-gluc-MMAE (8) при различных концентрациях конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) показаны на фиг. 14В. MP-gluc-MMAE с 8 нагрузками превосходит MP-gluc-MMAE с 4 нагрузками и линкер лекарственного средства МС-val-cit-РАВ-MMAE *in vitro*. MP-gluc-MMAE с 4 нагрузками превосходит линкер лекарственного средства МС-val-cit-РАВ-MMAE *in vitro*, несмотря на то, что он содержит идентичное количество того же лекарственного средства (MMAE).

[0275] Результирующий процент жизнеспособных клеток для клеток Colo-853, обработанных hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), hL49-MP-gluc-MMAE (4), hL49-MP-gluc-MMAE (8) при различных концентрациях конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC) показаны на фиг. 14С. MP-gluc-MMAE с 8 нагрузками превосходит MP-gluc-MMAE с 4 нагрузками и линкер лекарственного средства МС-val-cit-РАВ-MMAE *in vitro*.

С. Активность анти-CD228 ADC с различными линкерами лекарственных средств *in vivo*

[0276] Бестимусным мышам (nu/nu) (7-8 животных в группе) имплантировали  $5 \times 10^6$  культивированных опухолевых клеток A2058 в 25% матригеле). Дозирование с использованием 1 мг/кг, 3 мг/кг или 6 мг/кг тестируемого ADC начинали, когда опухоли достигали 100 мм<sup>3</sup> (каждые 4 дня 4 внутрибрюшинных инъекции). Объем опухолей определяли с помощью штангенциркуля, и животных подвергали эвтаназии, когда объем опухолей достигал 800-1000 мм<sup>3</sup>. Определение среднего объема опухолей продолжали для каждой группы до тех пор, пока одно или более животных не были подвергнуты эвтаназии. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетом по уходу и использованию животных в виварии, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными.

[277] Полученные в результате объемы опухолей во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг hL49, hL49-ауристин Т (8), hL49-липофильный MMAF (8), hL49-тубулизин М (8) и hL49-MDpr-ПЭГ(12)-gluc-MMAЭ (8) показаны на фиг. 15. Несмотря на превосходную эффективность *in vitro*, ADC с ауристином Т и липофильным MMAF менее активны, чем hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-

ММАЕ (8) *in vivo*.

[0278] Полученные объемы опухолей во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 6 мг/кг IgG-MDpr-gluc-MMAE (2), 6 мг/кг hL49ec-MDpr-gluc-MMAE (2), 3 мг/кг hL49ec-MDpr-gluc-MMAE (2), 1 мг/кг hL49ec-MDpr-gluc-MMAE (2), 3 мг/кг IgG-MDpr-gluc-MMAE (4), 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-MMAE (4) и 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 16. ММАЕ с 8 нагрузками и ПЭГ превосходит ММАЕ с 2 или 4 нагрузками *in vivo*.

[0279] Полученные объемы опухолей во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), 3 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), 1 мг/кг hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) и 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 17. hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) в дозе 3 мг/кг превосходит hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) в дозе 1 мг/кг или hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4) в каждой использованной дозе *in vivo*.

[0280] Полученные объемы опухолей во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), 3 мг/кг hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4), 1 мг/кг hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) и 3 мг/кг hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 18. hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) в дозе 3 мг/кг превосходит hL49-MDpr-gluc-MMAE (8) в дозе 1 мг/кг или hL49-МС-val-cit-РАВ-MMAE (4) в каждой использованной дозе *in vivo*.

Пример 6: сравнение ADC с тубулизином М и MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE *in vivo*

[0281] hL49, конъюгированное с тубулизином М или MDpr-PEG (12)-gluc-MMAE, показало более высокую активность по сравнению с другими ADC на клетках A2058, поэтому эти ADC были выбраны для дальнейшей оценки в различных дозах и с разными типами опухолевых клеток.

[0282] Бестимусным (nu/nu) мышам (6-8 животных в группе) прививали 2,5 мкл культивированных A2058,  $1 \times 10^6$  SK-MEL-5,  $1 \times 10^5$  IGR-37,  $1 \times 10^6$  Colo-853, или  $1 \times 10^6$  опухолевых клеток HPAF-II в 25% матригеле. Мышам NOD/SCID/gc KO (NSG) прививали  $5 \times 10^5$  культивированных опухолевых клеток MDA-MB-231. Для PDX моделей модель плоскоклеточного NSCLC LU0697 воспроизводили на мышях NOD/SCID, и модели NSCLC аденокарциномы LU5200 воспроизводили на мышях BALB/c Nude (3 животных/группа). Тестирование ADC в дозах 0,3 мг/кг, 0,5 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг начинали, когда опухоли достигали размера примерно 100 мм<sup>3</sup> (однократная внутривенная инъекция). Объем опухолей определяли с помощью штангенциркуля, и животных подвергали эвтаназии, когда объем опухолей достигал 1000 мм<sup>3</sup>. Исследования PDX были прекращены через 28 суток после введения последней дозы, независимо от размера опухолей. Определение среднего объема опухолей продолжали для каждой группы до тех пор, пока одно или более животных не подвергали эвтаназии. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетом по уходу и использованию животных в виварии, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными.

[0283] Полученные объемы опухолей A2058 во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3 мг/кг IgG-тубулизин М (8), 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-тубулизин М (8), или 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 19. hL49-тубулизин М и hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE имеют сходные показатели полного ответа (CR) в дозе 3 мг/кг, но hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE превосходит в дозе 1 мг/кг.

[0284] Полученные объемы опухолей SK-MEL-5 во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), 3 мг/кг IgG-тубулизин М (8), 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-тубулизин М (8) или 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 20. hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE превосходит hL49-тубулизин М в отношении опухолей SK-MEL-5.

[0285] Полученные объемы опухолей IGR-37 во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-тубулизина М (8), или 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 21. hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE превосходит hL49-тубулизин М в отношении опухолей IGR-37.

[0286] Полученные объемы опухолей Colo-853 во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 0,3, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) или 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 22. Опухоли Colo-853 чувствительны к обработке hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

[0287] Полученные объемы опухолей LU0697 на PDX модели плоскоклеточного NSCLC во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) или 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 23. PDX модель LU0697 плоскоклеточных опухолей NSCLC чувствительна к обработке hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

[0288] Полученные объемы LU0697 опухолей на PDX модели аденокарциномы NSCLC во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) или 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 24. LU0697 опухоли на PDX модели аденокарциномы NSCLC чувствительны к обработке hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

[0289] Полученные объемы опухолей MDA-MB-231 TNBC во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 0,5 мг/кг или 1 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), или 0,5 мг/кг или 1 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 25. Опухоли MDA-MB-231 TNBC чувствительны к обработке hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

[0290] Полученные объемы опухолей HPAF-II во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг IgG-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), или 0,3 мг/кг, 1 мг/кг или 3 мг/кг hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) показаны на фиг. 26. Опухоли HPAF-II чувствительны к обработке hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

Пример 7: клиническое испытание на мышах с тройным негативным раком

молочной железы

[0291] Процентное изменение объема опухолей в ответ на лечение hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) оценивали на 22 различных PDX моделях тройного негативного рака молочной железы. Мышам NCr или Nude имплантировали количество опухолевых клеток, эмпирически определенное для каждой модели. Введение hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) в дозе 3 мг/кг начинали, когда опухоли достигали размера примерно 150-300 мм<sup>3</sup>. Объем опухолей определяли с помощью штангенциркуля. Процентное изменение объема опухолей для каждой мыши рассчитывали либо во время наилучшего ответа, либо через 7 суток после введения дозы hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8), и результаты приведены на фиг. 27. Обработка hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) давала 60% ответ, при этом 31% животных достигли частичного ответа и 29% животных достигли полного ответа. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетом по уходу и использованию животных в виварии, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными.

Пример 7-1: полученные от пациентов модели ксенотрансплантатов различных опухолей, экспрессирующих CD228

[0292] Дополнительные эксперименты проводили, как описано в примере 7, для оценки способности hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) ингибировать опухолевый рост при различных злокачественных опухолях, экспрессирующих CD228. Полученные от пациентов модели ксенотрансплантата были созданы выделением опухолей у 60 пациентов (тройной негативный рак молочной железы (TNBC) = 22 пациента, мезотелиома=3 пациента и немелкоклеточный рак легкого (NSCLC) = 35 пациентов) и припивкой опухолей мышам с иммунодефицитом, как описано в примере 7. После имплантации мышей обрабатывали однократной дозой hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8). Кровь отбирали у мышей через 48 ч после обработки hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) и использовали для фармакокинетического анализа. Процент ингибирования роста опухоли (процент TGI (%)) и процентное изменение объема опухолей от исходного уровня до самого высокого ответа (процентное изменение Tvol (%)) приведены на фиг. 36А и фиг. 36В соответственно. Как видно, введение однократной дозы hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) оказывало противоопухолевую активность на различных моделях опухолей.

Пример 8: оценка эффекторных функций антител *in vitro*

[0293] Активность антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) оценивали с помощью стандартного анализа высвобождения <sup>51</sup>Cr. Вкратце, опухолевые клетки метили 100 мкКи Na<sup>51</sup>CrO<sub>4</sub>, промывали и предварительно инкубировали с тестируемыми ADC перед добавлением эффекторных (естественных клеток-киллеров, NK). NK (CD16<sup>+</sup> CD56<sup>+</sup> клетки получали из неадгезировавших мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC), полученных от нормальных доноров FcγRIIIA 158V/V (Lifeblood, Memphis, TN), с иммуномагнитными гранулами (EasySep, StemCell Technologies, Vancouver, BC, Канада). Жизнеспособные NK-клетки добавляли к клеткам-

мишеням при соотношении эффекторных клеток к клеткам-мишеням 10:1. В данном анализе человеческий IgG1к (Ansell, Buaport, MN) использовали в качестве отрицательного контроля. После 4 ч инкубации супернатанты собирали и сушили в течение ночи на планшетах Luma. Затем детектировали гамма-излучение, испускаемое лизированными клетками, с использованием планшетного сцинтилляционного и люминесцентного счетчика TopCount (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts). % специфического лизиса (активность ADCC) для двух пациентов показан на фиг.28А-28В. hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (hL49-5088) имеет более низкую ADCC активность по сравнению с mAb к hL49.

Пример 9: фармакокинетический анализ на мышах и крысах

[0294] Бестимусным мышам внутривенно вводили hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE или cL235-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE, и крысам Sprague-Dawley внутривенно вводили hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE. Концентрации ADC в плазме измеряли во времени с помощью Tab ELISA с античеловеческим антителом в качестве антитела захвата. Результаты показаны на фиг. 29А (мыши) и фиг. 29Б (крысы). Результирующие параметры ФК показаны в таблице 10 (мыши) и таблице 11 (крысы).

Таблица 10

Фармакокинетические (ПК) параметры hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE у мышей

AUC <sub>inf</sub> /дозу	C <sub>max</sub> /дозу	T <sub>max</sub>	Период полураспада
(сутки*кг*мкг/мл/мг)	(кг*мкг/мл/мг)	(сутки)	(сутки)
41	8,8	0,25	4,7
50	8,1	1,0	4,4
63	13,3	0,25	5,1

Таблица 11

Фармакокинетические (ПК) параметры hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE у крыс

hL49-5088(8)			
AUC <sub>inf</sub> /дозу	C <sub>max</sub> /дозу	T <sub>max</sub>	Период полураспада
(сутки*кг*мкг/мл/мг)	(кг*мкг/мл/мг)	(сутки)	(сутки)
41	8,8	0,25	4,7
50	8,1	1,0	4,4
63	13,3	0,25	5,1

Пример 10: дополнительные анти-CD228 антитела

[0295] Дополнительные анти-CD228 антитела конъюгировали с MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE. Эти дополнительные анти-CD228 антитела (обозначенные cL235 (см. Rolland Y., Pigment Cell Melanoma Res., 2009, 22: 86-98) и Ab1-9) имеют аффинность связывания, аналогичную таковой для hL49, в отличие от коммерческих антител, приведенных в таблице 2 (Santa Cruz, номер по каталогу № 271633, R&D, номер по каталогу № 893416, и

Био, номер по каталогу 363101).

А. Цитотоксичность *in vitro*

[0296] Опухолевые клетки инкубировали с конъюгатами анти-CD228 антитело-лекарственное средство (ADC) в течение 96-144 ч при 37°C. Несвязывающийся (h00-5088 (8)) ADC использовали в качестве отрицательного контроля. Жизнеспособность клеток оценивали с использованием Cell Titer Glo в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресцентный сигнал измеряли на флуоресцентном планшетном ридере Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Данные нормализовали к необработанным клеткам, и значения  $\times 50$  рассчитывали с использованием программного обеспечения Graph Pad. Результаты представлены в таблице 12 в виде значений  $IC_{50}$ , концентрация соединения, необходимая для снижения жизнеспособности на 50% по сравнению с клетками, обработанными носителем (контроль=100%). Процент жизнеспособных клеток, остающихся при максимальной дозе, показан в таблице 13.

Таблица 12

$IC_{50}$  конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство на различных опухолевых клетках

Клеточная линия	# CD228	hL4 9	cL23 5	Ab 1	Ab 2	Ab 3	Ab 4	Ab5	Ab6	Ab7	Ab8	Ab9
A2058	51K	2	277	38	10	54	9	47	786	62	1142	297
A375	16K	9	>200 0	233	>20 00	>20 00	>20 00	179	>200 0	144	547	203
Colo853	92K	1	32	10	2	5	1	11	28	11	1	0,4
IGR37	24K	8	>200 0	325	>20 00	837	169 4	350	>200 0	322	1448	1738
SKMel5	134K	1	71	5	2	3	2	5	17	6	32	2
SKMel28	450K	2	13	3	2	2	2	5	7	4	8	1

Таблица 13

Процент оставшихся жизнеспособных клеток при использовании максимальной дозы конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство на различных опухолевых клетках

Клеточная линия	# CD228	hL4 9	cL23 5	Ab 1	Ab 2	Ab 3	Ab 4	Ab 5	Ab6	Ab7	Ab8	Ab9
A2058	51,000	4	26	7	31	15	27	9	34	19	40	40
A375	16,000	13	62	25	59	62	65	29	54	25	22	22
Colo853	92,000	24	33	19	31	26	35	25	39	29	20	21
IGR37	24,000	14	65	22	59	39	53	29	51	35	43	46
SKMel5	134,000	13	16	11	22	18	21	12	18	14	9	16
SKMel28	450,000	28	21	24	24	24	24	21	24	22	27	31

#### В. Активность дополнительных анти-CD228 ADC in vivo

[0297] Бестимусным мышам (nu/nu) (6 животных в группе) прививали  $1 \times 10^6$  культивированных опухолевых клеток A375,  $1 \times 10^5$  IGR37 или  $2,5 \times 10^5$  A2058 в 25% матригеле). Введение тестируемого ADC в 1 мг/кг (A2058) или 3 мг/кг начинали, когда опухоли достигали размера  $100 \text{ мм}^3$  (однократные внутрибрюшинные инъекции). Объем опухолей определяли с помощью штангенциркуля, и животных подвергали эвтаназии, когда объем опухолей достигал  $\sim 800 \text{ мм}^3$ . Графики среднего объема опухолей продолжали для каждой группы до тех пор, пока одно или более животных не были умерщвлены. Все процедуры с животными выполняли в соответствии с протоколом, утвержденным Комитетом по уходу и использованию животных в виварии, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации ухода за лабораторными животными.

[0298] Полученные в результате объемы опухолей A2058 во временной динамике для необработанных мышей и мышей, обработанных различными антителами, приведены на фиг. 30А. На фиг. 30В показан процент животных с <4-кратным увеличением опухолей во временной динамике для каждого условия обработки. Количество полных ответов (CR) и среднее время увеличения опухоли в четыре раза для каждого ADC и каждой клеточной линии показаны в таблице 14.

Таблица 14

#### Ответ in vivo на дополнительные анти-CD228 ADC

	A375		IGR37		A2058	
Антитело	CRs	Среднее	CRs	Среднее	CRs	Среднее

		увеличение опухолей в четыре раза		увеличение опухолей в четыре раза		увеличение опухолей в четыре раза
Без обработки	0/6	25 суток	0/6	24 суток	0/6	27 суток
h00	0/6	34 суток	1/6	40 суток	0/6	22 суток
hL49	3/6	-	1/6	51 суток	3/6	-
cL235	0/6	42 суток	0/6	45 суток	0/6	50 суток
CD228Ab1	5/6	-	2/6	-	4/6	-
CD228Ab2	2/6	50 суток	0/6	38 суток	2/6	-
CD228Ab3	2/6	45 суток	1/6	49 суток	0/6	34 суток
CD228Ab4	3/6	-	1/6	55 суток	0/6	-

Пример 11: расщепление линкера и оборот CD228

[0299] Скорость расщепления конъюгата во временной динамике исследовали с помощью флуоресцентного анализа. Флуоресцентный фрагмент AF647 конъюгировали с анти-CD228 антителом hL49 либо непосредственно с 8 природными цистеинами, либо через глюкуронидный линкер. Кроме того, через остатки лизина добавляли гасящий реагент, сукцинимидиловый эфир Tide Quencher 5WS (TQ5WS), из расчета примерно 4 на антитело. Когда и гаситель, и AF647 присоединяются к антителу, то флуоресценция гасится. Либо отщепление AF647 от антитела, либо деградация антитела приводит к высвобождению молекулы AF647 из гасителя и последующему увеличению флуоресценции. Как в клетках A375 (фиг. 31A), так и в клетках Colo-853 (фиг. 31B) конъюгация AF647 с антителом через глюкуронидный линкер приводит к более быстрому увеличению флуоресцентной активности, чем прямая конъюгация AF647 с антителом.

[0300] Клетки A375 обрабатывали антителами hL49, которые были конъюгированы с vcQF01, который состоит из TQ5WS, связанного с флуорофором Cy5 через линкер Val-Cit-PAВ в примерном соотношении 2 молекулы на антитело. Подобно реагенту, описанному в предыдущем разделе, Cy5 остается погашенным, когда он не поврежден на антителе, и будет флуоресцентным только тогда, когда он отщепляется от гасителя TQ5WS. Затем добавляли 2 мкг/мл hL49-vcQF01 и позволяли связываться с клетками. Для импульсной обработки меченые антитела hL49 промывали через 30 мин для удаления несвязавшихся меченых антител hL49. Для непрерывной обработки мечеными антителами к hL49 несвязанные меченые антитела к hL49 не вымывались из клеток. Как показано на фиг. 32, импульсная обработка приводила к быстрому плато в сигнале Cy5, тогда как непрерывное воздействие меченого hL49 приводило к устойчивому увеличению сигнала флуорофора Cy5. Это демонстрирует, что дополнительный CD228 добавляется к поверхности клетки в течение 24 ч, который затем может связываться с меченым антителом hL49, интернализироваться в клетке и расщепляться с высвобождением Cy5. В дальнейших

экспериментах влияние синтеза белка на связывание CD228 флуоресцентно-меченными антителами hL49 исследовали сравнением интенсивности флуоресценции на клетку во временной динамике в присутствии и в отсутствии циклогексимида. Циклогексимид (CHX) использовали для ингибирования синтеза белка. Увеличение сигнала флуоресценции во временной динамике происходило в присутствии циклогексимида как в Colo-853 (фиг. 33А), так и в A375 (фиг. 33В), но было снижено по сравнению с клетками, не обработанными циклогексимидом. Данный результат свидетельствует о том, что CD228 возвращается на поверхность клетки даже в отсутствии синтеза белка. В совокупности эти эксперименты демонстрируют, что CD228 как рециркулируется, так и пополняется на поверхности клетки, что способствует активности конъюгата антитело-лекарственное средство.

