



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.12.26

(21) Номер заявки
202090781

(22) Дата подачи заявки
2018.09.20

(51) Int. Cl. **G01N 33/574** (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(54) КОМПОЗИЦИИ И СПОСОБЫ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ОТВЕТА НА NaPi2b-ТАРГЕТИРОВАННУЮ ТЕРАПИЮ

(31) **62/561,107; 62/571,397; 62/718,692**

(32) **2017.09.20; 2017.10.12; 2018.08.14**

(33) **US**

(43) **2020.06.19**

(86) **PCT/US2018/051951**

(87) **WO 2019/060542 2019.03.28**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
МЕРСАНА ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК.
(US)

(72) Изобретатель:
Мошер Ребекка, Полинг Лаура Л.,
Бергстром Дональд А. (US)

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

(56) IBERE CAUDURO SOARES ET AL.: "In Silico Analysis and Immunohistochemical Characterization of NaPi2b Protein Expression in Ovarian Carcinoma With Monoclonal Antibody Mx35", APPLIED IMMUNOHISTOCHEMISTRY AND MOLECULAR MORPHOLOGY, vol. 20, no. 2, 1 March 2012 (2012-03-01), pages 165-172, XP055532979, US ISSN: 1541-2016, DOI: 10.1097/PAI.0b013e318228e232 the whole document abstract page 166, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 4 page 166, left-hand column, last paragraph - right-hand column, paragraph 1 page 166, right-hand column, paragraph 2 page 170, left-hand column, paragraph 1 - paragraph 2 page 170, right-hand column, paragraph 2 - paragraph 3 page 171, left-hand column, paragraph 2 - paragraph 4

WO-A1-2017068097
US-B2-8603474

Gerber DE, Infante JR, Gordon MS, Schiller JH, Spigel D, Wang Y et al.: "Safety, Pharmacokinetics, and Activity of the Anti-NaPi2b Antibody-Drug Conjugate DNIB0600A: A Phase I Study in Patients with Non-Small Cell Lung Cancer and Platinum-Resistant

Ovarian Cancer", IASLC World Lung, Sydney, Australia 15 October 2013 (2013-10-15), XP002787350, Retrieved from the Internet: URL: https://qfuse.com/client_downloads/WL2_013_Gerber_NaPi2b_150ct13.pdf [retrieved on 2018-12-11], the whole document

K. LIN ET AL.: "Preclinical Development of an Anti-NaPi2b (SLC34A2) Antibody-Drug Conjugate as a Therapeutic for Non-Small Cell Lung and Ovarian Cancers", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 21, no. 22, 8 July 2015 (2015-07-08), pages 5139-5150, XP055373355, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-14-3383, the whole document, abstract

NATALYA BODYAK ET AL.: "Abstract 1194: Discovery and preclinical development of a highly potent NaPi2b-targeted antibody -drug conjugate (ADC) with significant activity in patient -derived non -small cell lung cancer (NSCLC) xenograft models", AACR 107TH ANNUAL MEETING 2016; APRIL 16-20, 2016; NEW ORLEANS, LA, vol. 76(Suppl.14), 1 July 2016 (2016-07-01), XP055533120, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2016-1194, published the whole document

EP-A1-2423232

REBECCA MOSHER ET AL.: "Abstract B119: Relationship of NaPi2b expression and efficacy of XMT-1536, a NaPi2b targeting antibody-drug conjugate (ADC), in an unselected panel of human primary ovarian mouse xenograft models", AACR-NCI-EORTC INTERNATIONAL CONFERENCE: MOLECULAR TARGETS AND CANCER THERAPEUTICS, vol. 17(S1), 1 January 2018 (2018-01-01), XP055533090, DOI: 10.1158/1535-7163.TARG-17-B119, published the whole document & Rebecca Mosher, Poling Laura, Qin Liuliang, Bodyak Natalya, Bergstrom Donald: "Relationship of NaPi2b expression and efficacy of XMT-1536, a NaPi2b targeting antibody-drug conjugate (ADC), in an unselected panel of human primary ovarian mouse xenograft models", AACR-NCI-EORTC International Conference 1 October 2017 (2017-10-01), Retrieved from the Internet: URL: http://www.mersana.com/sites/default/files/AACR_EORTC_final_0ct2017.pdf [retrieved on 2018-12-14]

(57) Изобретение относится к реагентам и способам для прогнозирования ответной реакции пациента на лечение NaPi2b-таргетированными конъюгатами антитело-лекарственное средство (например, NaPi2b-таргетированными конъюгатами антитело-полимер-лекарственное средство).

Родственные заявки

По изобретению испрашивается приоритет и преимущества на основании заявки U.S.S.N. 62/561107, поданной 20 сентября 2017 г., заявки U.S.S.N. 62/571397, поданной 12 октября 2017 г., и заявки U.S.S.N. 62/718692, поданной 14 августа 2018 г.; содержание каждой из которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме.

Область техники, к которой относится изобретение

Изобретение относится, главным образом, к композициям и способам для стратификации пациентов, отвечающих и не отвечающих на лечение NaPi2b-таргетированными конъюгатами антитело-полимер-лекарственное средство. Также предложены способы субтипирования немелкоклеточной карциномы легкого.

Предпосылки создания изобретения

NaPi2b (SLC34A2, NaPiIb, Npt2), мультитрансмембранный натрий-зависимый переносчик фосфата (Xu et al. Genomics 62:281-284 (1999)), как правило, экспрессируется в мембране щеточной каймы тонкого кишечника млекопитающих и участвует в трансклеточной абсорбции неорганического фосфата (Pi), внося вклад в поддержание гомеостаза фосфата в организме. Экспрессия NaPi2b на белковом уровне была обнаружена в печени, на апикальной поверхности эпителиальных клеток молочной железы, слюнных желез, а также в легких, яичках, слюнных железах, щитовидной железе, тонком кишечнике и матке. Была установлена связь мутаций в NaPi2b с клиническими синдромами альвеолярного и тестикулярного микролитиаза. NaPi2b экспрессируется на высоком уровне в клетках неплоскоклеточного немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), немущинозного рака яичника и папиллярного рака щитовидной железы. 61% образцов NSCLC и 92% образцов рака яичника являются NaPi2b-положительными при иммунологическом окрашивании.

Рак яичника является одним из наиболее распространенных гинекологических злокачественных заболеваний и занимает пятое место по частоте случаев смерти от рака у женщин. Высокие показатели смертности частично являются результатом того, что рак яичника часто диагностируют на поздних стадиях, и частота случаев смерти составляет примерно 65% от частоты случаев заболевания. Эпителиальные опухоли яичника составляют 58% от всех новообразований яичников и более 90% злокачественных опухолей яичников. Циторедуктивная хирургическая операция и комбинированная терапия на основе соединений платины (включая таксаны) являются современными методами лечения; однако большинство пациентов с рецидивом эпителиального рака яичника погибают от заболевания. Существует потребность в новых способах лечения рака яичника, включая таргетированную терапию, такую как иммунотерапия моноклональными антителами, или подходы на основе противораковых вакцин.

NSCLC представляет собой любой вид эпителиального рака легкого, за исключением мелкоклеточной карциномы легкого (SCLC). NSCLC составляет около 85% всех случаев рака легкого. Заболевания NSCLC, как класс, являются относительно нечувствительными к химиотерапии, в сравнении с мелкоклеточной карциномой. По возможности, их преимущественно лечат путем хирургической резекции с целью излечения, хотя химиотерапию все больше используют как до операции (неoadъювантная химиотерапия), так и после операции (адъювантная химиотерапия). В случаях метастатического или неоперабельного рака используют химиотерапию и/или иммунотерапию, хотя заболевание на этой стадии является в значительной степени неизлечимым и срок выживания остается коротким. Существует потребность в новых способах лечения NSCLC, включая таргетированную терапию, такую как иммунотерапия моноклональными антителами, или подходы на основе противораковых вакцин.

Кроме того, существует потребность в диагностических методах и наборах для прогнозирования ответа на терапию, направленную на виды биологической активности NaPi2b.