#### Пример 12: pH-зависимое связывание ADC

[0301] Способность различных анти-CD228 антител ADC связываться с CD228 оценивали при значениях pH в диапазоне от 4 до 7,5 с использованием стандартного протокола ELISA. Вкратце, 100 нг человеческого CD228 (R&D Systems Custom02; лот DCWR021505A) или BSA (Sigma; номер по каталогу № A7030-100G) разбавляли PBS и добавляли в каждую лунку на ночь при 4°C. Затем планшеты трижды промывали PBS-Т (EMD Millipore; номер по каталогу 5246531EA). После промывки планшеты блокировали 3% (мас./об.) BSA в PBS-Т в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем удаляли избыток блокирующего буфера и добавляли первичное антитело в 3-кратных разведениях в буфере для разбавления (0,15 М цитрат-фосфатный буфер, pH 4,0-7,5), начиная с концентрации антитела 60 нМ. После инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре планшеты промывали 3 раза и затем инкубировали с вторичными антителами (конъюгированные с HRP козым антителом против человеческого IgG Fc, Jackson ImmunoResearch код # 109-035-098) в PBS-Т с 1% BSA. После инкубации в течение 30 мин при комнатной температуре планшеты промывали 3 раза. Затем в каждую лунку добавляли 100 мкл субстрата ТМВ (Life Technologies; № по каталогу 002023). После 10 мин инкубации при комнатной температуре в каждую лунку добавляли 100 мкл H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> для остановки реакции, планшеты закрывали прозрачной пленкой и считывали на Envision при 450 нМ. pH-зависимое связывание для hL49, cL235, CD228Ab1, CD228Ab2 и CD228Ab3, CD228Ab4 показано на фиг. 34А-34F. Полученная EC<sub>50</sub> для каждого ADC показана в таблице 15. hL49 представляет собой единственный ADC, который демонстрирует дифференциальное связывание в градиенте pH.

Таблица 15

EC<sub>50</sub> для каждого ADC в нМ

	hL49	cL235	CD228Ab1	CD228Ab2	CD228Ab3	CD228Ab4
pH 4	-	0,809	0,404	0,188	2,887	0,158
pH 4,55	-	0,727	0,295	0,158	0,194	0,150
pH 5,1	-	0,756	0,285	0,146	0,123	0,209

pH 5,6	21,820	0,740	0,254	0,196	0,162	0,223
pH 5,9	5,307	0,838	0,243	0,186	0,161	0,235
pH 6,3	2,963	0,749	0,285	0,202	0,166	0,217
pH 6,66	1,542	0,757	0,221	0,146	0,152	0,161
pH 7,1	1,099	0,724	0,238	0,140	0,196	0,170
pH 7,4	0,856	0,767	0,359	0,110	0,294	0,093
pH 7,5	1,178	0,694	0,294	0,169	0,415	0,148

Пример 13: Интернализация и катаболизм ADC

[0302] Различные дополнительные анти-CD228 антитела оценивали на предмет их способности интернализировать и катаболизировать флуоресцентный фрагмент AF647. Клетки A375 обрабатывали анти-CD228 антителами, которые были конъюгированы с QF01, который состоит из гасящего агента сукцинимидилового эфира Tide Quencher 5WS (TQ5WS), связанного с флуорофором Cy5 через глюкуронидный линкер (gluc) в примерном соотношении 2 молекулы на антитело. Cy5 остается погашенным, когда он не поврежден на антителе, и будет флуоресцентным только тогда, когда он будет отщеплен от гасителя TQ5WS. Меченые анти-CD228 антитела промывали через 30 мин для удаления несвязавшихся меченых анти-CD228 антител. Эти анти-CD228 антитела обладают аффинностью связывания, аналогичной аффинности hL49. Опухолевые клетки инкубировали с анти-CD228 антителами и проводили визуализационные анализы для определения интенсивности флуоресценции на клетку во временной динамике (фиг. 35А). Подобные эксперименты проводили с использованием hL49 или других анти-CD228 антител, конъюгированных с MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8). Через 24 ч для каждого ADC измеряли внутриклеточную концентрацию лекарственного средства (фиг. 35В). Эти эксперименты демонстрируют, что, несмотря на сходную аффинность связывания, некоторые антитела, такие как hL49, интернализуются быстрее и доставляют лекарственное средство в большей степени, чем другие антитела. Это предполагает, что hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE (8) может доставлять лекарственное средство к опухолевым клеткам более эффективно, чем другие ADC.

**ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ**

1. Выделенное анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи включает:

(I) CDR-H1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1;

(II) CDR-H2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; а также

(III) CDR-H3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и где вариабельная область легкой цепи включает:

(I) CDR-L1, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(II) CDR-L2, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; А также

(III) CDR-L3, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6.

2. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело является гуманизированным.

3. Гуманизированное анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 7, при условии, что положение H27 занято D, положение H30 занято T, положение H47 занято Y, положение H71 занято R, и положение H78 занято Y, и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 8, при условии, что положение L2 занято F, положение L36 занято Y, и положение L46 занято L.

4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.3, при дополнительном условии, что положение L28 занято D.

5. Гуманизированное анти-CD228 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, содержащую три CDR согласно системе нумерации Kabat C SEQ ID NO: 7, где положение H27 занято D, положение H30 занято T, положение H47 занято Y, положение H71 занято R, и положение H78 занято Y, и вариабельную область легкой цепи, содержащую три CDR согласно системе нумерации Kabat C SEQ ID NO: 8, где положение L2 занято F, положение L36 занято Y, и положение L46 занято L.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и вариабельная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где вариабельная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность,

имеющую по меньшей мере 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи включает аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 98% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичность последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой антигенсвязывающий фрагмент.

11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.10, где антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, Fab'-SH, Fv, диатела, линейного антитела, и одноцепочечного фрагмента антитела.

12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой полноразмерное антитело.

13. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.12, где переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, и переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

14. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.13, где константная область тяжелой цепи имеет изотип IgG1.

15. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пп.13 или 14, где константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 17, и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18.

16. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пп.13 или 14, где константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека, которая имеет пониженное связывание с Fcγ рецептором по сравнению с природной константной областью человека.

17. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по пп.13 или 14, где константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 19 (S239C), и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 18.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17, конъюгированное с

цитотоксическим или цитостатическим агентом.

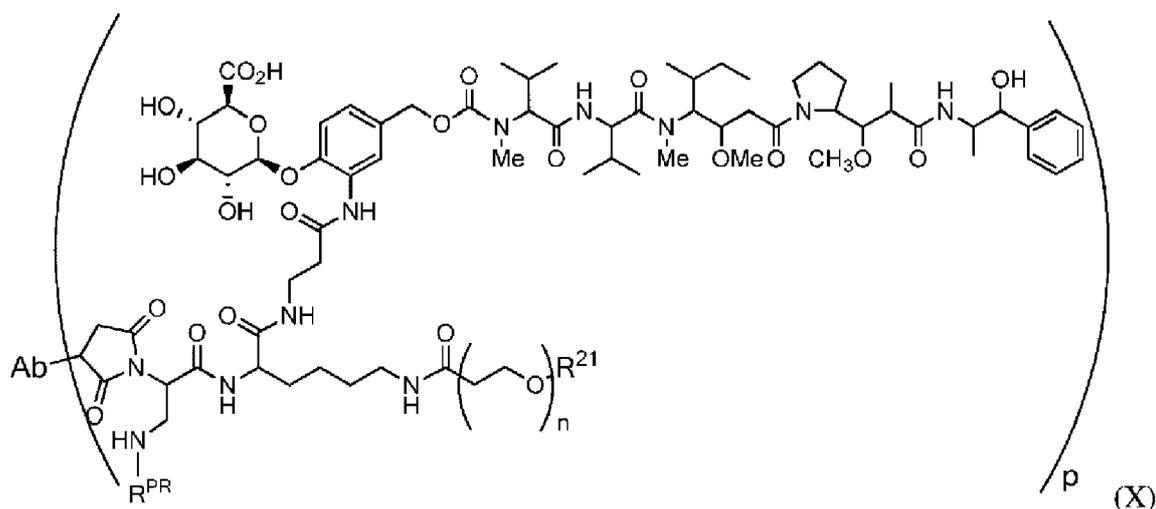
19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.18, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом через линкер.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.19, где линкер представляет собой линкер MDpr-PEG(12)-gluc.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.18-20, где цитотоксический или цитостатический агент представляет собой монометилауристин.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.21, где монометилауристин представляет собой монометилауристин E (MMAE).

23. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.22, где линкер присоединен к монометилауристину E с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего структуру:



где Ab представляет собой антитело hL49,  $n$  равно 12,  $R^{Pr}$  представляет собой атом водорода,  $R^{21}$  представляет собой  $CH_3$ , и  $p$  означает число от 1 до 16.

24. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.23, где среднее значение  $p$  в популяции конъюгата антитело-лекарственное средство составляет примерно 8.

25. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.18-24, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

26. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариabельную область тяжелой цепи и/или вариabельную область легкой цепи, как определено в любом из пп.1-17.

27. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.26.

28. Вектор по п.27, где вектор является экспрессионный вектором.

29. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.26.

30. Клетка-хозяин по п.29, где клетка-хозяин представляет собой клетку яичника китайского хомячка (CHO).

31. Способ получения анти-CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.29 или варианту осуществления 30 в условиях, подходящих для получения анти-CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

32. Способ по п.31, дополнительно включающий выделение анти- CD228 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцированного клеткой-хозяином.

33. Способ получения конъюгата анти-CD228 антитело-лекарственное средство, включающий культивирование клетки-хозяина по пп.29 или 30 в условиях, подходящих для получения анти-CD228 антитела; выделение полученного анти-CD228 антитела из клетки-хозяина; и конъюгирование анти-CD228 антитела с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

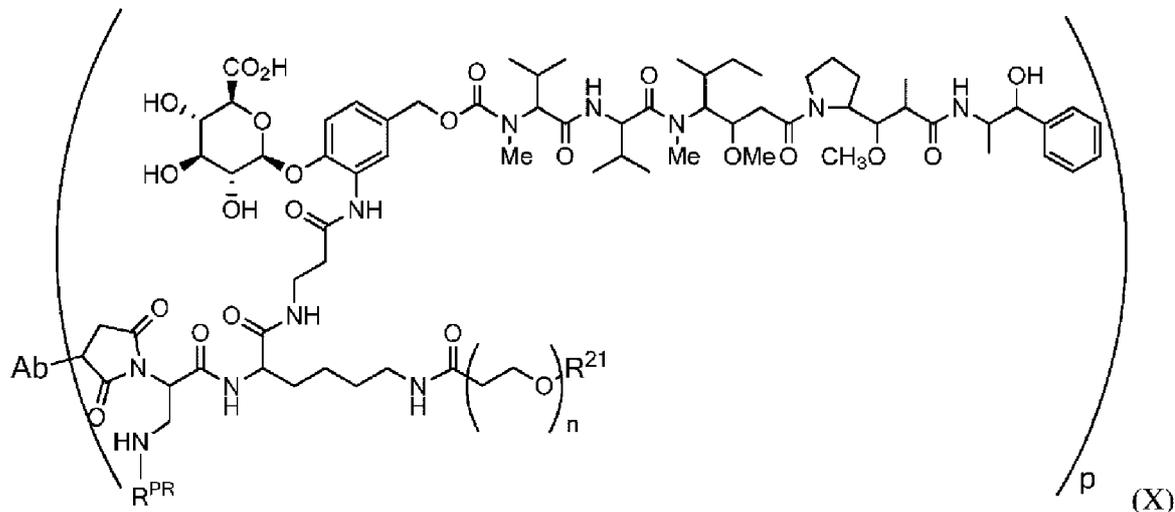
34. Способ по п.33, где анти-CD228 антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом через линкер.

35. Способ по п.34, где линкер представляет собой линкер MDpr-PEG (12)-gluc.

36. Способ по любому из пп.33-35, где цитотоксический или цитостатический агент представляет собой монометилауристатин.

37. Способ по п.36, где монометилауристатин представляет собой монометилауристатин E (MMAE).

38. Способ по п.37, где линкер присоединен к монометилауристатину E с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего структуру:



где Ab представляет собой антитело hL49, n равно 12,  $R^{Pr}$  представляет собой атом водорода,  $R^{21}$  представляет собой  $CH_3$ , и P означает число от 1 до 16.

39. Способ по п.38, где среднее значение P в популяции конъюгата антитело-лекарственное средство составляет примерно 8.

40. Способ по любому из пп.33-39, где конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE.

41. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-17 или конъюгата антитело-

лекарственное средство по любому из пп.18-25.

42. Способ по п.41, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и не отвечал на лечение, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

43. Способ по п.41, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами, и у него имел место рецидив после лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

44. Способ по п.41, где субъект ранее лечился одним или более терапевтическими средствами и имел прогрессирование заболевания во время лечения, где одно или более терапевтических средств не являются антителом, антигенсвязывающим фрагментом или конъюгатом антитело-лекарственное средство.

45. Способ по любому из пп.41-44, где рак представляет собой рак на поздней стадии.

46. Способ по п.45, где рак на поздней стадии представляет собой рак стадии 3 или 4.

47. Способ по пп.45 или 46, где рак на поздней стадии представляет собой метастатический рак.

48. Способ по любому из пп.41-47, где рак представляет собой рецидивирующий рак.

49. Способ по любому из пп.41-48, где рак является неоперабельным.

50. Способ по любому из пп.41-49, где субъект ранее получал лечение стандартной терапевтической терапией по поводу рака, и предшествующее лечение было неэффективным.

51. Способ по любому из пп.41-50, где рак выбран из группы, состоящей из меланомы, рака поджелудочной железы, мезотелиомы, колоректального рака, рака легких, рака щитовидной железы, рака молочной железы, холиангиокарциномы, рака пищевода и рака головы и шеи.

52. Способ по п.51, где рак представляет собой меланому.

53. Способ по п.52, где меланома представляет собой кожную меланому.

54. Способ по п.53, где кожная меланома выбрана из группы, состоящей из поверхностно-распространяющейся меланомы, узловой меланомы, акральной лентигинозной меланомы, злокачественной лентигино-меланомы и десмопластической меланомы.

55. Способ по п.54, где акральная лентигинозная меланома представляет собой подногтевую меланому.

56. Способ по любому из пп.53-55, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-L1.

57. Способ по п.56, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1.

58. Способ по п.52, где меланома представляет собой подкожную меланому.

59. Способ по п.58, где подкожная меланома представляет собой меланому глаза или меланому слизистой оболочки.
60. Способ по п.52, где меланома представляет собой некожную меланому.
61. Способ по п.51, где рак представляет собой мезотелиому.
62. Способ по п.61, где мезотелиома выбрана из группы, состоящей из мезотелиомы плевры, мезотелиомы брюшины, мезотелиомы перикарда и мезотелиомы яичка.
63. Способ по п.62, где мезотелиома представляет собой мезотелиому плевры.
64. Способ по п.63, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.
65. Способ по п.64, где терапия на основе платины представляет собой цисплатин.
66. Способ по любому из пп.63-65, где субъект ранее получал терапию пеметрекседом.
67. Способ по п.51, где рак легкого представляет собой немелкоклеточный рак легкого.
68. Способ по п.67, где немелкоклеточный рак легкого имеет мутантную форму рецептора эпидермального фактора роста (EGFR).
69. Способ по п.67, где немелкоклеточный рак легкого имеет EGFR дикого типа.
70. Способ по п.69, где субъект ранее получал терапию на основе препарата платины.
71. Способ по пп.69 или 70, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1 или PD-11.
72. Способ по п.71, где субъект ранее получал терапию ингибитором PD-1.
73. Способ по п.51, где рак молочной железы выбран из группы, состоящей из HER2-положительного, HER2-негативного, эстрогеновый рецептор-положительного (ER), ER-негативного, прогестеронового рецептор-положительного (PR), PR-негативного и тройного негативного рака молочной железы.
74. Способ по п.73, где рак молочной железы представляет собой HER2-негативный рак молочной железы.
75. Способ по п.74, где субъект получал одну или более предшествующих линий терапии HER2-негативного рака молочной железы.
76. Способ по п.75, где одна или более предшествующих линий терапии включали лечение таксаном.
77. Способ по пп.75 или 76, где субъект является гормональный рецептор-положительным.
78. Способ по п.77, где субъект ранее получал терапию ингибитором CDK4/6.
79. Способ по пп.77 или 78, где субъект ранее получал гормонально-направленную терапию.
80. Способ по п.51, где колоректальный рак выбран из группы, состоящей из колоректальной аденокарциномы, стромальной опухоли желудочно-кишечного тракта, первичной колоректальной лимфомы, карциноидной опухоли желудочно-кишечного тракта и лейомиосаркомы.
81. Способ по п.80, где субъект ранее получал две или более линии терапии

колоректального рака.

82. Способ по п.51, где рак поджелудочной железы представляет собой экзокринный рак или нейроэндокринный рак.

83. Способ по п.82, где экзокринный рак выбран из группы, состоящей из аденокарциномы поджелудочной железы, ацинарно-клеточной карциномы, цистаденокарциномы, панкреатобластомы, аденосквамозной карциномы, карциномы из перстневидных клеток, гепатоидной карциномы, коллоидной карциномы, недифференцированной карциномы и муцинозно-кистозного новообразования поджелудочной железы.

84. Способ по п.83, где аденокарцинома поджелудочной железы представляет собой протоковую аденокарциному поджелудочной железы.

85. Способ по пп.83 или 84, где субъект ранее получал одну или более линий терапии рака поджелудочной железы.

86. Способ по любому из пп.41-85, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель.

87. Способ по любому из пп.41-86, где субъектом является человек.

88. Набор, содержащий:

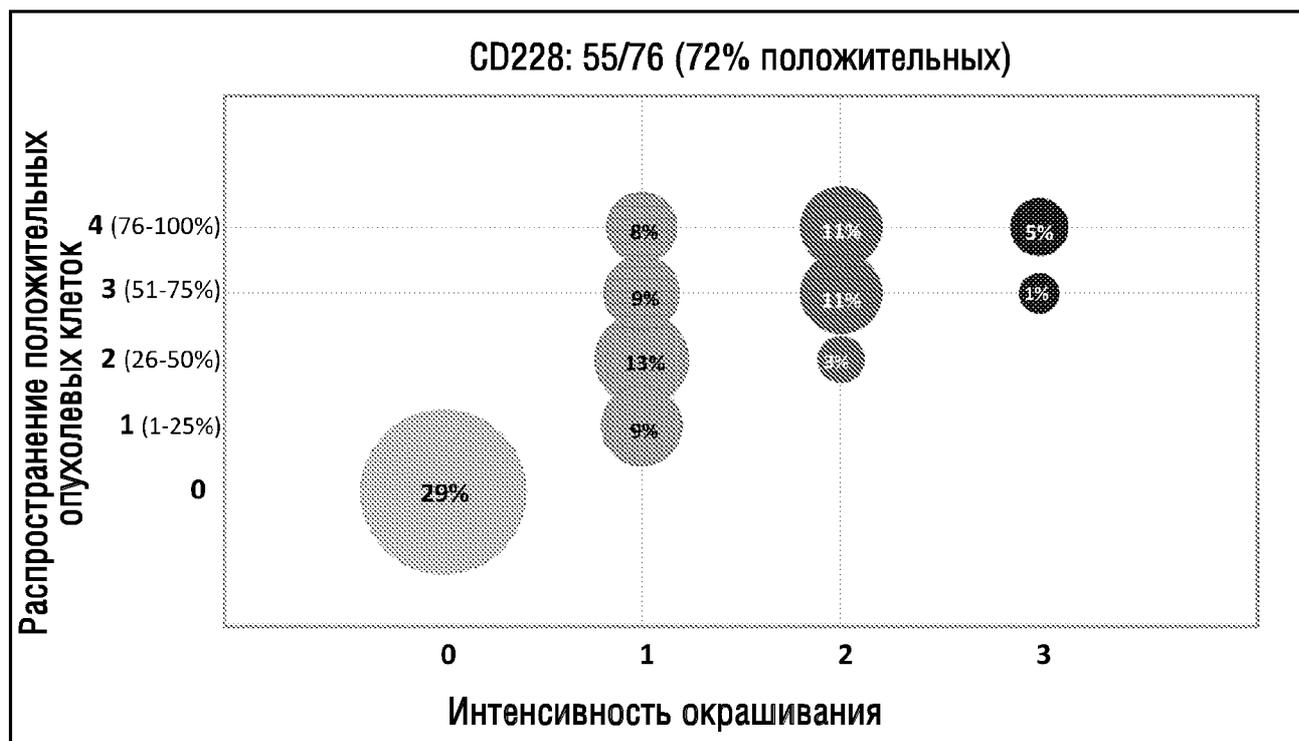
(а) антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.18-25; и

(b) инструкции по применению антитела или антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитело-лекарственное средство в соответствии со способом по любому из пп.41-87.

89. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов осуществления 1-17 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.18-25 и один или более агентов, выбранных из группы, состоящей из физиологически приемлемого носителя, разбавителя, эксципиента и вспомогательного вещества.

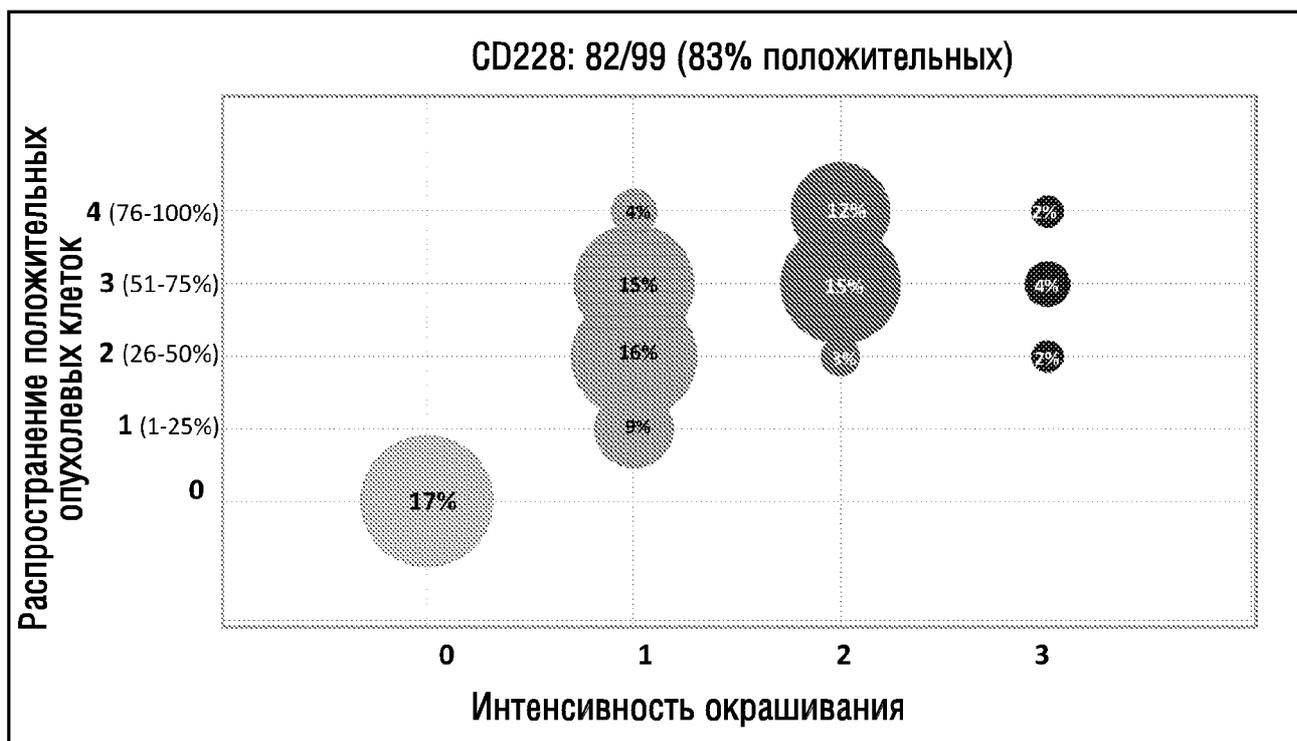
## ФИГ.1

## Высокая экспрессия CD228 у пациентов с опухолью меланомой



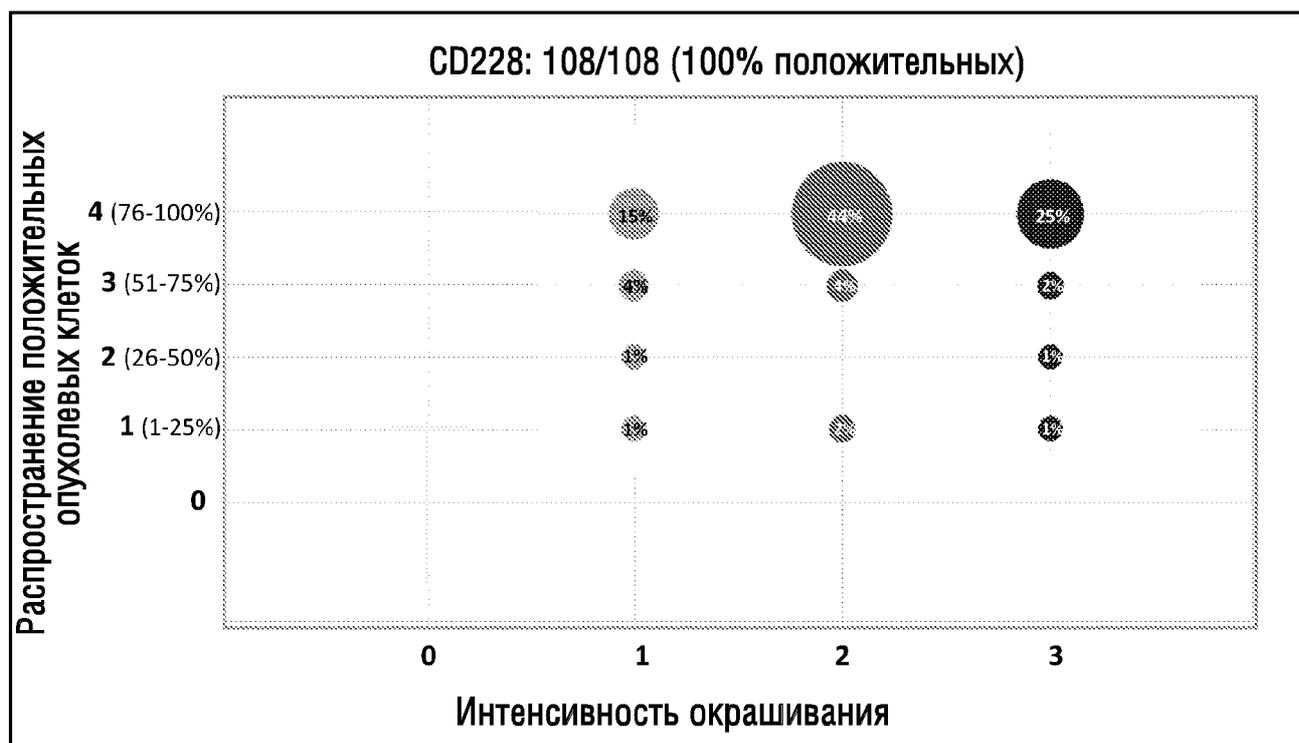
## ФИГ.2

## Высокая экспрессия CD228 у пациентов с опухолью мезотелиомой



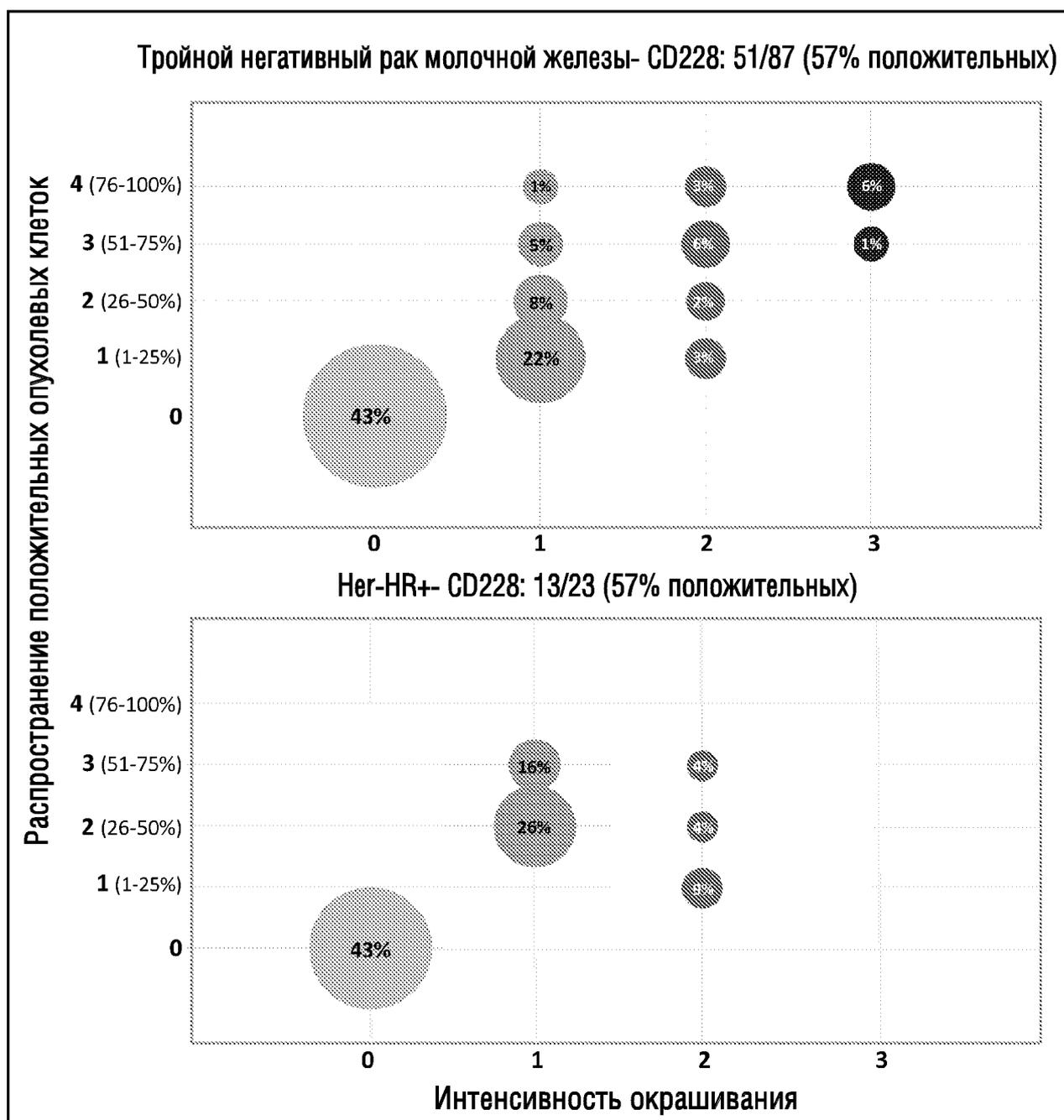
## ФИГ.3

## Высокая экспрессия CD228 у пациентов с колоректальным раком



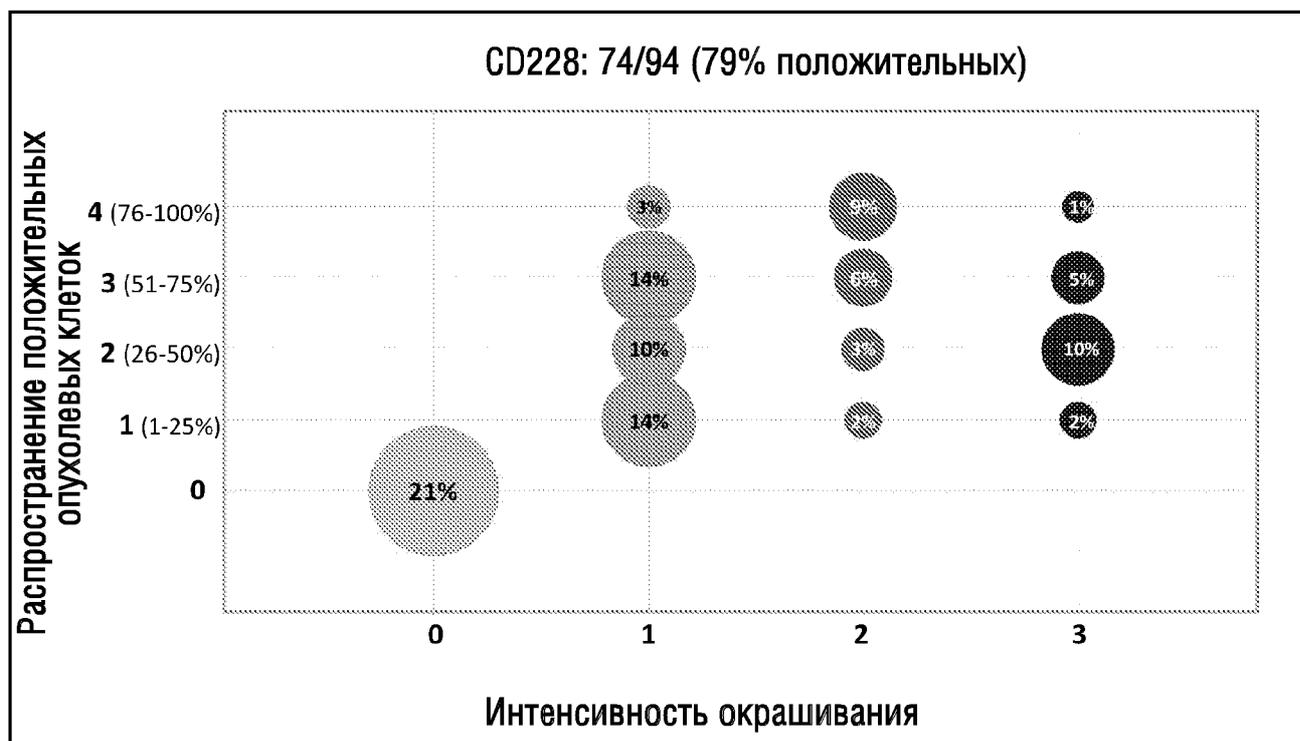
## ФИГ.4

## Высокая экспрессия CD228 у пациентов с раком молочной железы



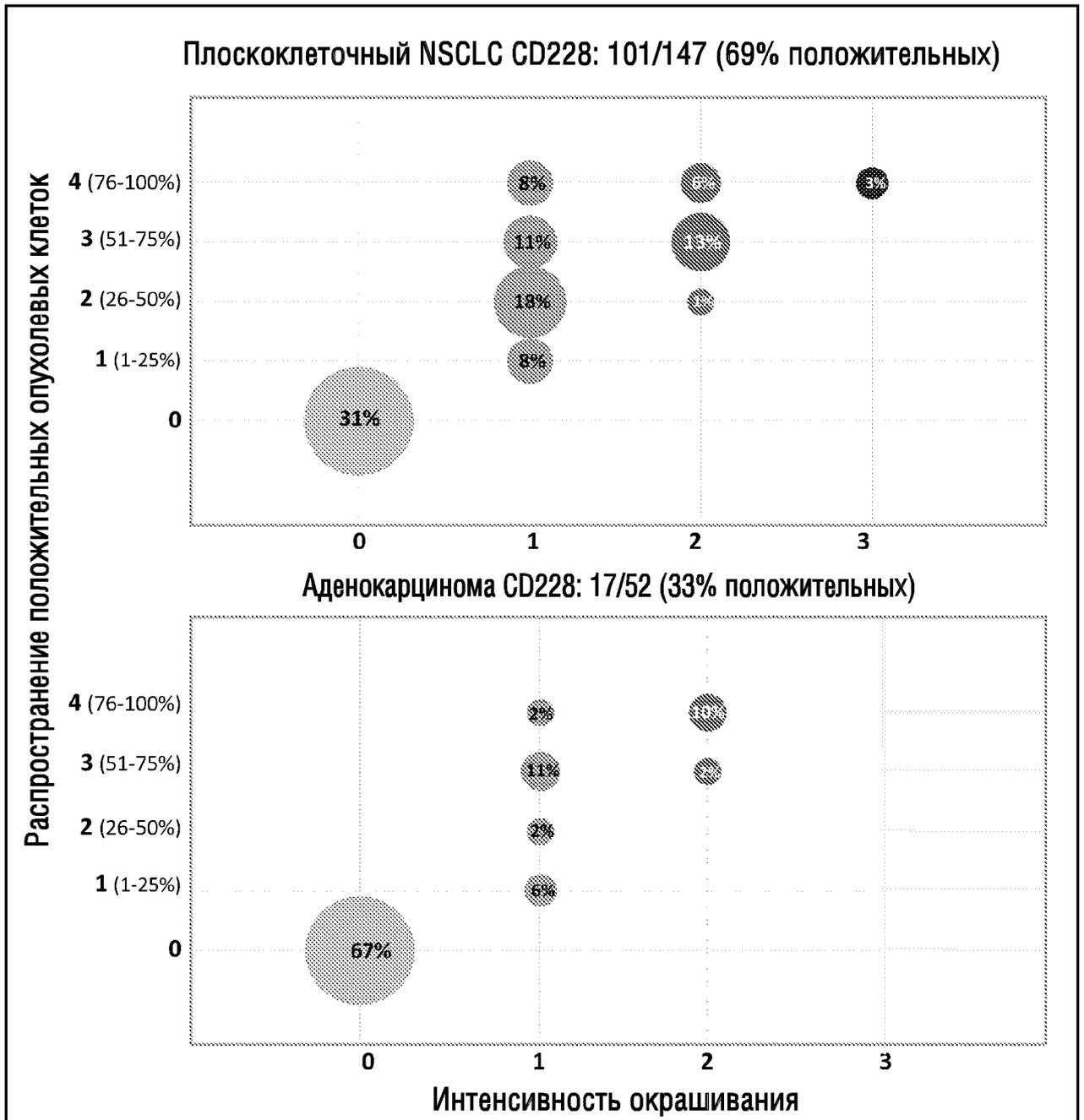
ФИГ.5

Высокая экспрессия CD228 у пациентов  
с раком поджелудочной железы

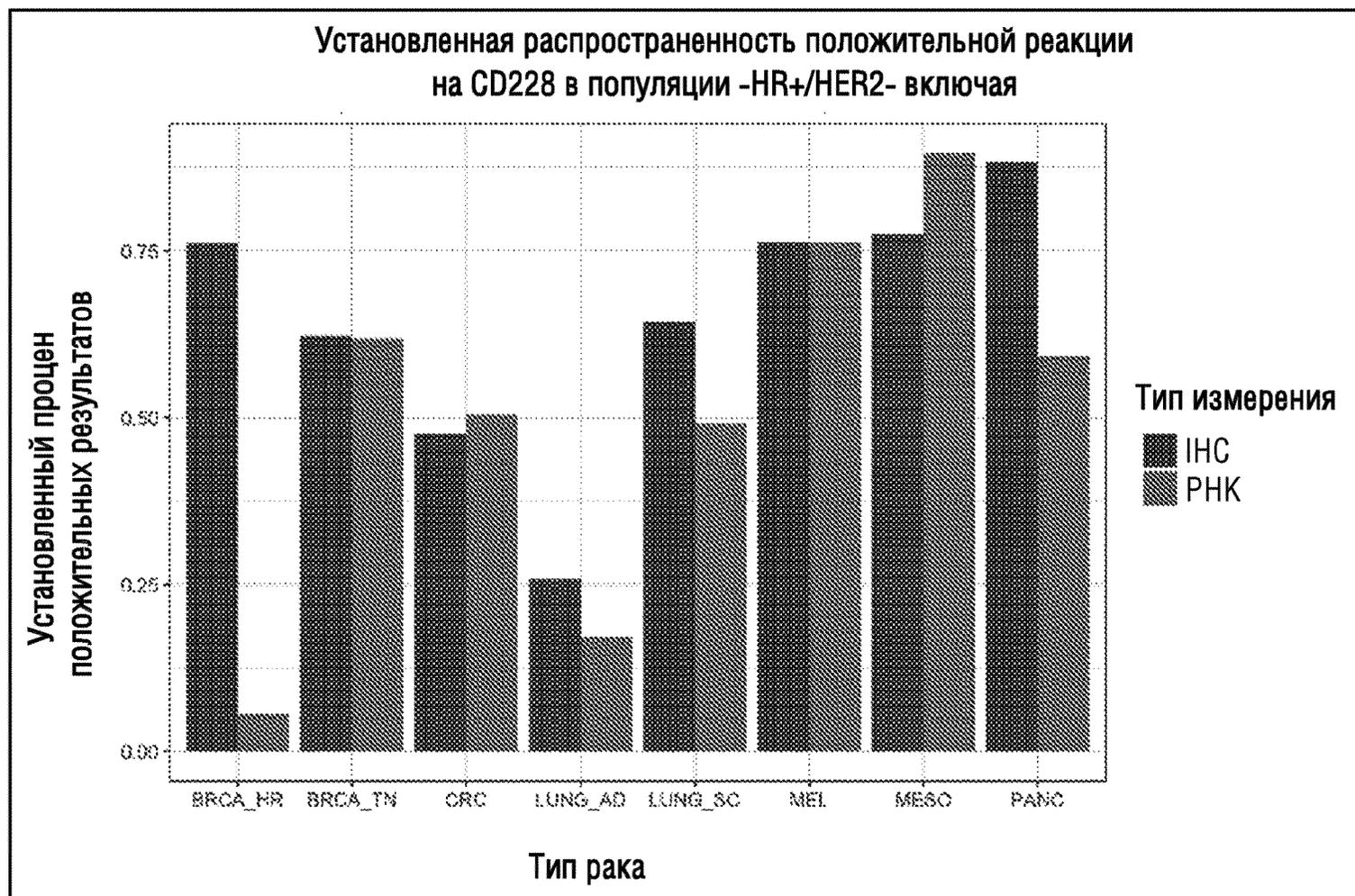


ФИГ.6

Высокая экспрессия CD228 у пациентов  
с немелкоклеточным раком легкого



ФИГ.7



# ФИГ.8

## Выравнивание вариантов тяжелой цепи hL49 с человеческой акцепторной последовательностью,IGHV4-59/HJ4

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Ma L49 vH      E.....S.....Q.....S.T.D..T.G..N...KF..NK..YM...SD..I.Y.....IS.T
Hu IGHV4-59/HJ4 QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGGSISSYYWVIRQPPGKGLEWIGYIYYSSTWYNP
hvHA          .....D..T.G..N.....Y...SD..I.Y.....
hvHB          .....D..T.G..N...F.....YM...SD..I.Y.....I...
hvHC          .....D..T.G..N...F.....YM...SD..I.Y.....I...
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

```

80                    90                    100                    110

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
Ma L49 vH      R.....YY.Q.NF...E...T.N...RTLATYYAM.....S.....
Hu IGHV4-59/HJ4 VDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCAR-----YFDYWGQGTFLVTVSS
hvHA          K.....Y.....RTLATYYAM.....
hvHB          R.....Y.....RTLATYYAM.....
hvHC          R.....Y.....F.....N...RTLATYYAM.....
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

```

8/35

# ФИГ.9

## Выравнивание вариантов тяжелой цепи hL49

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hvHA          QVQLQESGPGGLVVKPSETLSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLEIYIGYISDSGITYYNP
hvHB          .....F.....M.....I...
hvHC          .....F.....M.....I...
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

```

10                    20                    30                    40                    50                    60                    70

```

.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
hvHA          RDTSKNQYSLKLSVTAADTAVYYCARRTLATYYAMDYWGQGTFLVTVSS
hvHB          .....F.....N.....
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

```

# ФИГ.10 Выравнивание вариантов легкой цепи hL49 с человеческой акцепторной последовательностью, IGHV2-30/KJ4

```

                10      20      30      40      50      60
Mu L49 vL      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.F...T.....S..DQ.....A.....H.N.....H.YL.K.....KL...R...F.....
Hu IGHV2-30/KJ4 DVVMTQSPFLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPQSPRRLIYKVSNRDSGVPDRFSGS
hvLA          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.F.....A.....H.N.....H.....R...F.....
hvLB          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.F.....A.....H.N.....H.Y.....L...R...F.....
hvLC          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.F.....A.....H.....H.Y.....L...R...F.....
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

                70      80      90      100
Mu L49 vL      .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....L...F.S.S..V.P...G.....
Hu IGHV2-30/KJ4 GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPYTFGQGTKLEIKR
hvLA          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....S.S..V.P.....
hvLB          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....S.S..V.P.....
hvLC          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....S.S..V.P.....
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

```

# ФИГ.11 Выравнивание вариантов легкой цепи hL49

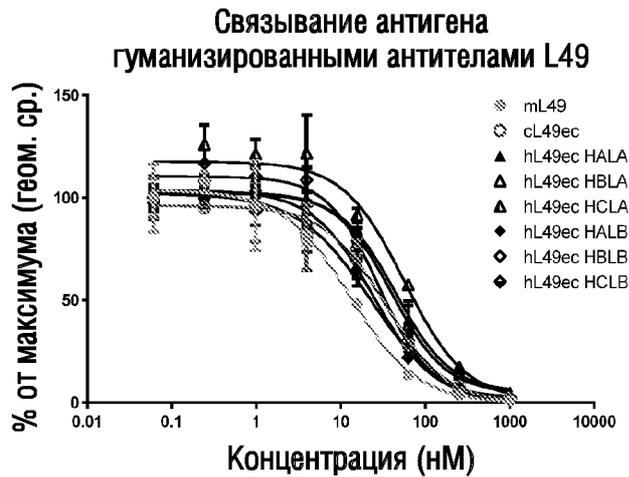
```

                10      20      30      40      50      60
hvLA          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
DFVMTQSPFLSLPVTLGQPASISCRASQSLVHSDGNTYLNWFQQRPQSPRRLIYRVSNRFSGVDRFSGS
hvLB          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....Y.....L.....
hvLC          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....D.....Y.....L.....
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