Сущность изобретения

В различных аспектах изобретение относится к способам прогнозирования ответной реакции пациента с раком на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство путем определения того, присутствует ли NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, за счет создания контакта образца опухоли с анти-NaPi2b антителом; обнаружения связывания между NaPi2b и антителом; и прогнозирования, что пациент будет отвечать на лечение, если обнаружено присутствие NaPi2b в образце опухоли.

В другом аспекте изобретение относится к способам прогнозирования ответной реакции пациента с раком на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство путем определения того, присутствует ли NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, за счет создания контакта образца опухоли с анти-NaPi2b антителом; обнаружения связывания между NaPi2b и антителом; и выражения результатов в баллах по шкале патологии. Балльный показатель патологии коррелирует с ответной реакцией на лечение.

В следующем аспекте изобретение относится к способам прогнозирования ответной реакции пациента с раком на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство путем измерения уровня экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, за счет создания контакта образца опухоли с анти-NaPi2b антителом; и прогнозирования, что пациент будет отвечать на лечение, если уровень экспрессии NaPi2b в образце опухоли выше заданного порога отсечения.

В различных аспектах способов по изобретению способы дополнительно включают введение NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство субъекту, который, по прогнозу, будет отвечать на лечение.

В другом аспекте изобретение относится к способам лечения рака у субъекта NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство путем определения того, присутствует ли NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, за счет создания контакта образца опухоли с анти-NaPi2b антителом; обнаружения связывания между NaPi2b и антителом; прогнозирования, что пациент будет отвечать на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство, если обнаружено присутствие NaPi2b в образце опухоли; и введения NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство субъекту, который, по прогнозу, будет отвечать на лечение.

В различных способах прогнозирования осуществляют путем выражения результатов обнаружения белка NaPi2b в баллах по шкале патологии. Балльный показатель патологии коррелирует с ответной реакцией на лечение. Балльный показатель патологии является количественным или полуколичественным балльным показателем. Например, балльный показатель патологии определяют методом световой микроскопии или путем анализа изображения.

Альтернативно, прогнозирования осуществляют путем определения того, что уровень экспрессии NaPi2b в образце опухоли выше заданного порога отсечения. Заданный порог отсечения рассчитывают, например, методом суммарной оценки ("Н-балл").

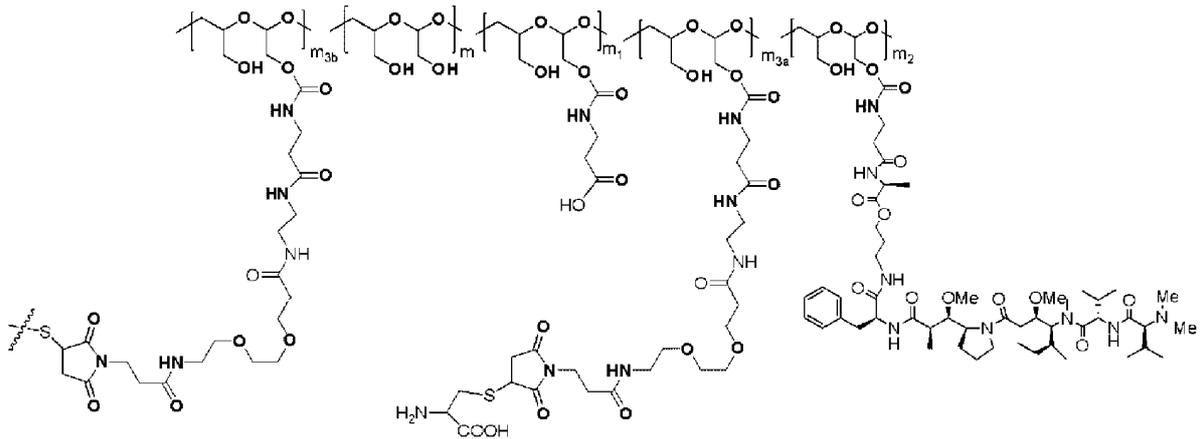
В следующем аспекте изобретение относится к способам субтипирования немелкоклеточной карциномы легкого как аденокарциномы путем определения того, присутствует ли NaPi2b в образце немелкоклеточной карциномы легкого, за счет создания контакта образца с анти-NaPi2b антителом и обнаружения связывания между NaPi2b и антителом; и субтипирования немелкоклеточной карциномы легкого как аденокарциномы, если обнаружено присутствие NaPi2b в образце. Необязательно, способ также включает обнаружение одного или более из TTF-1, напсина А, р63, р40 или CK5/6 в образце немелкоклеточной карциномы легкого.

Рак представляет собой NaPi2b-экспрессирующий рак. Примеры включают, но не ограничиваются ими, рак легкого, рак яичника, рак молочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак щитовидной железы, почечноклеточный рак, аденокарциному протоков слюнных желез, рак эндометрия, холангиокарциному, папиллярный рак щитовидной железы или папиллярный почечноклеточный рак. Рак легкого представляет собой, например, немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC). В некоторых аспектах NSCLC представляет собой неплоскоклеточную NSCLC. В некоторых аспектах NSCLC субтипирована как аденокарцинома. Рак яичника представляет собой, например, эпителиальный рак яичника. Рак яичника представляет собой, например, чувствительный к соединениям платины рак яичника. Рак яичника представляет собой, например, рефрактерный к соединениям платины рак яичника.

Антитело NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство представляет собой ХМТ-1535. Предпочтительно, антитело NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство содержит: определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFYGYNIH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 7), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой, например, NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатина.

NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство имеет следующую формулу:



где: m представляет собой целое число от 1 до примерно 300,
 m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 140,
 m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 40,
 m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 17,
 m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8;
сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 18; и
сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 15 до примерно 300;

концевой фрагмент  означает присоединение одного или более полимерных каркасов к NaPi2b-таргетированному антителу XMT-1535.

Обнаружение проводят, например, иммуногистохимическими методами. Предпочтительно, анти-NaPi2b антитело обнаруживают с использованием меченого вторичного антитела.

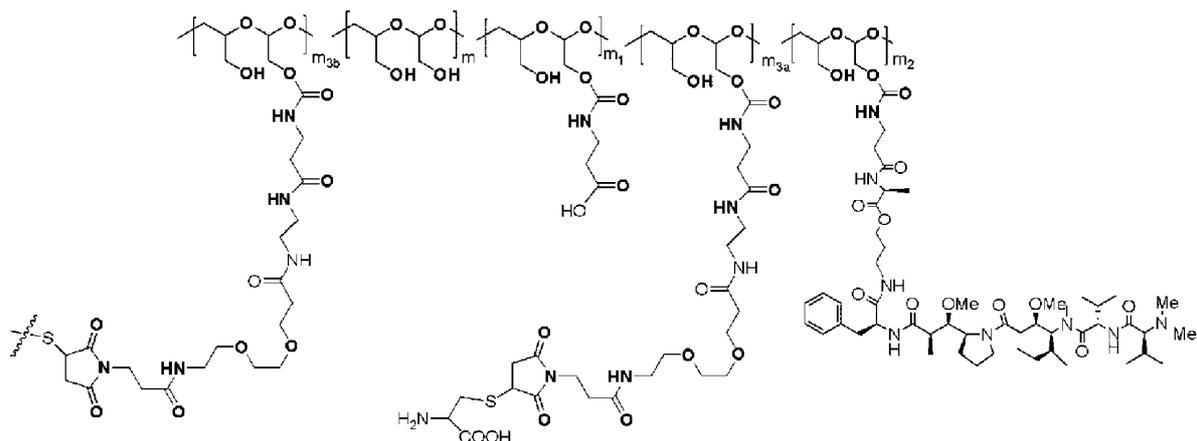
Анти-NaPi2b антитело представляет собой химерное антитело. Химерное антитело содержит переменную область человеческого антитела и константную область не принадлежащего человеку антитела. Химерное антитело содержит переменную область антитела XMT-1535. Константная область не принадлежащего человеку антитела происходит из кроличьего антитела.