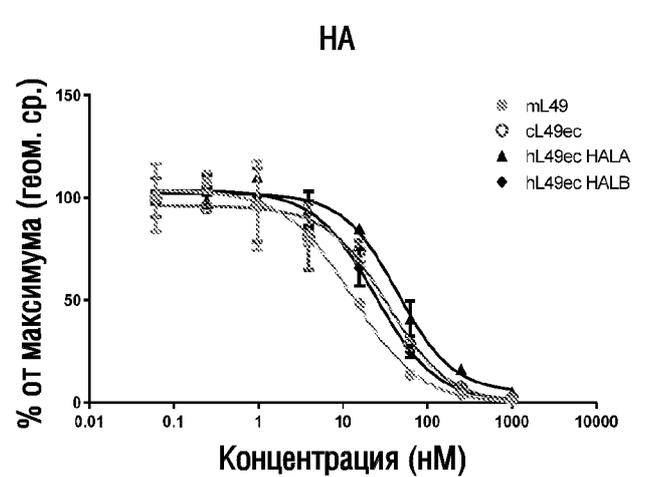
                70      80      90      100
hvLA          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
GSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPPTFGQGTKLEIKR
hvLB          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....
hvLC          .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
.....
Kabat CDRs      *****
IMGT CDRs      ++++++++

```

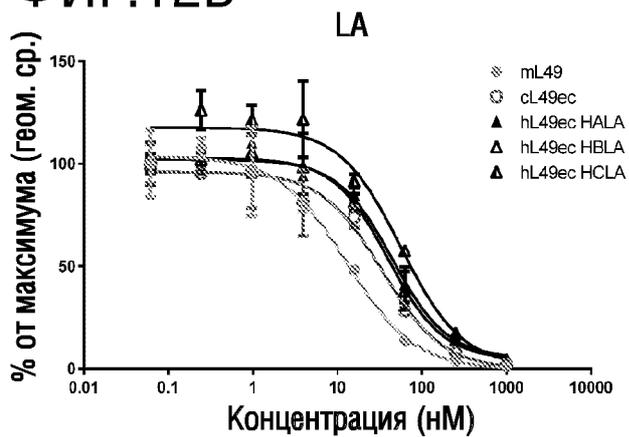
ФИГ.12А



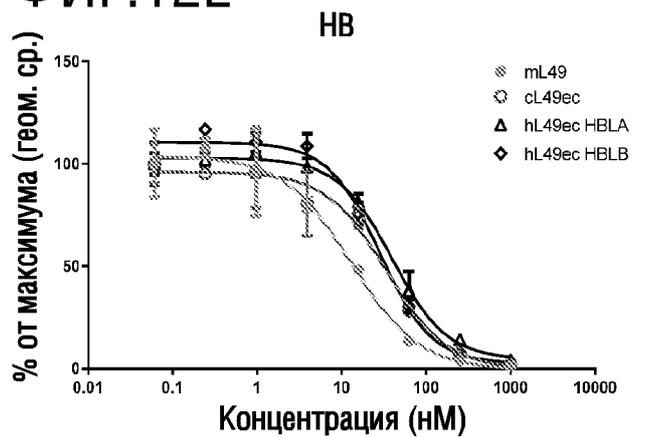
ФИГ.12D



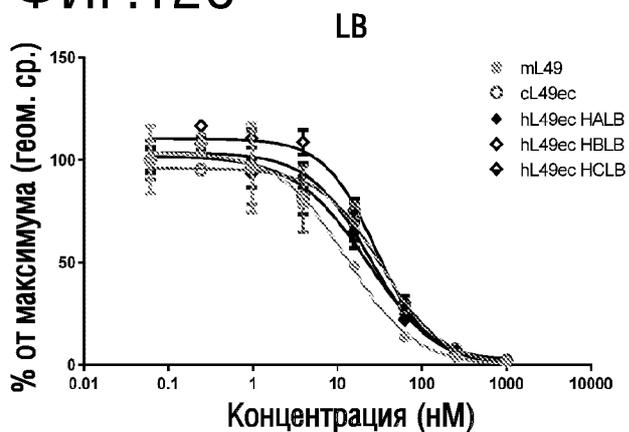
ФИГ.12B



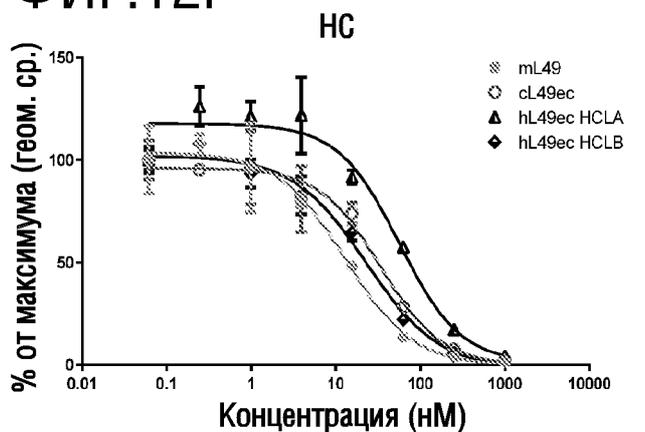
ФИГ.12E



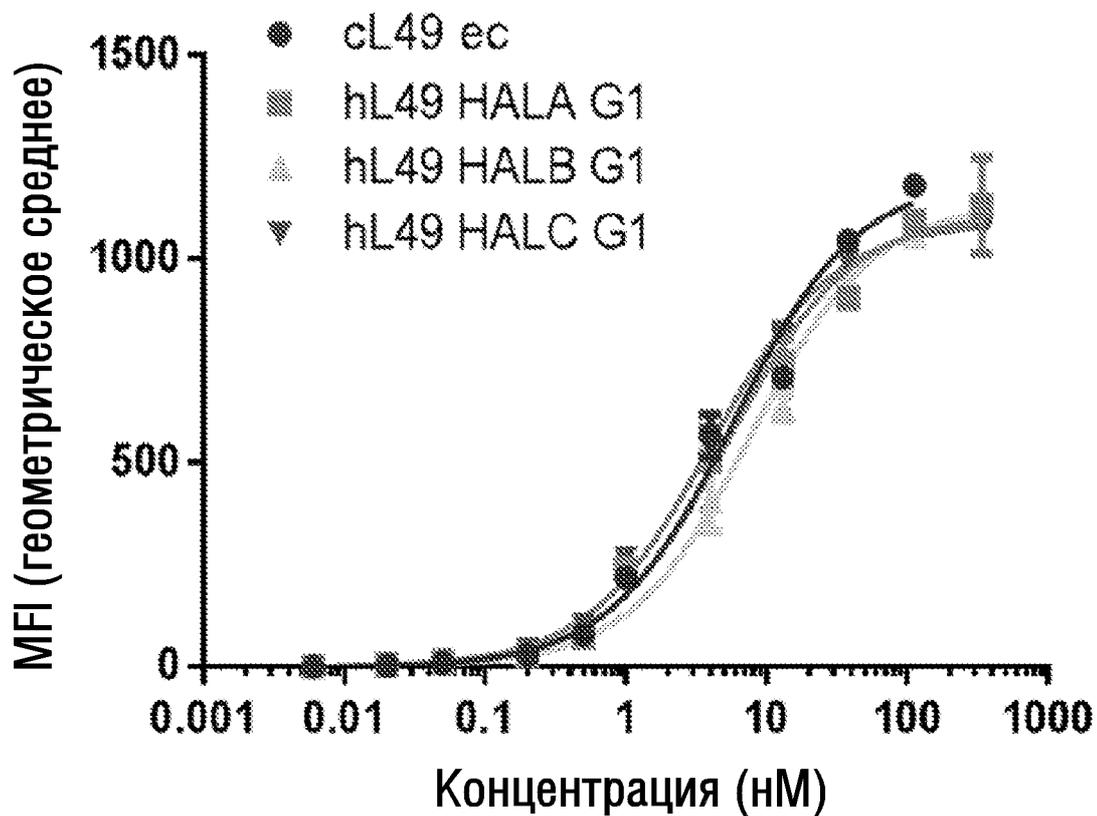
ФИГ.12C



ФИГ.12F

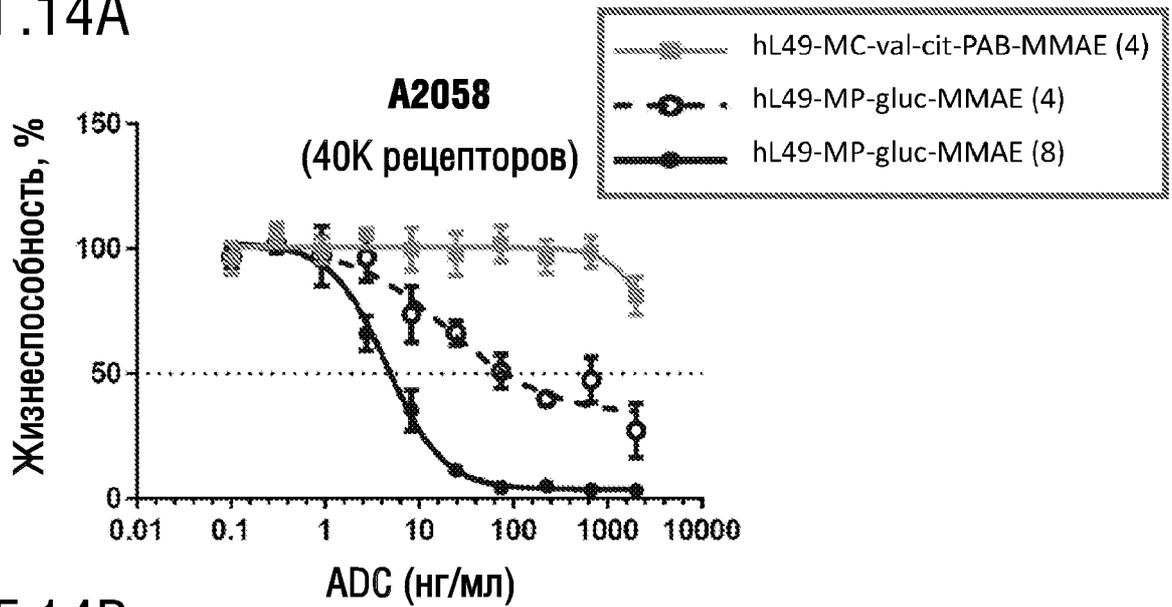


ФИГ.13

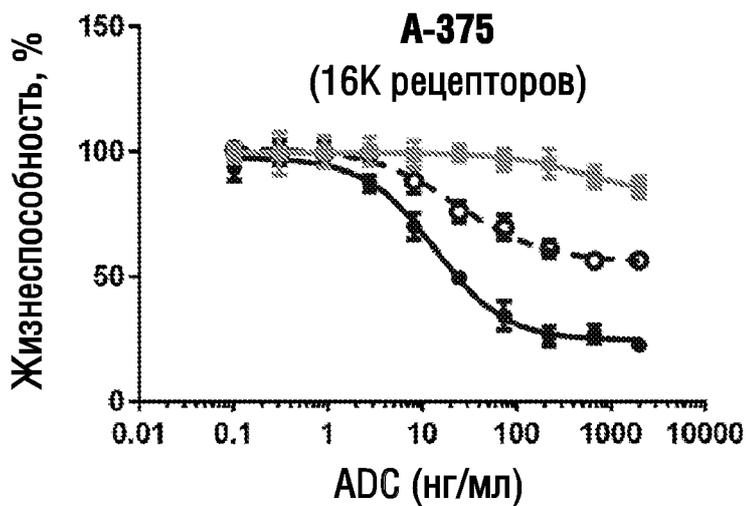


kD	cL49 ec	hL49 HALA G1	hL49 HALB G1	hL49 HALC G1
нМ	5.8	5.3	7.8	4.0
мкг/мл	0.9	0.8	1.2	0.6

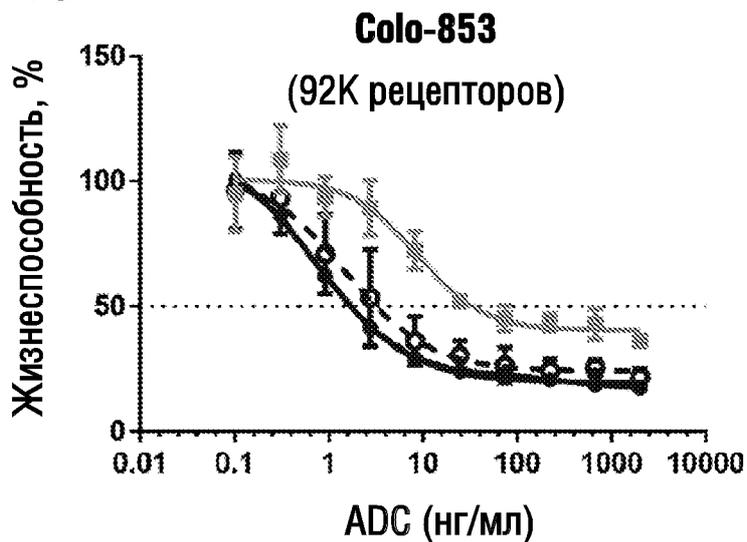
ФИГ.14А



ФИГ.14В

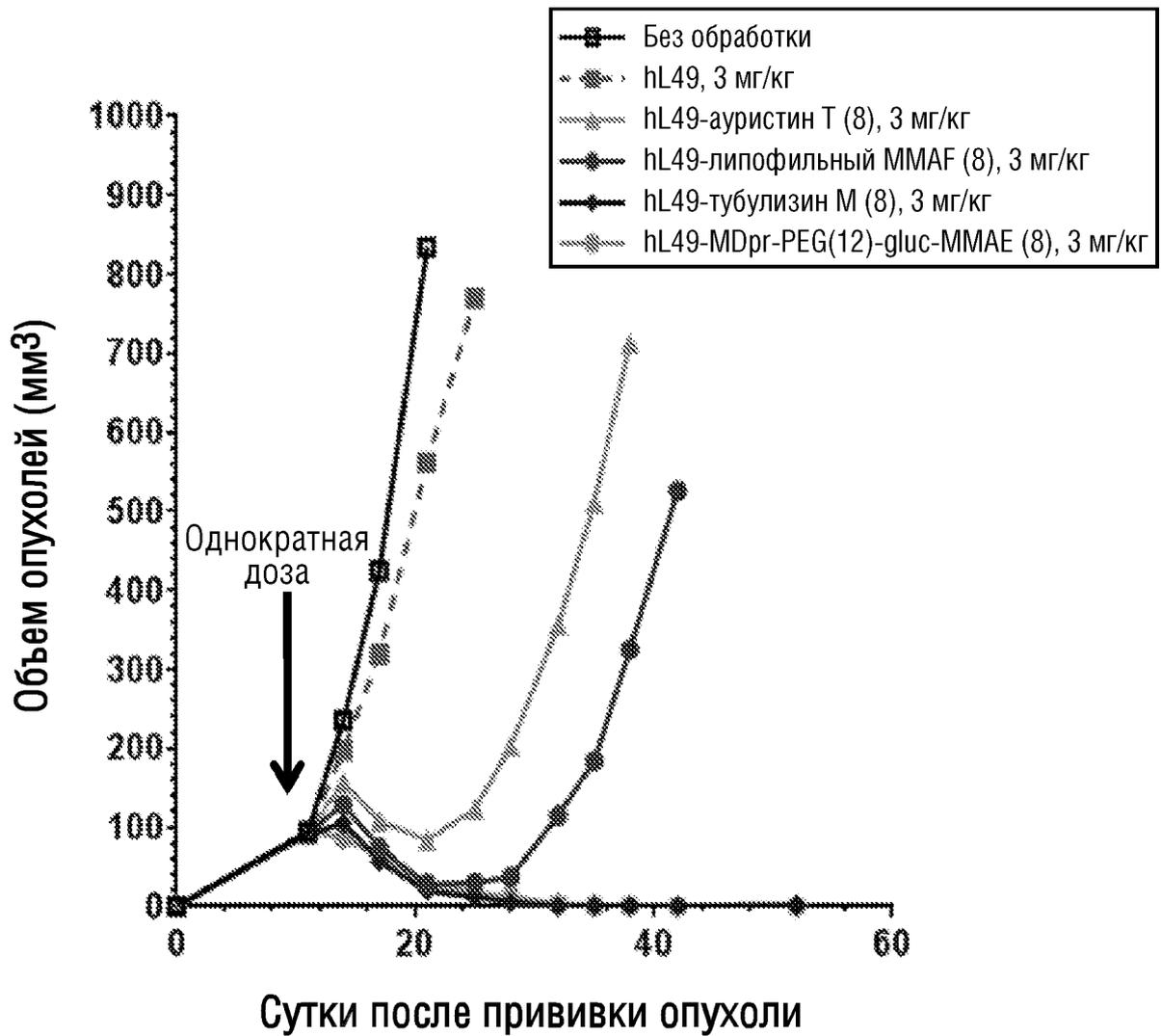


ФИГ.14С



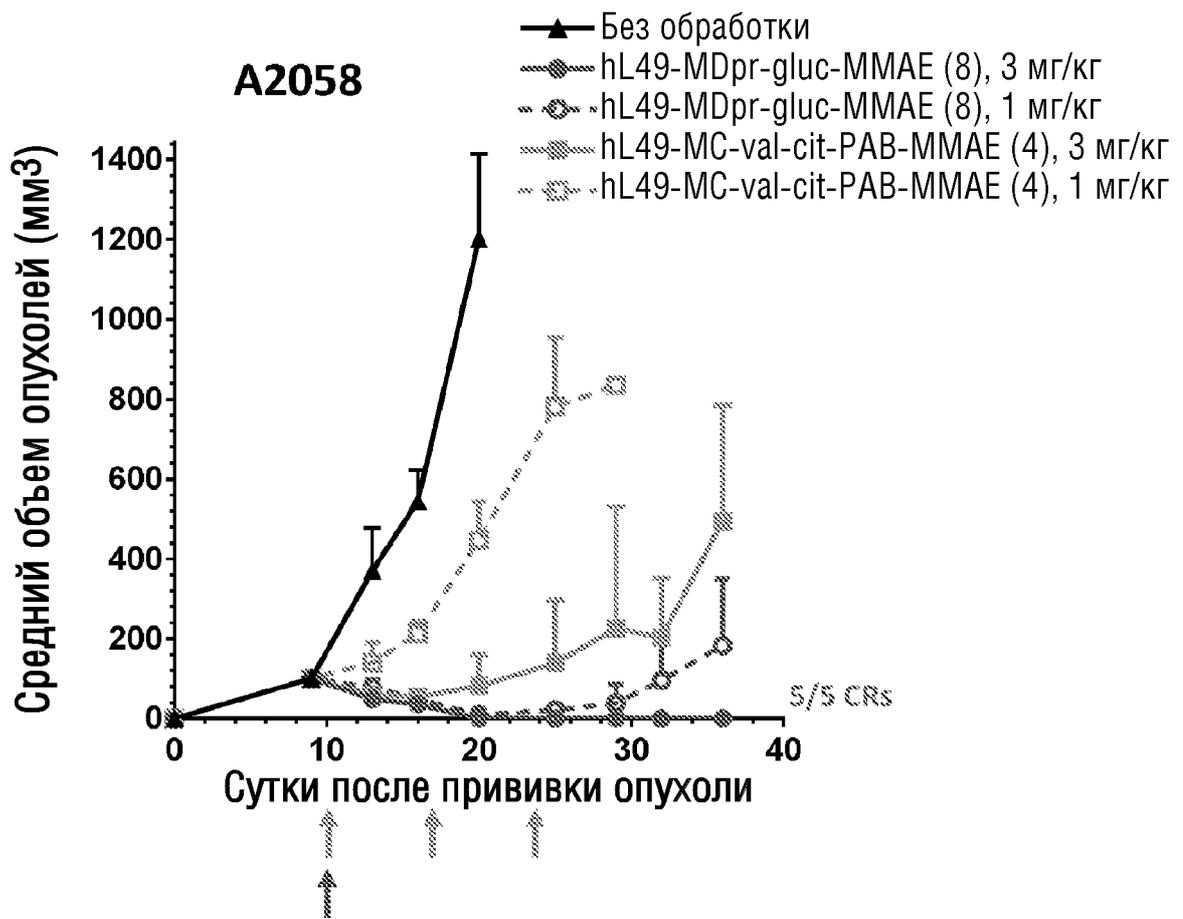
ФИГ.15

Модель ксенотрансплантата меланомы A2058  
45000 молекул CD228

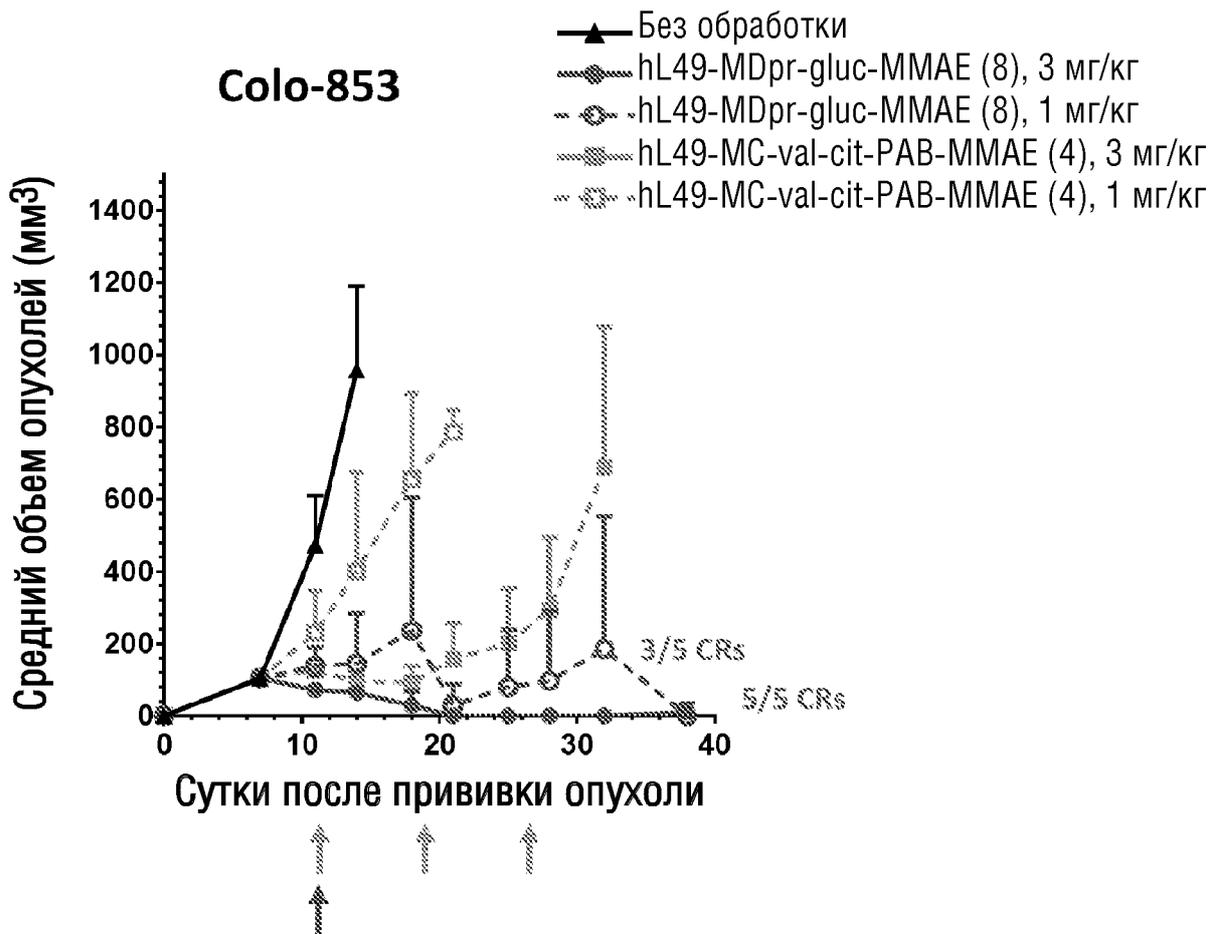




ФИГ.17

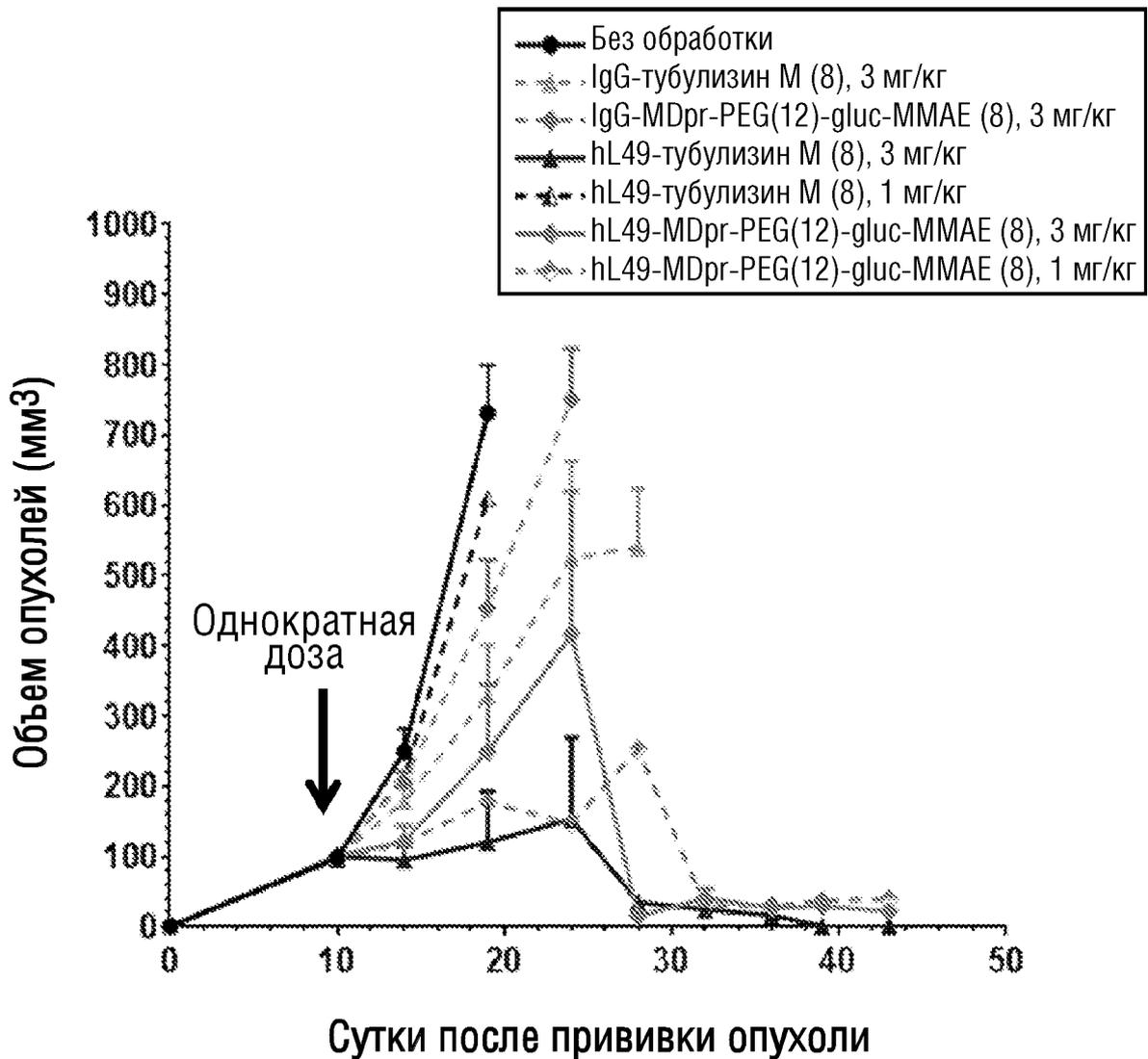


ФИГ.18



ФИГ.19

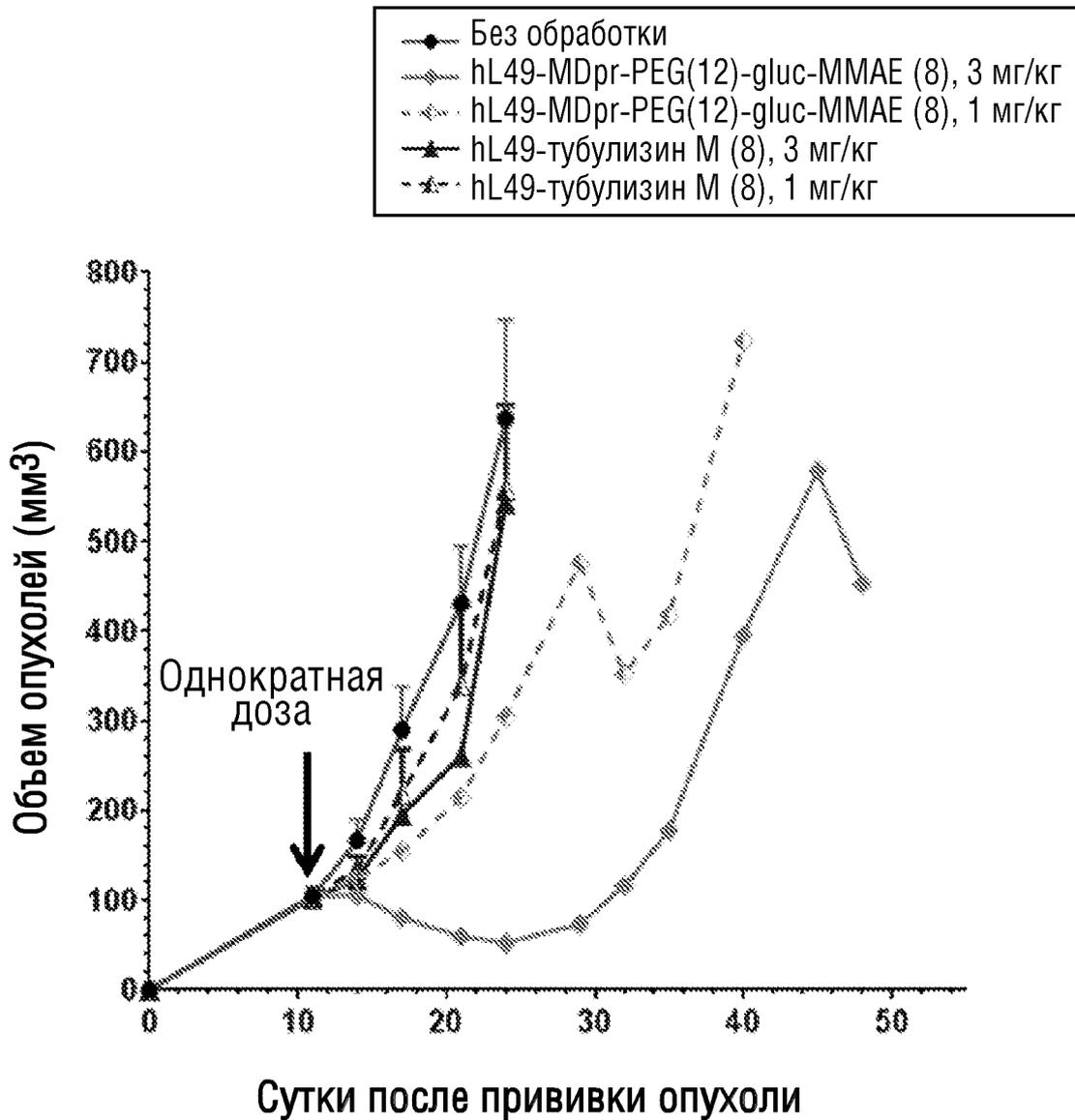
Модель ксенотрансплантата меланомы A2058  
45000 молекул CD228





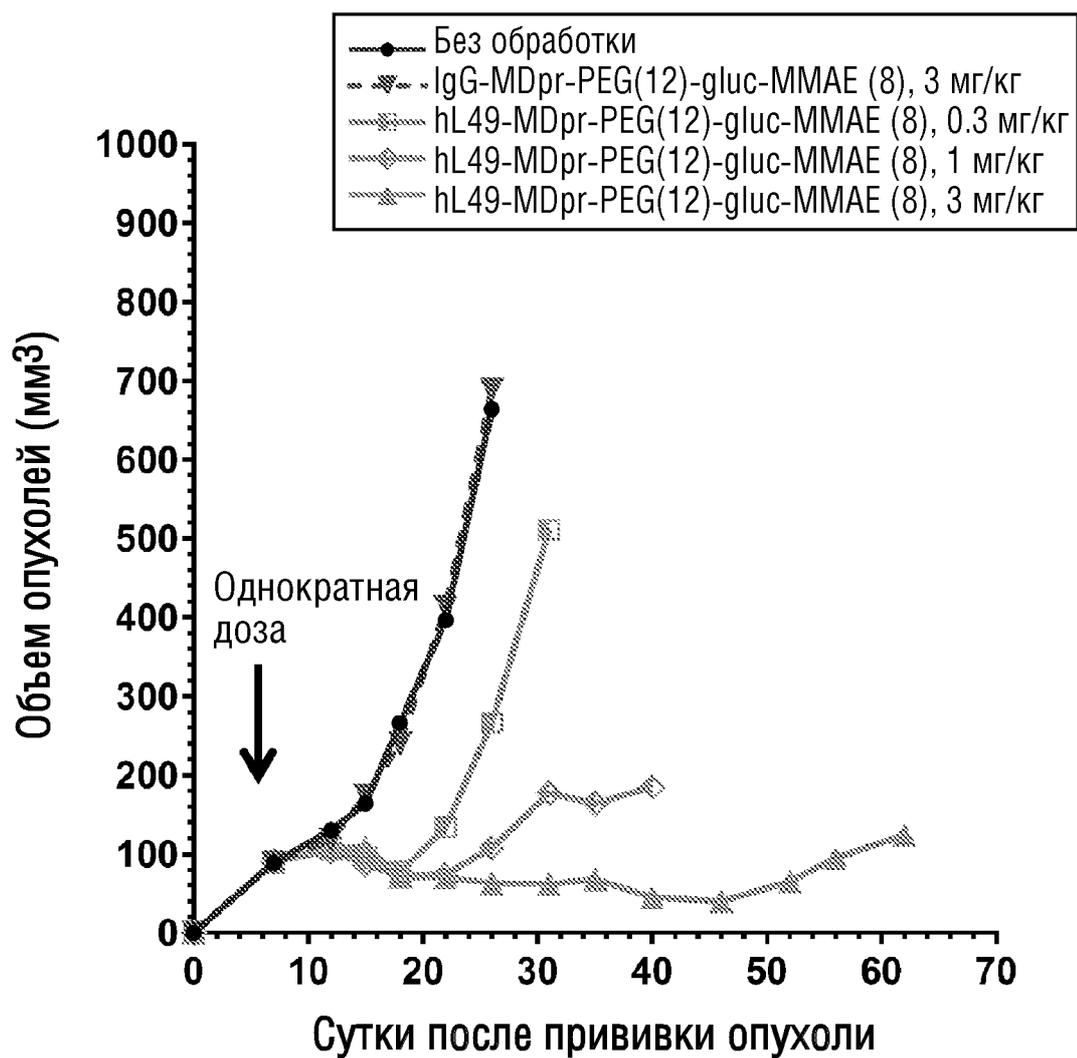
ФИГ.21