Образец представляет собой, например, но без ограничения, фиксированный в формалине залитый парафином образец.

Изобретение также относится к химерному антителу, содержащему: определяющую комплементарность область 1 переменной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFYGYNTH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 переменной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 переменной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), определяющую комплементарность область 1 переменной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), определяющую комплементарность область 2 переменной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 7), определяющую комплементарность область 3 переменной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8). В некоторых аспектах химерное антитело содержит переменную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 1 и переменную область легкой цепи с SEQ ID NO: 2. Константная область представляет собой, например, но без ограничения, константную область кроличьего антитела. Например, химерное антитело содержит константную область тяжелой цепи кроличьего IgG1 и константную область легкой цепи каппа кроличьего антитела. В предпочтительных вариантах осуществления химерное антитело содержит константную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 11 и константную область легкой цепи с SEQ ID NO: 12.

Изобретение также относится к плазмидам, содержащим нуклеиновую кислоту с SEQ ID NO: 17 и/или SEQ ID NO: 18, и клеткам, содержащим плазмиду.

Изобретение также относится к способам лечения папиллярного рака щитовидной железы, папиллярного почечноклеточного рака, аденокарциномы протоков слюнных желез, рака эндометрия или холангиокарциномы, включающим введение субъекту NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство в количестве, достаточном для ослабления симптома рака. NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой, например, любой конъюгат, раскрытый в WO 2017/160754. Например, NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой:



где: m представляет собой целое число от 1 до примерно 300,
 m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 140,
 m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 40,
 m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 17,
 m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8;
сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 18;
сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 15 до примерно 300; и

концевой фрагмент  означает присоединение одного или более полимерных каркасов к NaPi2b-таргетированному антителу XMT-1535.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют то значение, которое им обычно придают специалисты в области, к которой относится настоящее изобретение. В спецификации термины в единственном числе также включают термины во множественном числе, если из контекста явно не следует иначе. При том, что способы и материалы, аналогичные или эквивалентные тем, которые описаны в настоящем документе, можно использовать на практике, или при тестировании, настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. В случае конфликта настоящая спецификация, включая определения, будет иметь преимущественную силу. Кроме того, материалы, способы и примеры являются исключительно иллюстративными и не должны быть ограничивающими.

Другие признаки и преимущества изобретения станут очевидны из следующего далее подробного описания и формулы изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показана структура химерного антитела на основе гуманизированного анти-NaPi2b антитела XMT-1535. Химерное антитело в настоящем документе имеет название MERS67.

На фиг. 2 представлена фотография, демонстрирующая результаты анализа антитела Mers67 методом SDS-ПААГ и вестерн-блоттинга.

На фиг. 3А представлены результаты анализа методом ЭХ-ВЭЖХ MERS67 после одноэтапной очистки.

На фиг. 3В представлены результаты анализа методом ЭХ-ВЭЖХ MERS67 после двухэтапной очистки.

На фиг. 4 представлена фотография, демонстрирующая результаты репрезентативного иммуногистохимического окрашивания ксенотрансплантатов OVCAR3 и JMT-1.

На фиг. 5 показаны результаты иммуногистохимического окрашивания двух образцов человеческих аденокарцином легкого.

На фиг. 6 представлена гистограмма, показывающая средний лучший ответ в доклиническом испытании на мышинной модели рака яичника с использованием NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытого в WO 2017/160754, $n=3$, 3 мг/кг еженедельно $\times 3$. На оси y показан средний лучший ответ; на оси x показан номер модели. Темные столбики соответствуют ранее не поддающимся лечению опухолям, и светлые столбики соответствуют опухолям после лечения.

На фиг. 7 представлена гистограмма, показывающая модели рака яичника START, расположенные в порядке, основанном на показателях среднего лучшего ответа, и окрашенные в соответствии с Н-баллами (все модели). Более темный цвет соответствует большему Н-баллу. На оси y показан средний лучший ответ; на оси x показан номер модели.

На фиг. 8 представлена диаграмма разброса данных для человеческих опухолей и ксенотрансплантатов легкого и яичника. Диаграмма построена на основании Н-баллов (ось y) и типов ткани (ось x), окрашена в зависимости от среднего лучшего ответа для ксенотрансплантатов. Более светлый цвет соответствует более выраженному противоопухолевому эффекту; более темный цвет соответствует менее

выраженному противоопухолевому эффекту.

На фиг. 9 представлена коробчатая диаграмма, демонстрирующая полученные методом RNAseq данные, извлеченные из TCGA, показывающие дифференциальную экспрессию NaPi2b, напсина A, CK5 и TTF1 в SCC и ACC легкого. Иммуногистохимическое обнаружение белковой экспрессии таких панелей, как напсин A, CK5 и TTF1, можно использовать для классификации плоскоклеточной карциномы легкого и аденокарциномы легкого. Определение экспрессии NaPi2b можно использовать в качестве дополнения к используемой в настоящее время панели.

На фиг. 10 представлена диаграмма разброса данных, демонстрирующая полученные методом RNAseq данные, извлеченные из TCGA. Данные для NaPi2b показаны на оси x, и данные для напсина A показаны на оси y. Экспрессия цитокератина 5 показана цветом, при этом самый темный цвет соответствует наивысшему уровню экспрессии. Большинство тканей, аннотированных как плоскоклеточная карцинома (в форме кружков), находятся внутри очерченного жирной линией овала. Большинство тканей, аннотированных как аденокарцинома (в форме квадратов), находятся в верхнем правом квадранте графика. Некоторые опухоли, классифицированные как плоскоклеточная карцинома, также расположенные в правом верхнем квадранте, находятся в круге, очерченном пунктирной линией, и экспрессируют цитокератин на низком уровне. Использование такого белкового маркера, как NaPi2b, может способствовать уточнению классификации опухолей, таких как те, которые находятся в очерченном пунктирной линией круге.

На фиг. 11 представлены предварительные данные в TCGA на 21 мая 2018 г. для SCC и ACA легкого, извлеченные из cBioPortal и использованные для построения графика, показывающего относительную экспрессию РНК NaPi2b в сравнении с генами TTF-1, напсина A, CK5 и p63, некоторыми генами, белковые продукты которых часто используют для различения SCC и ACA. В верхнем ряду показаны результаты РНК для ACA, и в нижнем ряду показаны результаты РНК для SCC. Данные для NaPi2b показаны на оси x.

На фиг. 12 представлены предварительные данные RNAseq в TCGA на 21 мая 2018 г. для SCC и ACA легкого, извлеченные из cBioPortal и использованные для построения индивидуальных графиков, показывающих взаимоотношение генов SCL34A2, TTF-1, напсина A, CK5 и p63 в случае ACA и SCC. В каждом графике результаты для ACA находятся слева, и данные для SCC находятся справа. На оси y показана степень экспрессии РНК, определенная методом RNAseq.

На фиг. 13 показаны H-баллы, полученные при ИГХ оценке NaPi2b в микропанели опухолей SCC и ACA.

На фиг. 14 представлена коробчатая диаграмма H-баллов для того же набора тканей, когда гистологический подтип был дополнительно охарактеризован с использованием ИГХ окрашивания на p40 и TTF-1.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к композициям и способам для идентификации субъекта, способного отвечать на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство (таким как конъюгат анти-NaPi2b антитело-полимер-лекарственное средство).

Настоящее изобретение частично основано на том открытии, что конъюгат анти-NaPi2b антитело-полимер-лекарственное средство, (ADC), включающий полностью гуманизованное IgG1 антитело против NaPi2b, XMT-1535, продемонстрировал противоопухолевый эффект в моделях рака легкого и рака яичника. (Смотри WO 2017/160754, содержание которого включено посредством ссылки в полном объеме).