Модель ксенотрансплантата меланомы IGR-37  
24000 молекул CD228



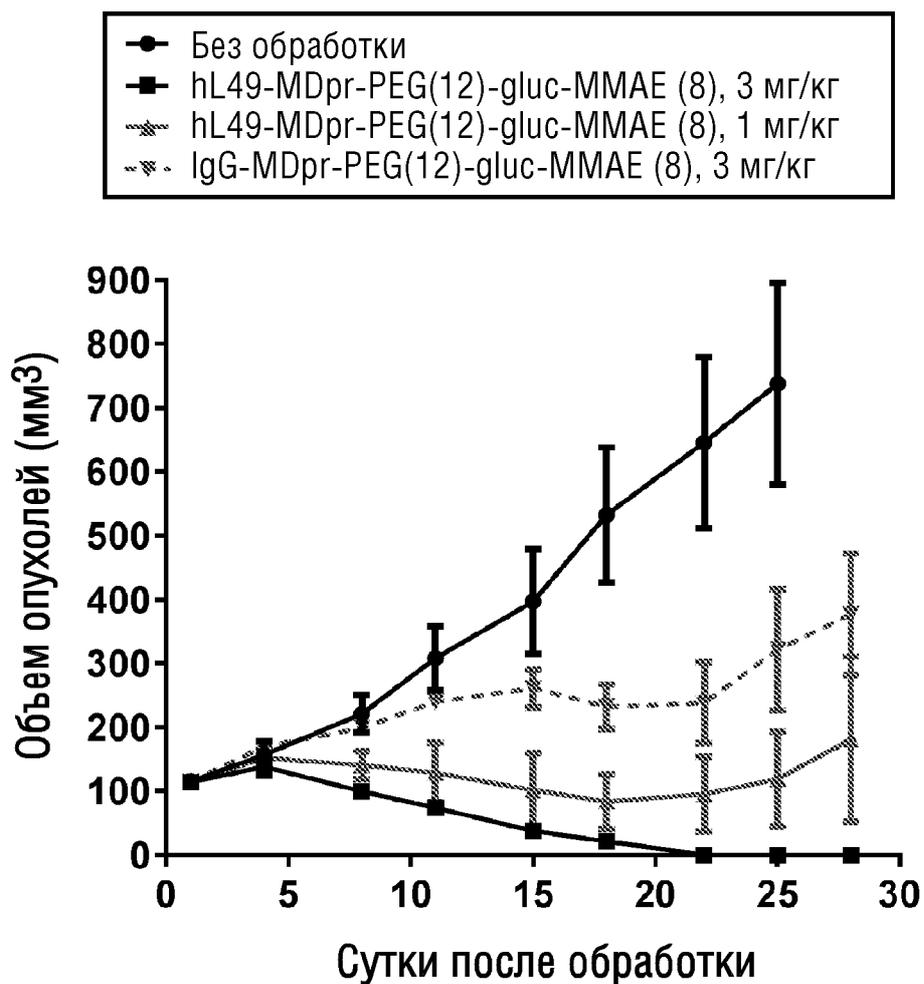
## ФИГ.22

Модель ксенотрансплантата меланомы Colo-853  
92000 молекул CD228



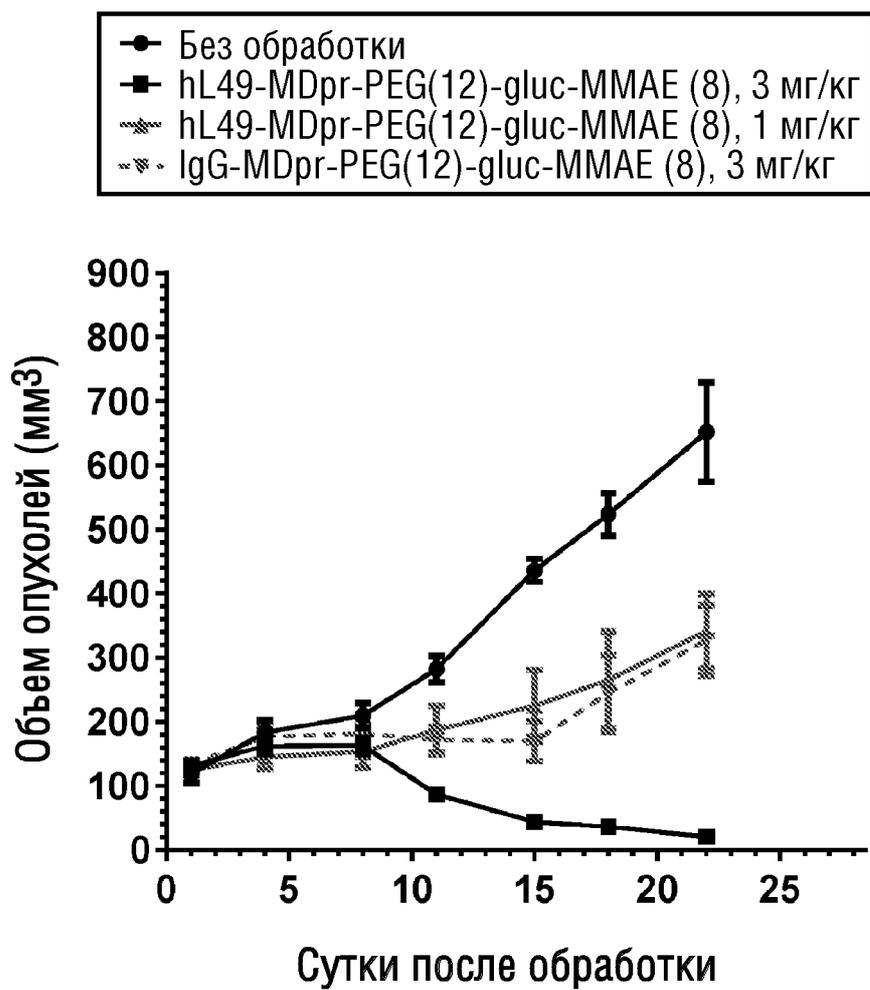
## ФИГ.23

## LU0697 PDX модель плоскоклеточного NSCL



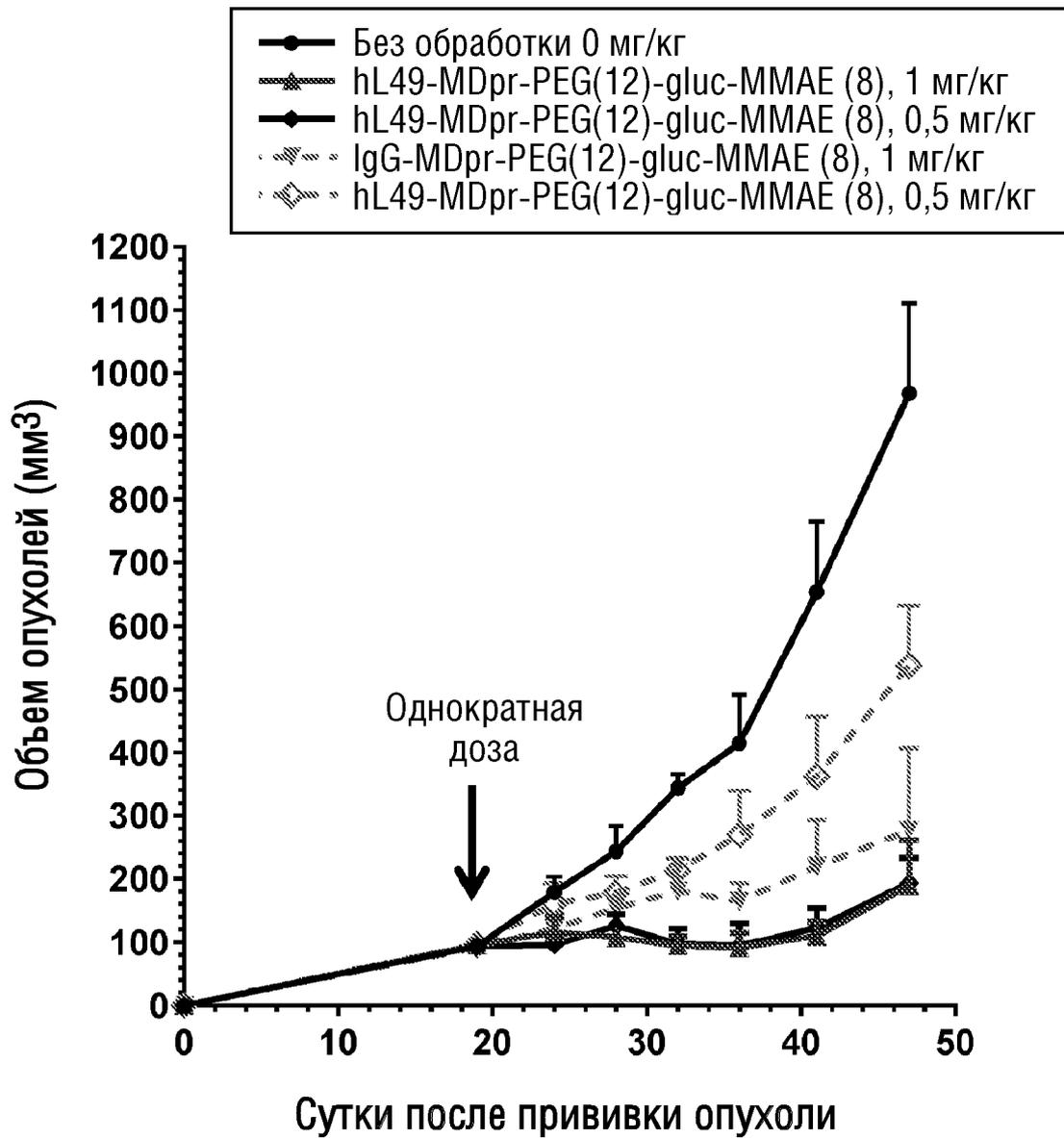
ФИГ.24

## LU0697 PDX модель аденокарциномы NSCL



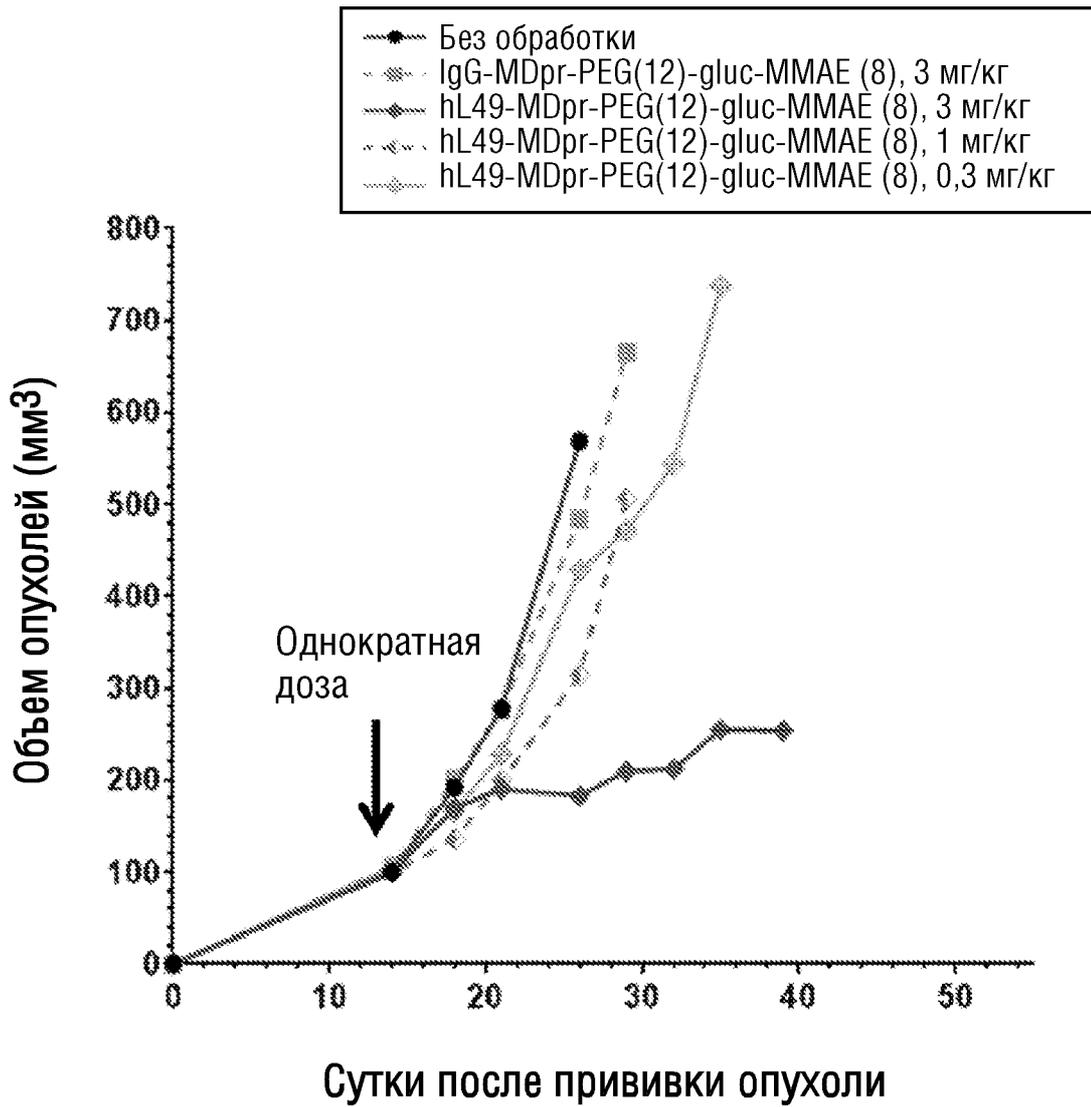
ФИГ.25

Модель ксенотрансплантата MDA-MB-231 TNBC  
175000 молекул CD228

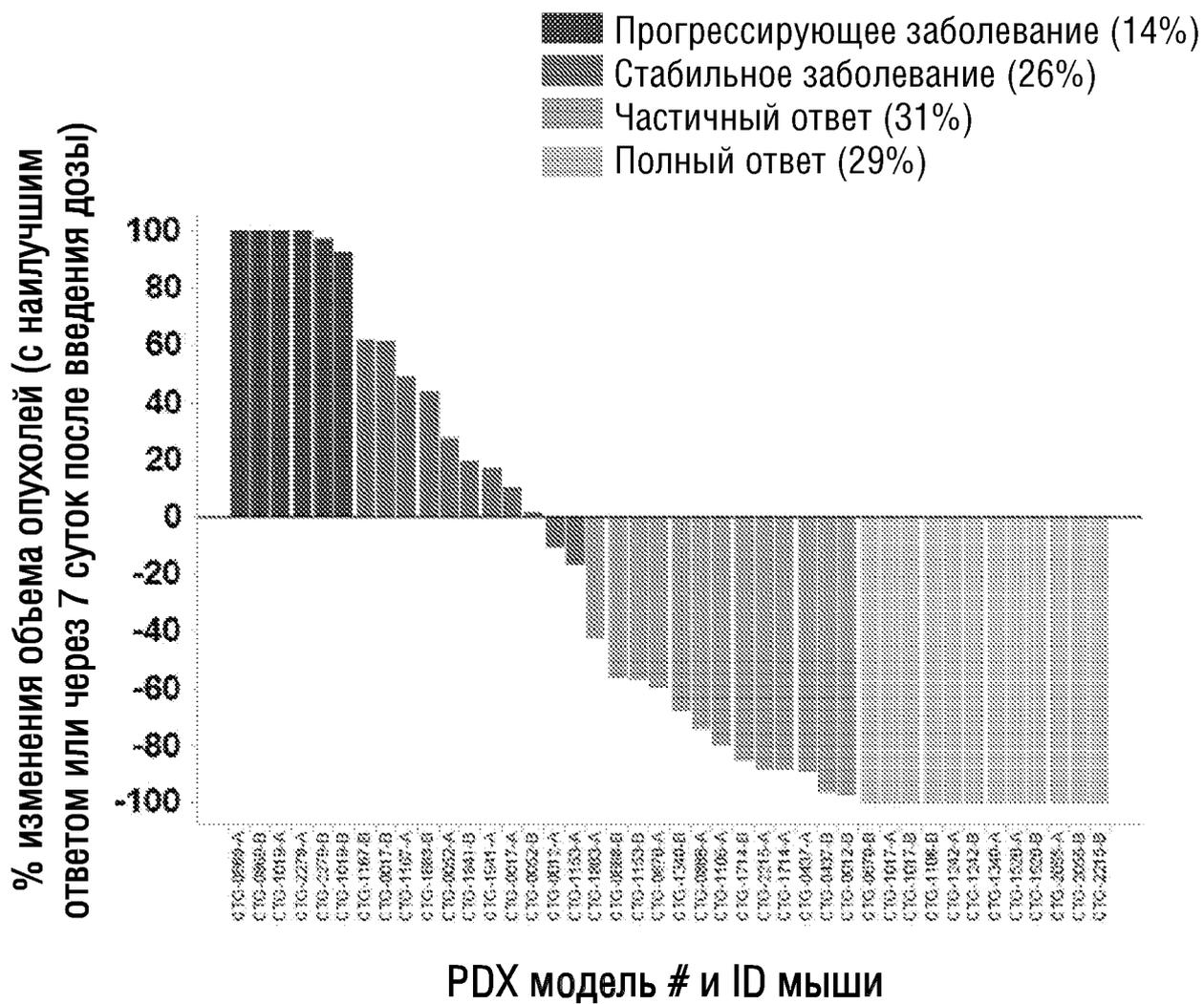


ФИГ.26

Модель ксенотрансплантата НРАФ-II поджелудочной железы  
34000 молекул CD228



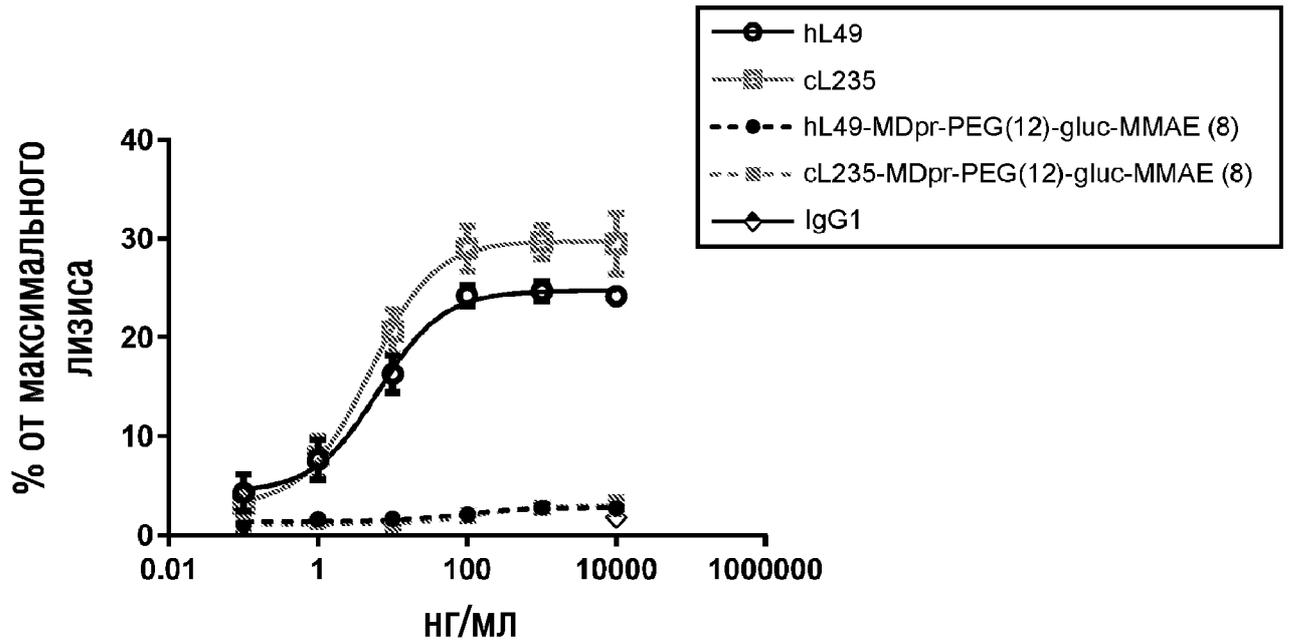
ФИГ.27



ФИГ.28А