Эффективность ADC определяется, по меньшей мере частично, степенью или паттерном экспрессии мишени в опухоли или в модельной опухоли. Для точного описания паттерна экспрессии NaPi2b в моделях человеческих опухолей и в первичных человеческих опухолях был разработан реагент, MERS67 (также известный как MER67), и валидирован для иммуногистохимии (ИГХ). Понимание экспрессии NaPi2b в человеческих опухолях позволит обеспечивать более рациональную и персонализированную терапию для пациентов с формами рака, экспрессирующими NaPi2b.

MERS67 представляет собой химерное человеческое-кроличье антитело на основе гуманизованного анти-NaPi2b антитела XMT-1535. XMT-1535 представляет собой антитело в ADC, раскрытом в WO 2017/160754. В частности, MERS67 содержит вариабельную область тяжелой и легкой цепи гуманизованного антитела XMT-1535 в сочетании с константной областью кроличьего IgG1 или C-областью цепи каппа-b4 кроличьего Ig, соответственно.

Соответственно, настоящее изобретение частично относится к анти-NaPi2b химерному антителу. Более конкретно, настоящее изобретение относится к анти-NaPi2b химерному антителу на основе вариабельных областей XMT-1535. Изобретение также относится к способам прогнозирования ответной реакции пациента с раком на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытым в WO 2017/160754, путем определения уровней экспрессии NaPi2b в образце опухоли. В конкретных вариантах осуществления уровни экспрессии NaPi2b в образце опухоли определяют иммуногистохимическими методами с использованием MERS67.

Настоящее изобретение также частично относится к способу идентификации пациентов, которым

может принести пользу лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытым в WO 2017/160754, путем (i) определения уровней экспрессии NaPi2b в образце опухоли иммуногистохимическими методами с использованием MERS67 и (ii) информирования пациента, что ему может принести пользу лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство.

Настоящее изобретение также частично относится к способу прогнозирования ответной реакции пациента с раком на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, включающему этапы (i) определения уровней экспрессии NaPi2b в образце опухоли иммуногистохимическими методами с использованием MERS67 и (ii) классифицирования пациента, как имеющего высокую вероятность ответа на лечение, при этом уровень NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, соответствующий, или превышающий заданный порог отсечения, указывает на то, что пациент имеет повышенную вероятность получить пользу от лечения NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство. Настоящее изобретение также частично относится к способу определения вероятности того, что пациент с раком получит пользу от лечения NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, включающему:

определение уровня экспрессии NaPi2b в образце, полученном от пациента, при этом уровень NaPi2b в образце, полученном от пациента, соответствующий, или превышающий заданный порог отсечения, указывает на то, что пациент имеет повышенную вероятность получить пользу от противораковой терапии.

Настоящее изобретение также частично относится к способу оптимизации терапевтической эффективности противораковой терапии с применением NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, включающему: определение уровней экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, при этом уровень NaPi2b в образце, полученном от пациента, соответствующий, или превышающий заданный порог отсечения, указывает на то, что пациент имеет повышенную вероятность получить пользу от терапии NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство.

Настоящее изобретение также частично относится к способу лечения рака у пациента, включающему определение того, что образец опухоли, полученный от пациента, имеет уровень NaPi2b, соответствующий или превышающий уровень NaPi2b в эталонном образце, и введение эффективного количества NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство указанному пациенту, за счет чего происходит лечение рака.

Настоящее изобретение также частично относится к способу мониторинга эффективности лечения рака у пациента, включающему определение того, что образец опухоли, полученный от пациента, имеет уровень NaPi2b, соответствующий или превышающий уровень NaPi2b в эталонном образце, и введение эффективного количества NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство указанному пациенту, за счет чего происходит лечение рака.

Настоящее изобретение позволяет онкологам более эффективно проводить мониторинг и/или проводить более агрессивное и оптимальное профилактическое вмешательство, или лечение, для определенных групп пациентов.

Химерные анти-NaPi2b антитела.

Настоящее изобретение относится к химерным антителам, имеющим переменные области человеческого антитела и константные области антитела, отличные от человеческого. В частности, химерные антитела, описанные в настоящем документе, специфически узнают экспрессируемый NaPi2b. Иллюстративные переменные области человеческого антитела, используемые в химерных антителах, раскрытых в настоящем документе, включают, например, переменные области анти-NaPi2b антитела, описанного в WO 2017/160754 и называемого ХМТ-1535. Антитела ХМТ-1535 обладают специфичностью для человеческого NaPi2b, и они, как показано, ингибируют функциональную активность NaPi2b *in vitro*.

Специфическое химерное анти-NaPi2b антитело по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи (VH) и переменную область легкой цепи (VL), с аминокислотными и нуклеотидными последовательностями, приведенными ниже.

Определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и легкой цепи подчеркнуты в аминокислотных последовательностях, приведенных ниже. Аминокислоты, составляющие определяющие комплементарность области (CDR) антитела ХМТ-1535, определены в соответствии с E.A. Kabat et al. (Смотри Kabat, E.A., et al., Sequences of Protein of immunological interest, пятое издание, US Department of Health and Human Services, US Government Printing Office (1991)) и раскрыты в патенте США 8603474, и аминокислоты, составляющие CDR антитела 10H1.11.4B, являются такими, как указано в патенте США № 8535675.

Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи ХМТ-1535

QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYNIHVWKQAPGQGLEWIGAIYP
GNGDTSYKQKFRGRATLTADTSTSTVYMESSLRSEDSAVYYCARGETARATFAYWGQ
 GTLVTVSSG (SEQ ID NO: 1)

CDRH1: GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3)

CDRH2: AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4)

CDRH3: GETARATFAY (SEQ ID NO: 5)

Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи XMT-1535

CAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAGGTTGTGAAACCTGGCGCCTCTGT
 GAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCAGGCTACAACATCCACTGGG
 TCAAGCAGGCCCTGGACAGGGACTCGAATGGATCGGAGCCATCTATCCCGGCAAC
 GCGACACCAGCTACAAGCAGAAGTTCGGGGCAGAGCCACACTGACCGCCGATAAC
 AAGCACCAGCACCCTGTACATGGAAGTCTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACAGCGCC
 GTGTACTATTGCGCCAGAGGCGAAACAGCCAGAGCCACCTTTGCCTATTGGGGCCA
 GGAACCTGGTACCAGTCTAGCTCT (SEQ ID NO: 9)

Аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи XMT-1535

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQDIGNFLNWFYQQKPGKTVKVLIIYYSLLY
 SGVPSRFSGSGSDYTLTISSLQPEDFATYYCQQYSKLPLTFGQGTKLELKR (SEQ ID
 NO: 2)

CDRL1: SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6)

CDRL2: YTSSLYS (SEQ ID NO: 7)

CDRL3: QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8)

Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи XMT-1535

GATATTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA
 GAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGATATCGGCAACTTCCTGAACTGGTATC
 AGCAGAAACCCGCAAGACCGTGAAGGTGCTGATCTACTACACCTCCAGCCTGTAC
 AGCGGCGTGCCAGCAGATTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACACCTGACC
 ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAAG
 CTGCCCCGTGACATTTGGCCAGGGACCAAGCTGGAAGTGAAG (SEQ ID NO: 10).

Константная область химерных антител по изобретению может быть получена из антитела любого биологического вида, кроме человека. Например, константные области тяжелой и легкой цепей получают, например, но без ограничения, из антитела кролика, мыши, крысы, лошади, коровы или курицы.

В некоторых аспектах химерное антитело по изобретению содержит константную область тяжелой цепи кроличьего антитела и константную область легкой цепи кроличьего антитела. Например, химерное антитело по изобретению содержит константную область кроличьего IgG1 и константную область каппа-цепи кроличьего Ig.

В предпочтительном варианте осуществления химерное антитело по изобретению содержит кроличью константную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL), аминокислотные и нуклеотидные последовательности которых приведены ниже.

Аминокислотная последовательность константной области кроличьего IgG1

GQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGCLVKGYLPEPVTVTWNSGTLTNGVRTFPSVRQ
 SSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVANPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLGGPSVFIFFPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPPLREQQFNSTIRVVSTLPIAH
 EDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPREELSSRSVSLTCMINGFY
 PSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSFLYSKLSVPTSEWQRGDVFTCSVMHEALHN
 NYTQKISIRSPGK (SEQ ID NO: 11)

Аминокислотная последовательность константной области каппа-b4 кроличьего Ig

RDPVAPTVLIFPPAADQVATGVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTP
 QNSADCTYNLSSTLTLTSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 12)

Нуклеотидная последовательность константной области кроличьего IgG1

GGACAGCCTAAGGCTCCCAGCGTGTCCCTCTGGCTCCTTGCTGTGGCGATACCC
 TAGCAGCACAGTGACTGGGTGTCTGGTCAAGGGCTACCTGCCTGAACCTGTGACCGT
 GACCTGGAATAGCGGCACCTGACCAACGGCGTGCAGCATTTCTAGCGTCAGACAGA
 GCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGCGTGGTGTCTGTGACCAGCAGCTCTCAGCCTGTGA
 CCTGCAATGTGGCCATCCTGCCACCAACACCAAGGTGGACAAAACCGTGGCTCCCTCCA
 CCTGTAGCAAGCCCACATGTCTCCACCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTCCGTGTTTATCT
 TCCCACCTAAGCCTAAGGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTG
 GTGGTGGACGTGTCCGAGGATGATCCTGAGGTGCAGTTCACCTGGTACATCAACAACGA
 GCAAGTGCGGACCGCCAGACCTCCTCTGAGAGAGCAGCAGTTC AACAGCACCATCAGAG
 TGGTGTCTACCCTGCCTATCGCTCAGGAGATTGGCTGCGGGGCAAAGAGTCAAGTGCA
 AAGGTGCACAACAAGGCCCTGCCTGCTCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAGAGGC
 CAGCCACTGGAACCCAAGGTGTACACAATGGGCCCTCCAAGAGAGGAACTGTCCAGCAG
 ATCCGTGTCTCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCAGCGACATCAGCGTGAATG
 GGAGAAGAATGGCAAGGCCGAGGACA ACTACAAGACAACCCCTGCCGTGCTGGATAGC
 GACGGCAGCTACTTCTGTACAGCAAGCTGAGCGTGCCACCTCTGAATGGCAACGGGG
 AGATGTGTTTACCTGCAGCGTGATGCAGGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAA
 GTCCATCAGCAGGTCCCCAGGCAAA (SEQ ID NO: 13)

Нуклеотидная последовательность константной области каппа-b4 кроличьего Ig

AGGGATCCTGTGGCTCCCACCGTGCTGATTTTTCCACCAGCCGCTGATCAGGTGGC
 CACTGGCACAGTGACAATCGTGTGCGTGGCCAACAAGTACTTCCCGACGTGACCGTGAC
 CTGGGAAGTCGATGGCACCACACAGACCACAGGCATCGAGAACAGCAAGACCCCTCAGA
 ACAGCGCCGACTGCACCTACAACCTGAGCAGCACCCTGACACTGACCAGCACACAGTAC
 AACAGCCACAAGAGTACACCTGTAAGTACCCAGGGCACAACCAGCGTGGTGCAGAG
 CTTCAACAGAGGCGATTGC (SEQ ID NO: 14).

В более предпочтительном варианте осуществления химерное анти-NaPi2b антитело MERS67 со-
 держит аминокислотные и нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей, приведенные ни-
 же.

Аминокислотная последовательность тяжелой цепи химерного анти-NaPi2b антитела

QVQLVQSGAEVVKPGASVKMSCKASGYTFTGYNHWVKQAPGQGLEWIGAIYP
 GNGDTSYKQKFRGRATLTADTSTSTVYMESSLRSEDSAVYYCARGETARATFAYWGQ
 GTLTVVSSGQPKAPSVFPLAPCCGDTSPSTVTLGLVKGYPVTVTWNSGTLTNGVR
 TFPVSRQSSGLYSLSSVSVTSSSQPVTCNVANHPATNTKVDKTVAPSTCSKPTCPPPELLG
 GPSVFIFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEDDPEVQFTWYINNEQVRTARPLREQQF
 NSTIRVVSTLPIAHEDWLRGKEFKCKVHNKALPAIEKTISKARGQPLEPKVYTMGPPRE
 ELSSRSVSLTCMINGFYPSDISVEWEKNGKAEDNYKTTPAVLDSGYSYFLYSKLSVPTSE
 WQRGDVFTCSVMHEALHNHYTQKSISRSPGK (SEQ ID NO: 15)

Аминокислотная последовательность легкой цепи химерного анти-NaPi2b антитела

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCSASQDIGNFLNWYQQKPGKTVKVLIIYTSLSYSGVPS
 RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCQQYSKLPLTFGQGTKLELKRDPVAVPTVLIFFPA
 ADQVATGTVTIVCVANKYFPDVTVTWEVDGTTQTGTIENSKTPQNSADCTYNLSSTLTL
 TSTQYNSHKEYTCKVTQGTTSVVQSFNRGDC (SEQ ID NO: 16)

Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи химерного анти-NaPi2b антитела

CAAGTTCAGCTGGTTCAGTCTGGCGCCGAGGTTGTGAAACCTGGCGCCTCTGT
 GAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTACCGGCTACAACATCCACTGGG
 TCAAGCAGGCCCTGGACAGGACTCGAATGGATCGGAGCCATCTATCCCGGCAAC
 GGCGACACCAGCTACAAGCAGAAGTCCGGGGCAGAGCCACACTGACCGCCGATAC
 AAGCACCAGCACCGTGTACATGGAAGTGTGAGCAGCCTGAGAAGCGAGGACAGCGCC
 GTGTAATTTGCGCCAGAGGCGAAACAGCCAGAGCCACCTTTGCCTATTGGGGCCA
 GGGAACCTGGTACCGTTAGCTCTGGACAGCCTAAGGCTCCCAGCGTGTTCCTCT
 GGCTCCTTGCTGTGGCGATACCCCTAGCAGCACAGTGACACTGGGCTGTCTGGTCAA
 GGGCTACCTGCCTGAACCTGTGACCGTGACCTGGAATAGCGGCACCCTGACCAACG
 CGGTGCGGACATTTCTAGCGTCAGACAGAGCAGCGGCCTGTACTCTCTGAGCAGC

GTGGTGTCTGTGACCAGCAGCTCTCAGCCTGTGACCTGCAATGTGGCCCATCCTGCC
 ACCAACACCAAGGTGGACAAAACCGTGGCTCCCTCCACCTGTAGCAAGCCCACATG
 TCCTCCACCAGAGCTGCTCGGAGGCCCTCCGTGTTTATCTTCCCACCTAAGCCTAA
 GGACACCCTGATGATCAGCAGAACCCCTGAAGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGT
 CCGAGGATGATCCTGAGGTGCAGTTCACCTGGTACATCAACAACGAGCAAGTGC GG
 ACCGCCAGACCTCCTCTGAGAGAGCAGCAGTTCAACAGCACCATCAGAGTGGTGTG
 TACCCTGCCTATCGCTCACGAGGATTGGCTGCGGGGCAAAGAGTTCAAGTGCAAGG
 TGCACAACAAGGCCCTGCCTGCTCCTATCGAGAAAACCATCTCCAAGGCCAGAGGC
 CAGCCACTGGAACCCAAGGTGTACACAATGGGCCCTCCAAGAGAGGAACTGTCCAG
 CAGATCCGTGTCTCTGACCTGCATGATCAACGGCTTCTACCCAGCGACATCAGCGT
 GGAATGGGAGAAGAATGGCAAGGCCGAGGACAACACTACAAGACAACCCCTGCCGTG
 CTGGATAGCGACGGCAGCTACTTCTGTACAGCAAGCTGAGCGTGCCACCTCTGAA
 TGGCAACGGGGAGATGTGTTTACCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCA
 CTACACCCAGAAGTCCATCAGCAGGTCCCCAGGCAAA (SEQ ID NO: 17)