## ADCC на клетках SK-MEL-28

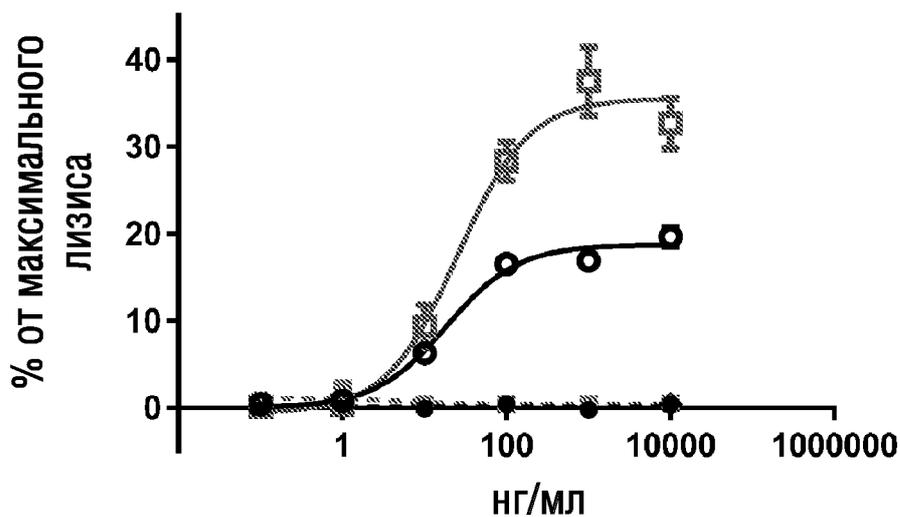
Пациент #1: FcγRIIIa 158V/V



ФИГ.28В

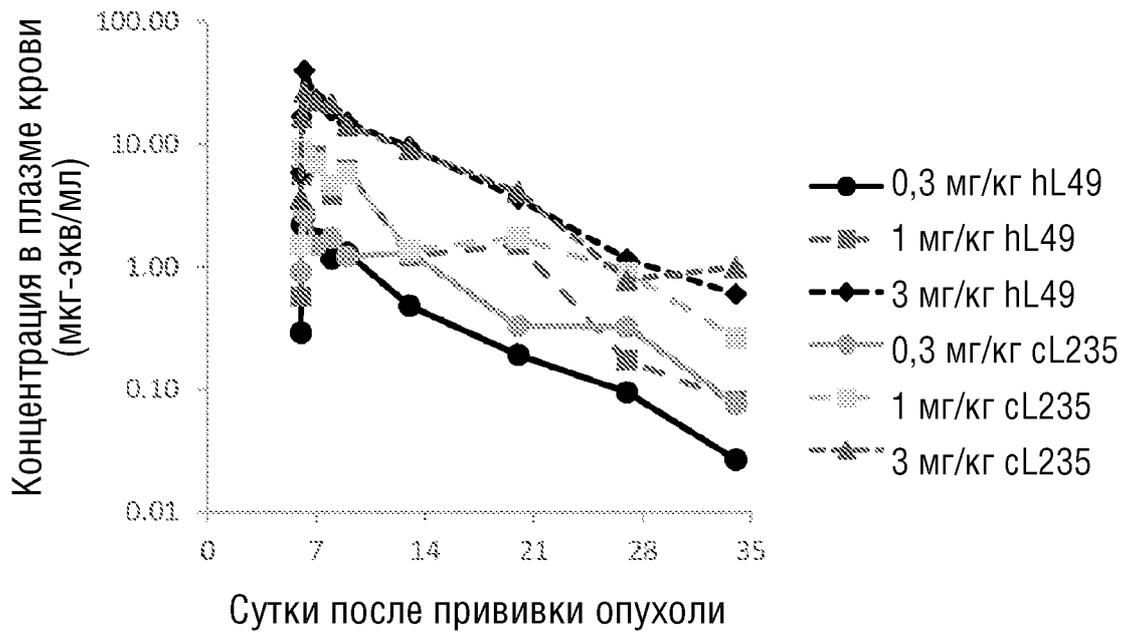
## ADCC на клетках SK-MEL-28

Пациент #2: FcγRIIIa 158V/V

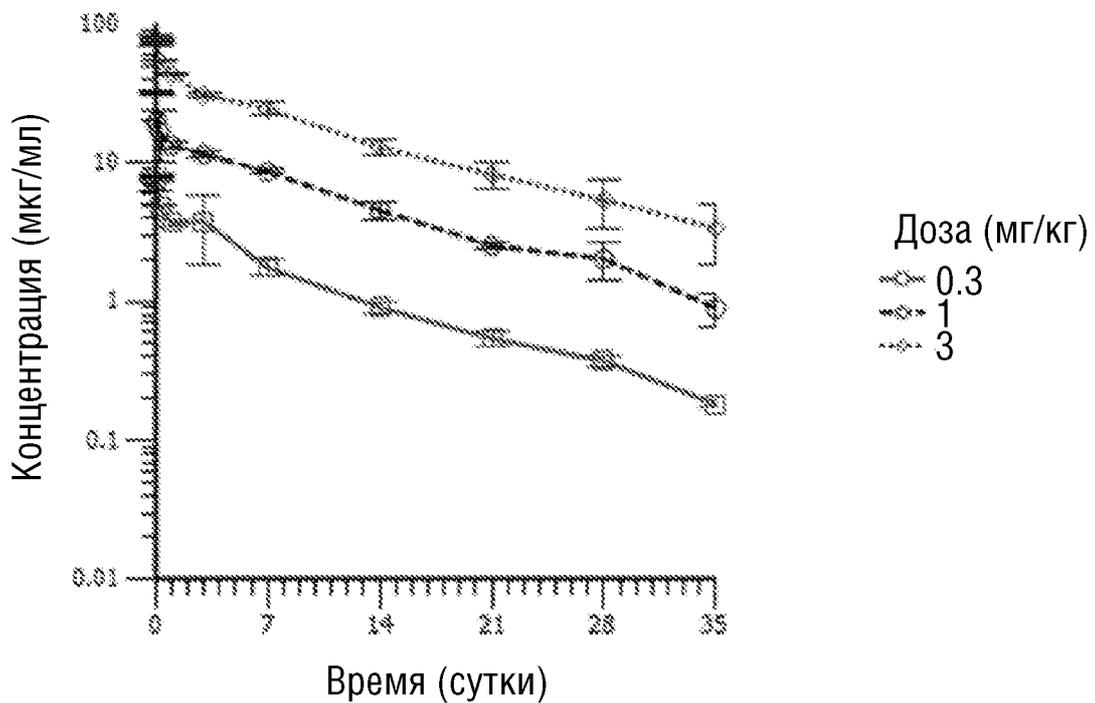


ФИГ.29А

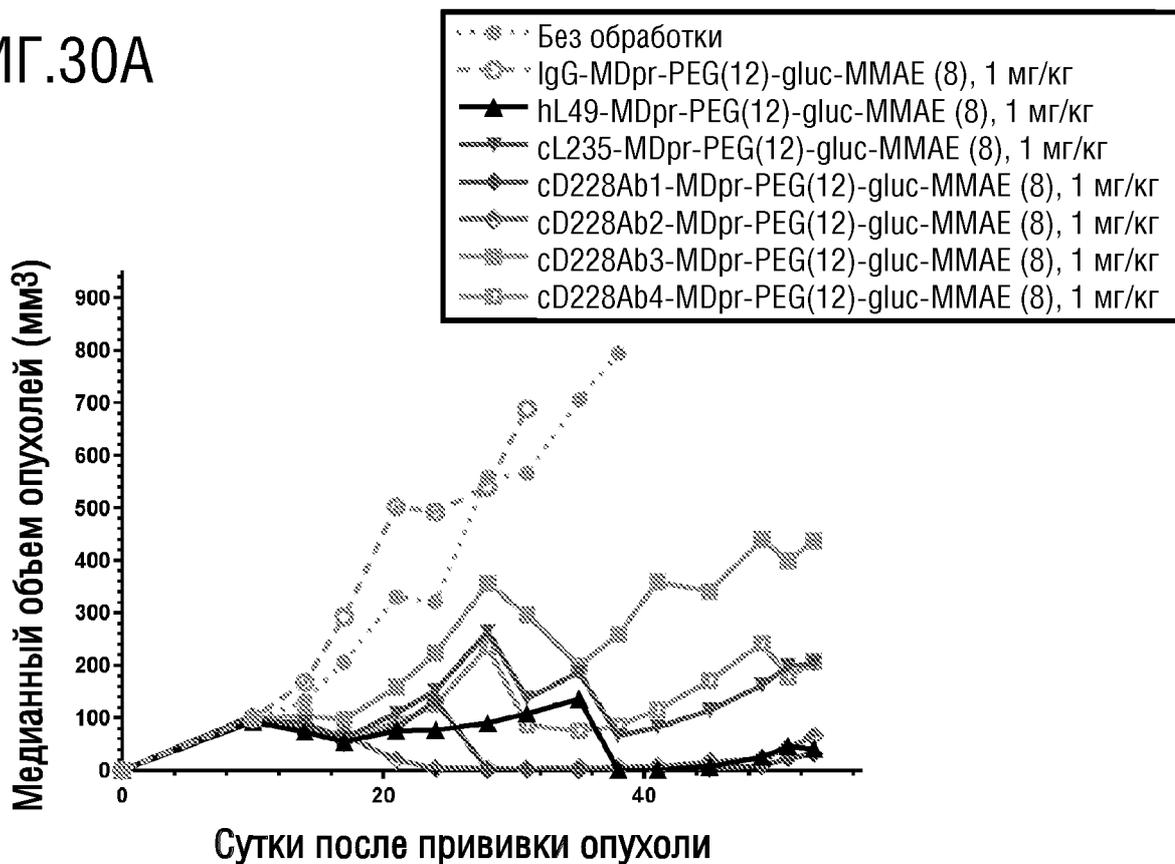
ФК hL49-MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8) у мышей nude



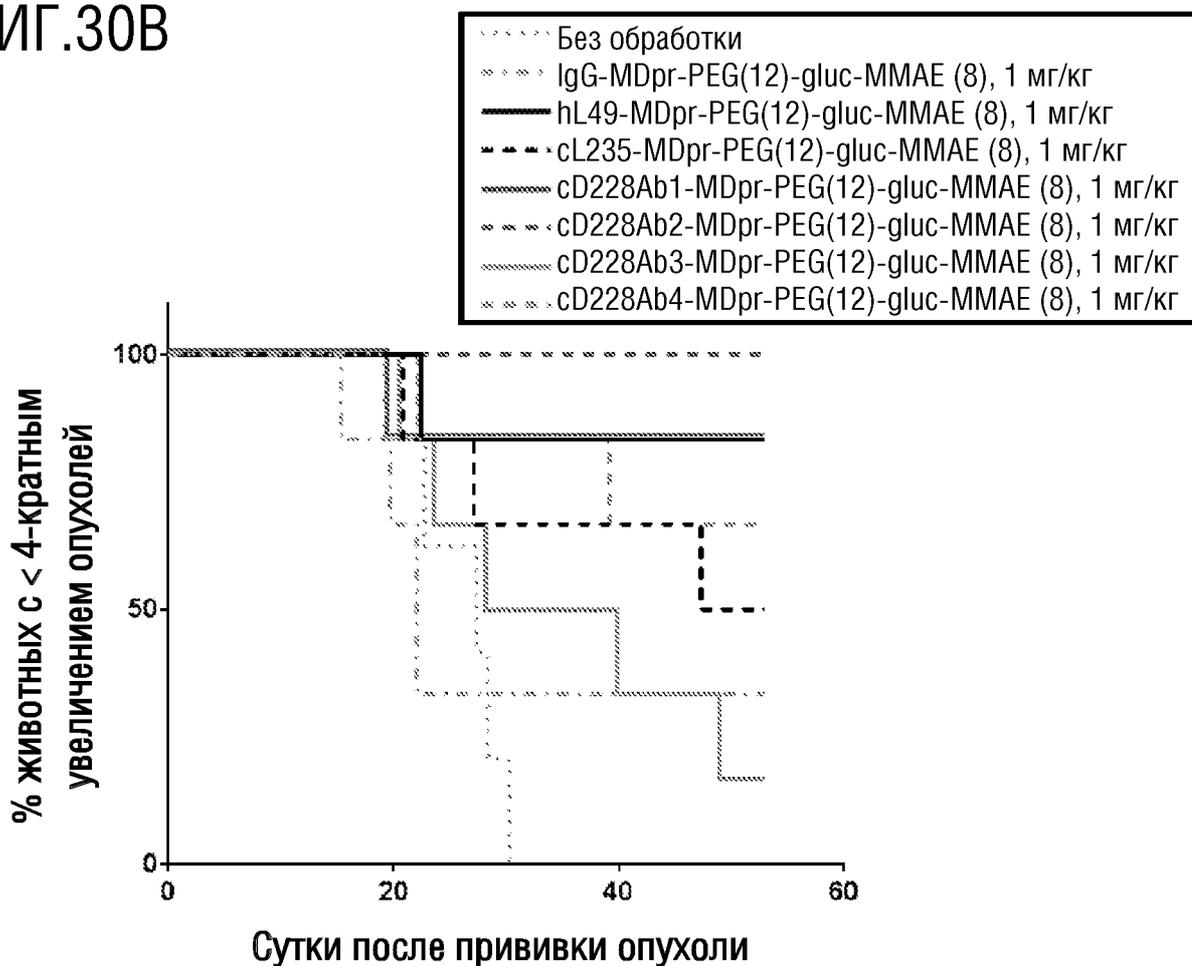
ФИГ.29В



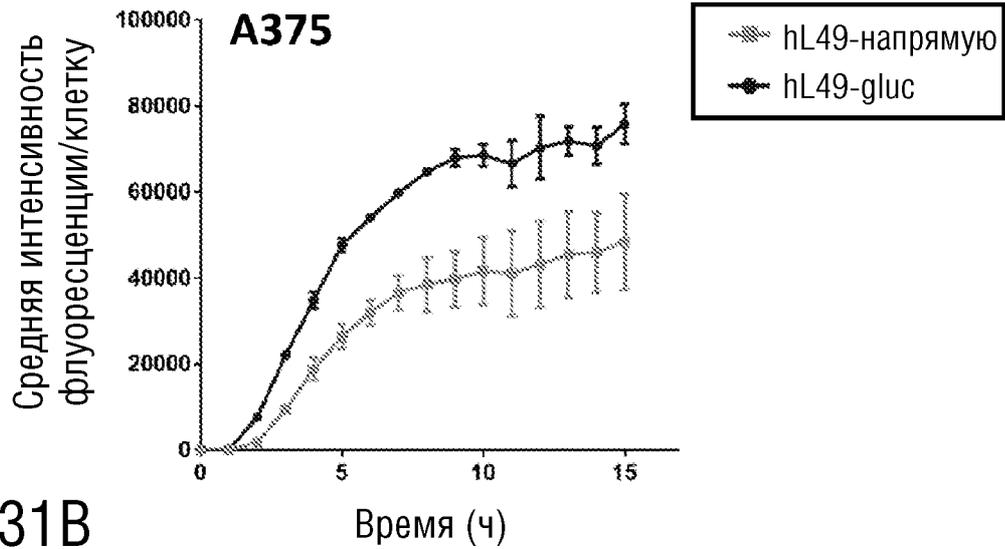
ФИГ.30А



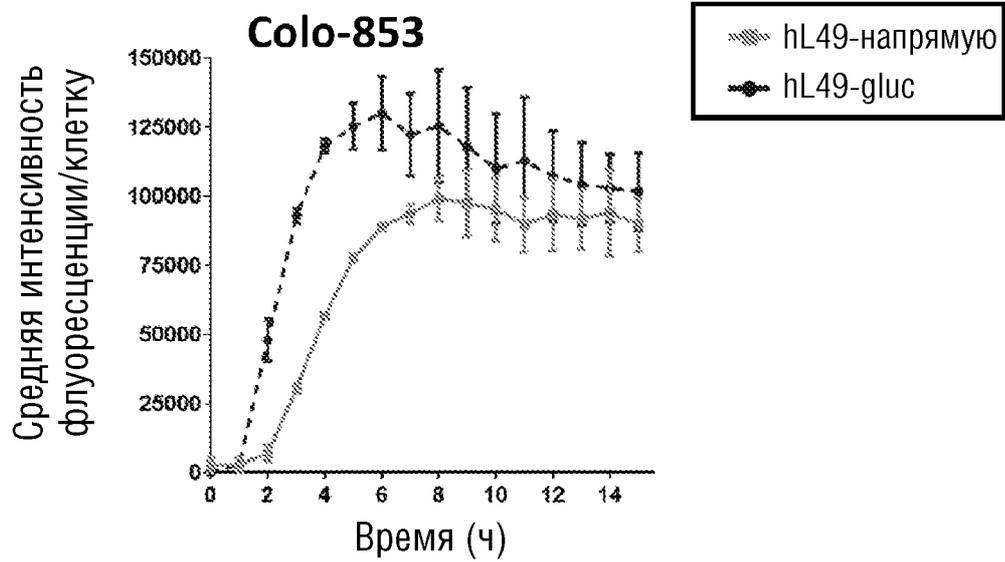
ФИГ.30В



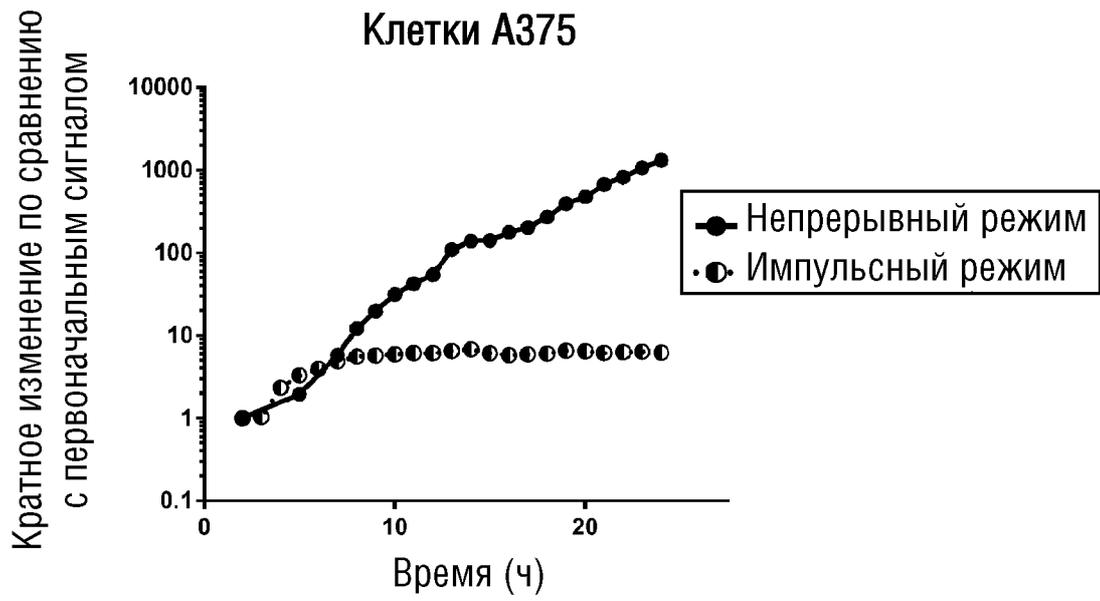
ФИГ.31А



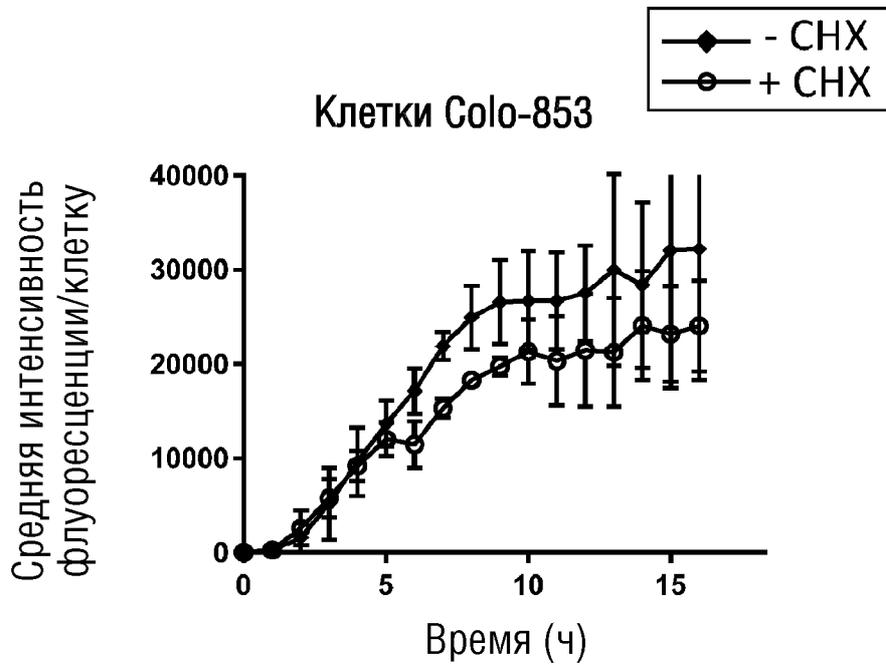
ФИГ.31В



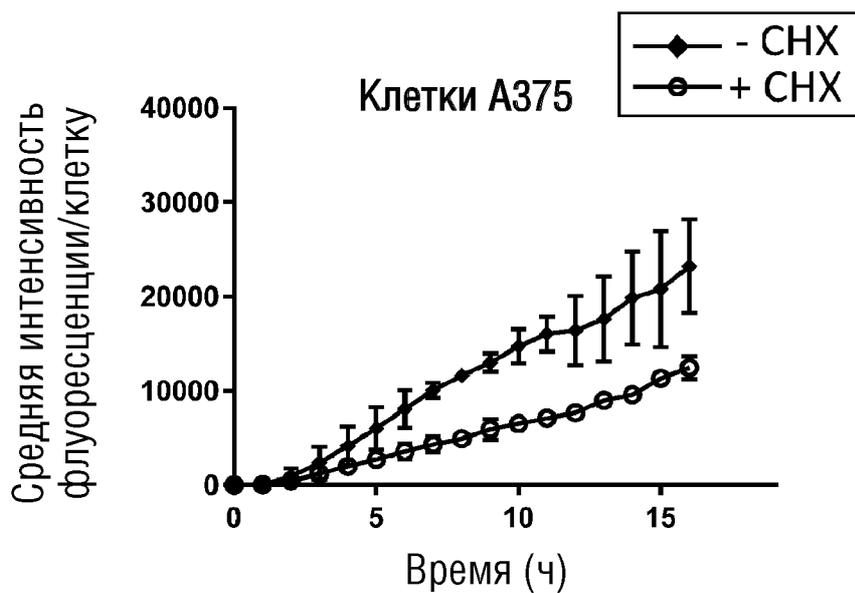
ФИГ.32