Нуклеотидная последовательность легкой цепи химерного анти-NaPi2b антитела

GATATTTCAGATGACACAGAGCCCCAGCAGCCTGTCTGCCTCTGTGGGAGACA
 GAGTGACCATCACCTGTAGCGCCAGCCAGGATATCGGCAACTTCCTGAACTGGTATC
 AGCAGAAACCCGCAAGACCGTGAAGGTGCTGATCTACTACACCTCCAGCCTGTAC
 AGCGGCGTGCCAGCAGATTTTCTGGCAGCGGCTCTGGCACCGACTACACCTGACC
 ATATCTAGCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTACAGCAAG
 CTGCCCCTGACATTTGGCCAGGGCACCAAGCTGGAAGTGAAGAGGGATCCTGTGGC
 TCCCACCGTGTGATTTTCCACCAGCCGCTGATCAGGTGGCCACTGGCACAGTGAC
 AATCGTGTGCGTGGCCAACAAGTACTTCCCCGACGTGACCGTGACCTGGGAAGTCG
 ATGGCACACACAGACCACAGGCATCGAGAACAGCAAGACCCCTCAGAACAGCGCC
 GACTGCACCTACAACCTGAGCAGCACCTGACACTGACCAGCACACAGTACAACAG
 CCACAAAGAGTACACCTGTAAAGTCACCCAGGGCACAACCAGCGTGGTGCAGAGCT
 TCAACAGAGGGCATTGC (SEQ ID NO: 18).

В некоторых вариантах осуществления химерное анти-NaPi2b антитело содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3); определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности GETARATFAY (SEQ ID NO: 5).

В некоторых вариантах осуществления химерное анти-NaPi2b антитело содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6); определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности YTSSLYS (SEQ ID NO: 7); и определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

В некоторых вариантах осуществления химерное анти-NaPi2b антитело содержит CDRH1, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3); CDRH2, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4); CDRH3, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности GETARATFAY (SEQ ID NO: 5); CDRL1, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6); CDRL2, содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности

91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99%, или более, идентичную аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 16.

Специалисты в данной области понимают, что можно определять без излишнего экспериментирования, имеет ли химерное антитело такую же специфичность, что и химерное антитело, раскрытое в настоящем документе (например, MERS67), путем выяснения того, мешает ли первое связыванию последнего с естественным партнером по связыванию или другой молекулой, которая, как известно, связывается с NaPi2b. Если тестируемое антитело конкурирует с химерным антителом, раскрытым в настоящем документе, о чем свидетельствует уменьшение связывания химерного антитела, раскрытого в настоящем документе, значит, два антитела связывают один и тот же, или близкородственный, эпитоп.

Альтернативным способом определения того, обладает ли моноклональное антитело специфичностью моноклонального антитела, раскрытого в настоящем документе, является преинкубация химерного антитела, раскрытого в настоящем документе, с растворимым NaPi2b (с которым оно обычно взаимодействует), с последующим добавлением тестируемого антитела, и определение того, ингибируется ли способность тестируемого антитела к связыванию NaPi2b. Если тестируемое антитело ингибируется, тогда, по всей вероятности, оно имеет такую же, или функционально эквивалентную, эпитопную специфичность, что и химерное антитело, раскрытое в настоящем документе.

Скрининг химерных антител, раскрытых в настоящем документе, также можно проводить, например, путем измерения опосредуемой NaPi2b активности и определения того, способно ли тестируемое химерное антитело модулировать, блокировать, ингибировать, уменьшать, противодействовать, нейтрализовать, или иным образом противодействовать активности NaPi2b.

Химерные антитела можно получать методами рекомбинантных ДНК, такими как те, которые описаны в патенте США № 4816567. ДНК, кодирующие моноклональные антитела, раскрытые в настоящем документе, можно с легкостью выделять и секвенировать общепринятыми методами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелую и легкую цепи мышечных антител). Клетки гибридомы, раскрытые в настоящем документе, служат предпочтительным источником таких ДНК. После выделения ДНК можно помещать в экспрессионные векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки COS обезьяны, клетки НЕК293, клетки яичника китайского хомяка (СНО) или клетки миеломы, которые без этого не продуцируют белок иммуноглобулина, для синтеза моноклональных антител в рекомбинантных клетках-хозяевах. ДНК также можно модифицировать, например, путем замены кодирующими последовательностями константных доменов тяжелой и легкой цепей человеческого антитела гомологичных мышечных последовательностей (смотри патент США № 4816567; Morrison, Nature 368, 812-13 (1994)) или путем ковалентного связывания с кодирующей последовательностью иммуноглобулина всей, или части, кодирующей последовательности не являющегося иммуноглобулином полипептида. Такой не являющийся иммуноглобулином полипептид может замещать константные домены антитела, раскрытого в настоящем документе, или может замещать переменные домены одного антигенсвязывающего сайта антитела, раскрытого в настоящем документе, с получением химерного двухвалентного антитела.

Химерное анти-NaPi2b антитело получают, например, с использованием методов, описанных в примерах, приведенных ниже.

Химерные анти-NaPi2b антитела, раскрытые в настоящем документе, могут экспрессироваться плазмидой или вектором, содержащими сегмент ДНК, кодирующий антитело, описанное выше. Плазмиды или векторы можно трансфицировать в клетки для экспрессии. Например, клетки представляют собой клетки НЕК293 или клетки СНО.

Эти векторы, плазмиды и клетки можно использовать для экспрессии больших количеств антител, которые можно использовать разными способами. Например, для обнаружения присутствия NaPi2b в образце.

Антитела очищают хорошо известными методами, такими как аффинная хроматография с использованием белка А или белка G, которые позволяют получать фракцию иммунной сыворотки, состоящую преимущественно из IgG. Затем, или альтернативно, специфический антиген, который является мишенью искомого иммуноглобулина, или его эпитоп, можно иммобилизовать на колонке для очистки иммуносpezifического антитела методом иммуноаффинной хроматографии. Очистка иммуноглобулинов описана, например, в публикации D. Wilkinson (The Scientist, опубликовано The Scientist, Inc., Philadelphia PA, Vol. 14, No. 8 (April 17, 2000), pp. 25-28).

Химерные антитела, раскрытые в настоящем документе, также могут быть использованы для обнаружения NaPi2b в образцах от пациентов и, соответственно, могут быть использованы в качестве диагностических средств. Например, анти-NaPi2b антитела, раскрытые в настоящем документе, используют в *in vitro* анализах, например, ИГХ, ELISA, для определения уровней NaPi2b в образце от пациента.

NaPi2b-таргетированный конъюгат полимер-антитело-лекарственное средство.

В некоторых вариантах осуществления NaPi2b-таргетированное антитело ХМТ-1535 может быть связано со средством, образуя конъюгат. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой терапевтическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой антинеопластическое средство. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой ток-

син или его фрагмент. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой (а) соединение ауристатина; (b) соединение калихеамицина; (c) соединение дуокармицина; (d) SN38, (e) пирролобензодиазепин; (f) соединение алкалоида барвинка; (g) соединение тубулизина; (h) неприродное соединение камптотецина; (i) соединение майтанзиноида; (j) ДНК-связывающее лекарственное средство; (k) ингибитор киназы; (l) ингибитор MEK; (m) ингибитор KSP; (n) ингибитор топоизомеразы; (o) ДНК-алкилирующее лекарственное средство; (p) ингибитор РНК-полимеразы; или их аналоги. В некоторых вариантах осуществления средство конъюгировано с NaPi2b-таргетированным антителом через линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления средство представляет собой любой из токсинов, описанных в настоящем документе.

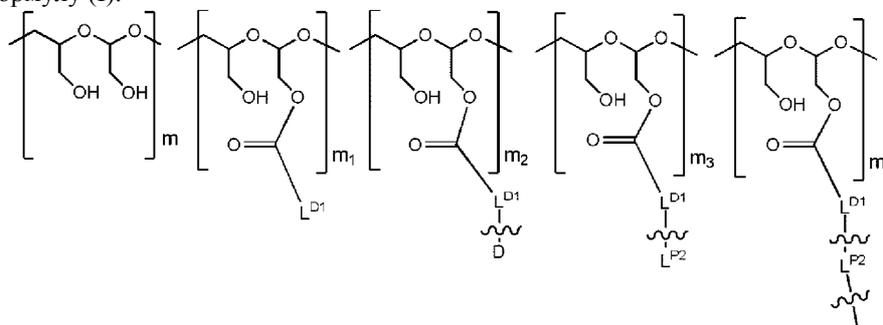
В одном аспекте конъюгат NaPi2b-таргетированного антитела, описанного в настоящем документе, содержит выделенное NaPi2b-таргетированное антитело ХМТ-1535, связанное непосредственно или опосредованно с одним или более терапевтическими или диагностическими средствами ("D"). В некоторых вариантах осуществления конъюгат NaPi2b-таргетированного антитела также содержит один или более полимерных каркасов, связанных с антителом, при этом каждое из одного или более D независимо связано с антителом через один или более полимерных каркасов. В некоторых вариантах осуществления одно или более D представляют собой АF-НРА.

В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более полимерных каркасов, связанных с ХМТ-1535, содержит поли(1-гидроксиметилэтиленгидроксиметил-формаль) (PHF), например, PHF с молекулярной массой в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 40 кДа. В других вариантах осуществления PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 20 кДа. В некоторых вариантах осуществления PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 3 кДа до примерно 15 кДа. В других вариантах осуществления PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа.

В некоторых вариантах осуществления PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 6 кДа до примерно 8 кДа.

В некоторых вариантах осуществления PHF имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 6 кДа до примерно 7 кДа.

В некоторых вариантах осуществления каждый из одного или более полимерных каркасов независимо имеет формулу (I):



(I),

где: L^{D1} представляет собой карбонил-содержащий фрагмент;

каждый фрагмент $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---}$ в $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$ независимо представляет собой первый линкер, содержащий биоразлагаемую связь, так что, когда связь нарушается, D высвобождается в активной форме для оказания его ожидаемого терапевтического действия; и $\text{---}\xi\text{---}$ в $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---D}$ между L^{D1} и D обозначает непосредственное или опосредованное присоединение D к L^{D1} ;

каждый фрагмент $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}$ независимо представляет собой второй линкер, еще не связанный с выделенным антителом, при этом L^{P2} представляет собой фрагмент, содержащий функциональную группу, которая будет образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела, и $\text{---}\xi\text{---}$ между L^{D1} и L^{P2} обозначает непосредственное или опосредованное присоединение L^{P2} к L^{D1} , и каждый фрагмент второго линкера отличается от каждого фрагмента первого линкера;

каждый фрагмент $\text{---C(=O)-L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}\text{---}\xi\text{---}$ независимо представляет собой третий линкер, соединяющий каждый D-несущий полимерный каркас с выделенным антителом, при этом концевой фрагмент $\text{---}\xi\text{---}$, связанный с L^{P2} , обозначает непосредственное или опосредованное присоединение L^{P2} к выделенному антителу за счет образования ковалентной связи между функциональной группой L^{P2} и функцио-

нальной группой выделенного антитела; и каждый фрагмент третьего линкера отличается от каждого фрагмента первого линкера;

m представляет собой целое число от 1 до примерно 300,

m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 140,

m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 40,

m_3 представляет собой целое число от 0 до примерно 18,

m_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 10;

сумма m , m_1 , m_2 , m_3 и m_4 находится в диапазоне от примерно 15 до примерно 300; и общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, составляет 10 или менее.

Конъюгат, описанный в настоящем документе, может иметь один или более из следующих признаков: например, в формуле (I) m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 120 (например, примерно 1-90) и/или m_3 представляет собой целое число от 1 до примерно 10 (например, примерно 1-8).

Например, когда РНФ в формуле (I) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 6 кДа до примерно 20 кДа (то есть, сумма m , m_1 , m_2 , m_3 и m_4 находится в диапазоне от примерно 45 до примерно 150), m_2 представляет собой целое число от 2 до примерно 20, m_3 представляет собой целое число от 0 до примерно 9, m_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 10, и/или m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 75 (например, m_1 равно примерно 4-45).

Например, когда РНФ в формуле (I) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 8 кДа до примерно 15 кДа (то есть сумма m , m_1 , m_2 , m_3 и m_4 находится в диапазоне от примерно 60 до примерно 110), m_2 представляет собой целое число от 2 до примерно 15, m_3 представляет собой целое число от 0 до примерно 7, m_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 10, и/или m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 55 (например, m_1 равно примерно 4-30).

Например, когда РНФ в формуле (I) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 20 кДа (то есть сумма m , m_1 , m_2 , m_3 и m_4 находится в диапазоне от примерно 15 до примерно 150), m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 20, m_3 представляет собой целое число от 0 до примерно 10 (например, m_3 находится в диапазоне от 0 до примерно 9), m_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 8, и/или m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 70 и общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 8 (например, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8).

Например, общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 6 (например, примерно 2, 3, 4, 5 или 6).

Например, общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 3 до примерно 6 (например, примерно 3, 4, 5 или 6).

Например, общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 3 до примерно 5 (например, примерно 3, 4, или 5).

Например, общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 4 (например, примерно 2, 3 или 4).

Например, общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 3 до примерно 4 (например, примерно 3 или 4).

Например, когда РНФ в формуле (I) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 3 кДа до примерно 15 кДа (то есть сумма m , m_1 , m_2 , m_3 и m_4 находится в диапазоне от примерно 20 до примерно 110), m_2 представляет собой целое число от 2 до примерно 15, m_3 представляет собой целое число от 0 до примерно 8 (например, m_3 находится в диапазоне от 0 до примерно 7), m_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 8, и/или m_1 представляет собой целое число от 2 до примерно 50 и общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 8 (например, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7, или 8).

Например, когда РНФ в формуле (I) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа, (то есть, сумма m , m_1 , m_2 , m_3 и m_4 находится в диапазоне от примерно 40 до примерно 75), m_2 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 10 (например, m_2 равно примерно 3-10), m_3 представляет собой целое число от 0 до примерно 5 (например, m_3 находится в диапазоне от 0 до примерно 4), m_4 представляет собой целое число от 1 до примерно 8 (например, m_4 находится в диапазоне от 1 до примерно 5), и/или m_1 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 35 (например, m_1 равно примерно 5-35) и общее число L^{P2} , связанных с выделенным антителом, находится в диапазоне от примерно 2 до примерно 8 (например, примерно 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8).

Например, каждый фрагмент D независимо представляет собой терапевтическое средство, например, имеющее молекулярную массу ≤ 5 кДа.

Например, каждый фрагмент D независимо представляет собой диагностическое средство или метку.

Например, некоторые фрагменты D независимо представляют собой терапевтические средства (например, имеющие молекулярную массу ≤ 5 кДа), и другие фрагменты D представляют собой диагностические средства или метки.

Например, каждый фрагмент D независимо представляет собой противораковое лекарственное средство, например, выбранное из алкалоидов барвинка, ауристатинов, тубулизинов, дуокармицинов, неприродных соединений камптотецина, майтанзиноидов, соединений калихеамицина, ингибиторов топоизомеразы, пирролобензодиазепинов, ДНК-связывающих лекарственных средств, ДНК-алкилирующих лекарственных средств, ингибиторов РНК-полимеразы, ингибиторов киназы, ингибиторов МЕК, ингибиторов KSP, а также их аналогов.

Например, в каждом случае соединение ауристатиона представляет собой ауристатин, доластатин (например, доластатин 10 или доластатин 15), монометилауристатин E (ММАЕ), монометилауристатин F (ММАF), гидроксипропиламид ауристатиона F (AF НРА), гидроксипропиламид монометилауристатиона F (AF НРА) или фенилендиамин ауристатиона F (AFP).

Например, в каждом случае дуокармицин или его аналог представляет собой дуокармицин А, дуокармицин В1, дуокармицин В2, дуокармицин С1, дуокармицин С2, дуокармицин D, дуокармицин SA, СС-1065, адозелезин, бизелезин или карзелезин.