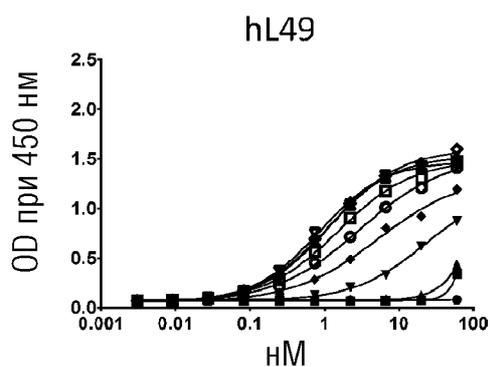
ФИГ.33А



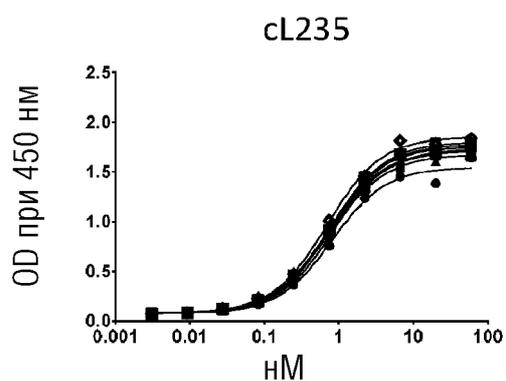
ФИГ.33В



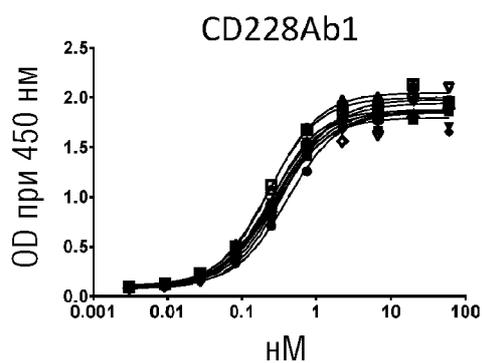
ФИГ.34А



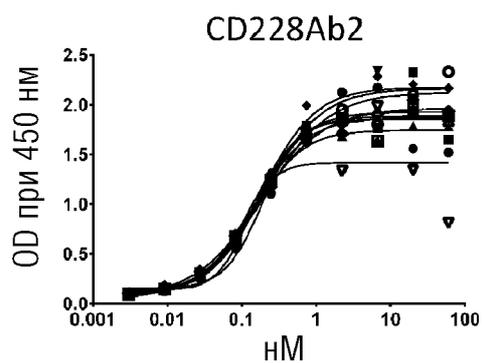
ФИГ.34В



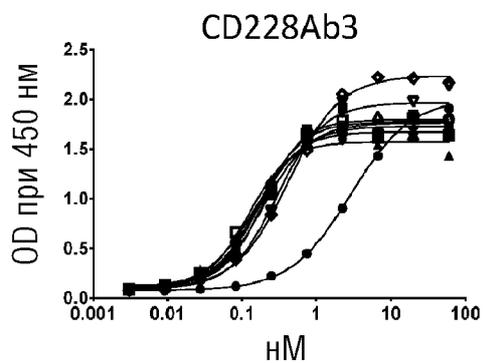
ФИГ.34С



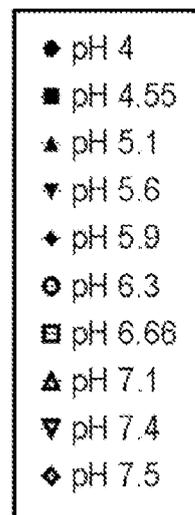
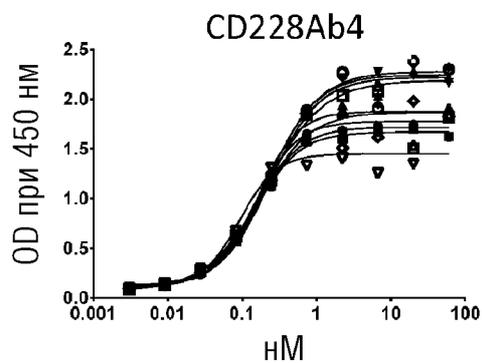
ФИГ.34D



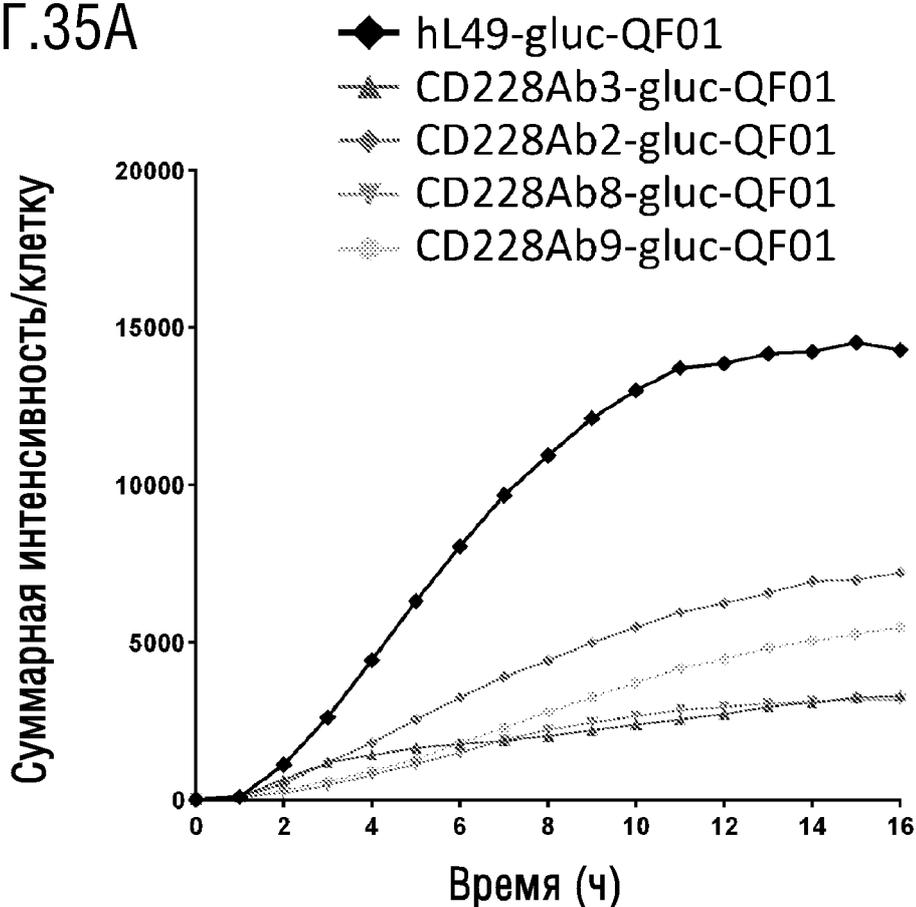
ФИГ.34Е



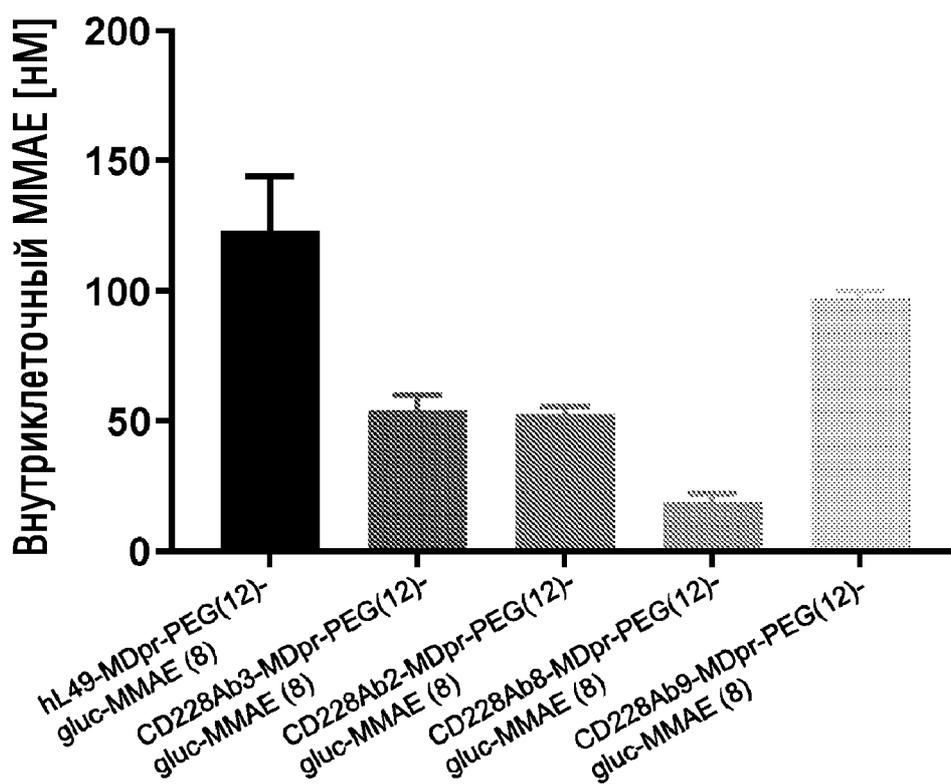
ФИГ.34F



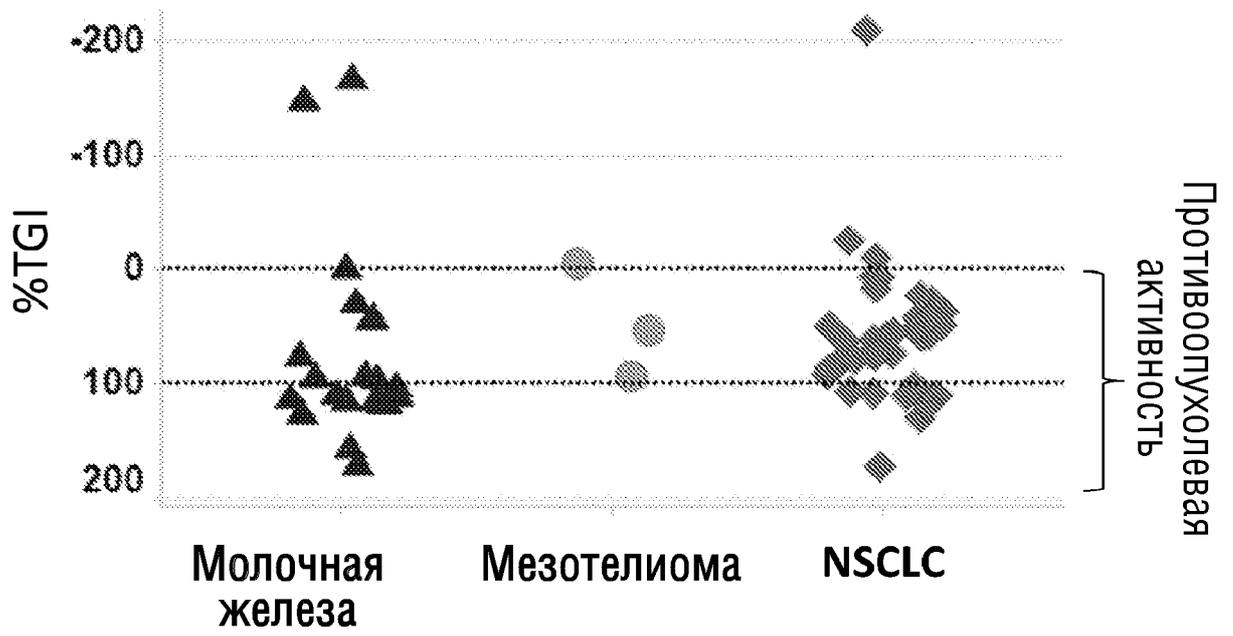
ФИГ.35А



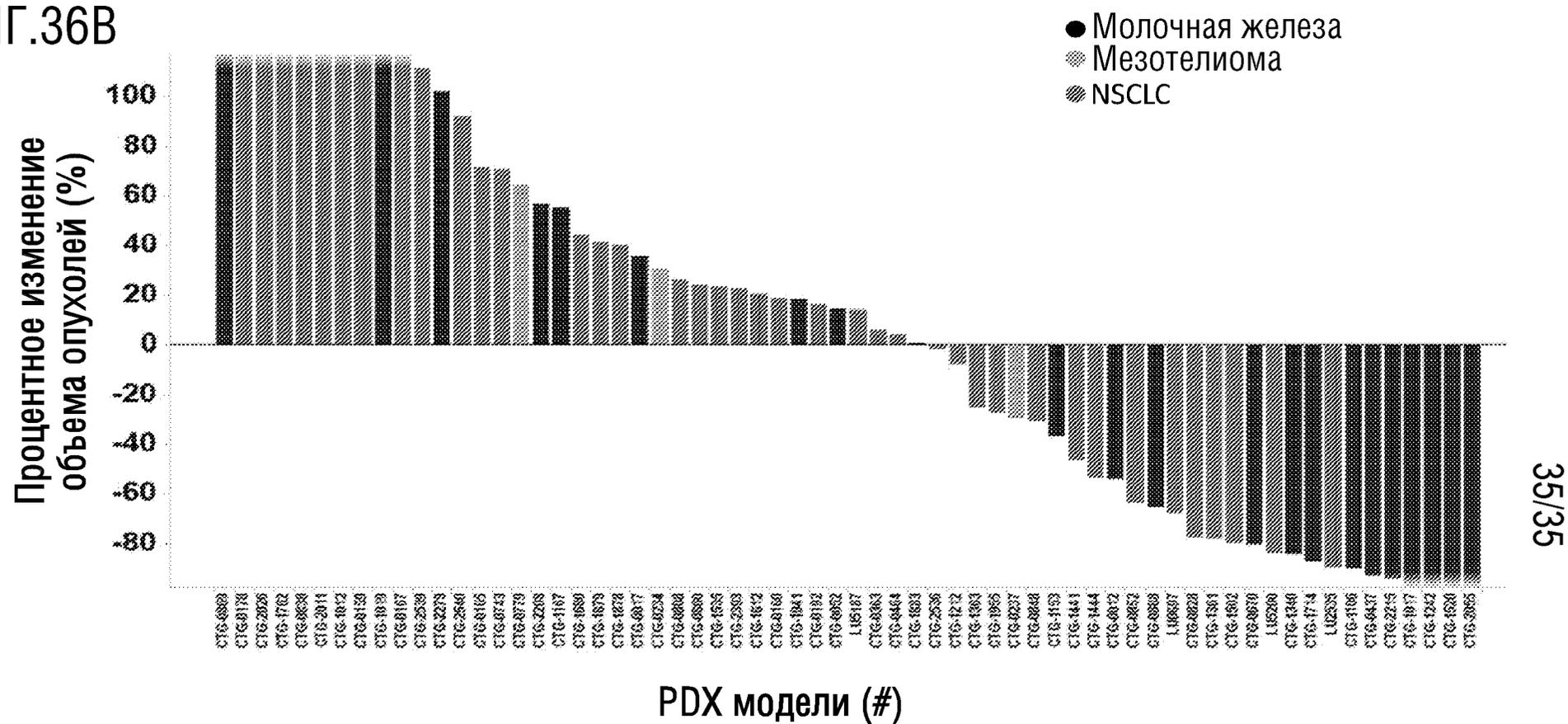
ФИГ.35В



ФИГ.36А



ФИГ.36В



Критерии RESIST	В целом (n=64)	TNBC (n=22)	NSCLC (n=22)
ORR (<-30%)	36%	59%	26%
SD (<20%)	20%	14%	23%
PD (>20%)	44%	27%	51%