Например, в каждом случае соединение камптотецина представляет собой камптотецин, СРТ-11 (иринотекан), SN-38 или топотекан.

Например, в каждом случае соединение пирролобензодиазепина представляет собой мономер пирролобензодиазепина, симметричный димер пирролобензодиазепина или несимметричный димер пирролобензодиазепина.

Например, каждый $\text{---L}^{D1}\text{---}\xi\text{---L}^{P2}$, когда не связан с выделенным антителом, независимо содержит концевую группу W^P , при этом каждая W^P независимо представляет собой:

(1)



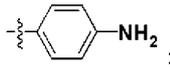
(2)



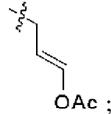
(3)



(4)



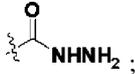
(5)



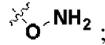
(6)



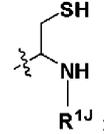
(7)



(8)



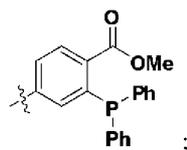
(9)



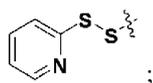
(10)

(11)

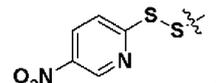
(12)



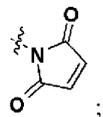
(13)



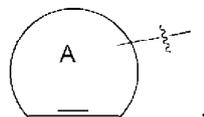
(14)



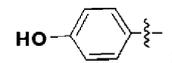
(15)



(16)



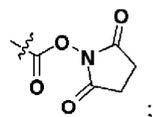
(17)



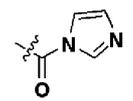
(18)



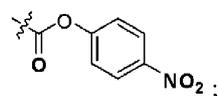
(19)



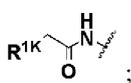
(20)



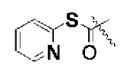
(21)



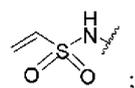
(22)



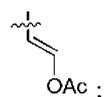
(23)



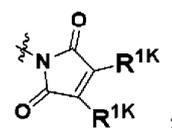
(24)



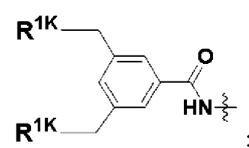
(25)



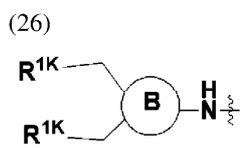
(26)



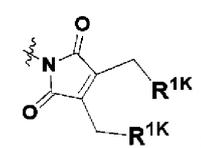
(27)



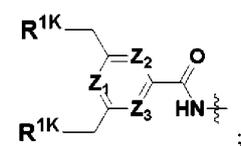
(28)



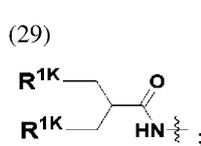
(29)



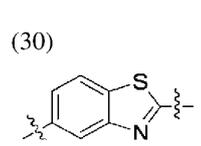
(30)



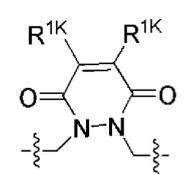
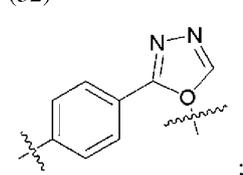
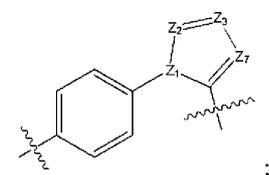
(31)

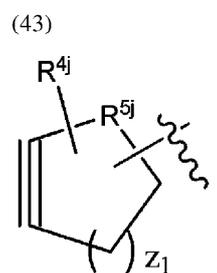
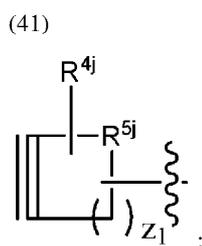
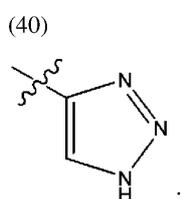
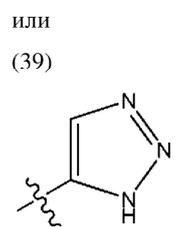
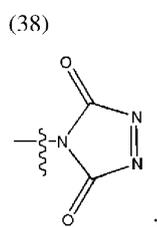
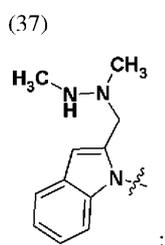
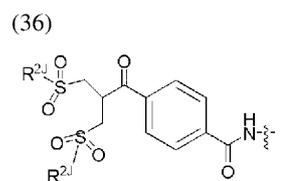
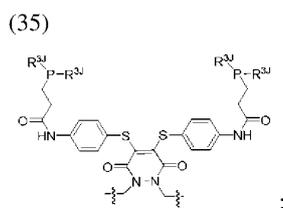
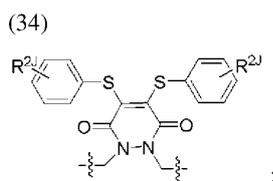


(32)



(33)





где кольцо А представляет собой циклоалкил или гетероциклоалкил, кольцо В представляет собой циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил; R^{1k} представляет собой уходящую группу; R^{1A} представляет собой защитную группу серы;

R^{1j} представляет собой водород, алифатическую, гетероалифатическую, карбоциклическую или гетероциклоалкильную группу;

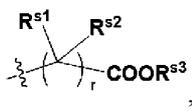
R^{2j} представляет собой водород, алифатическую, арильную, гетероалифатическую или карбоциклическую группу;

R^{3j} представляет собой C_{1-6} алкил, и каждый из Z_1 , Z_2 , Z_3 и Z_7 независимо представляет собой атом углерода или азота;

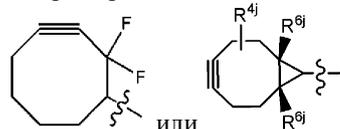
R^{4j} представляет собой водород, галоген, OR, $-NO_2$, $-CN$, $-S(O)_2R$, C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил), или 6-24-членный арил или гетероарил, при этом C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил) или 6-24-членный арил или гетероарил необязательно замещен одним или более арилом или гетероарилом; или два R^{4j} совместно образуют аннелированный циклоалкил, гетероциклоалкил, арил или гетероарил; R представляет собой водород, алкил, гетероалкил, циклоалкил или гетероциклоалкил;

R^{5j} представляет собой $C(R^{4j})_2$, O, S или NR; и

Z_1 представляет собой целое число 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10.

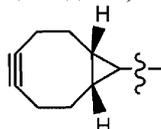
Например, каждый R^{1A} независимо представляет собой , в которых r равен 1 или 2, и каждый из R^{s1} , R^{s2} и R^{s3} представляет собой водород, алифатическую, гетероалифатическую, карбоциклическую или гетероциклоалкильную группу.

Например, кольцо А может представлять собой



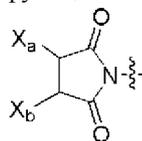
; при этом R^{6j} представляет собой водород, галоген, C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил) или 6-24-членный арил или гетероарил, при этом C_{1-24} алкил (например, C_{1-6} алкил) или 6-

24-членный арил или гетероарил необязательно замещен одним, или более, арилом или гетероарилом.

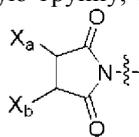


Например, кольцо А может представлять собой

Например, функциональную группу L^{P2} , которая будет образовывать ковалентную связь с функциональной группой выделенного антитела (такой как функциональная группа или реакционноспособная группа на аминокислотном остатке антитела, например, функциональная группа на остатке цистеина или



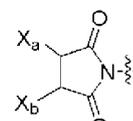
остатке лизина антитела), выбирают из $-SR^P$, $-S-S-LG$, и гало, где LG представляет собой уходящую группу, R^P представляет собой H или защитную группу серы, и один из X_a и X_b представляет собой H, а другой представляет собой водорастворимую малеимидо-блокирующую группу, или X_a и X_b , совместно с атомами углерода, с которыми они связаны, образуют углерод-углеродную двойную связь. Например, функциональная группа L^{P2} , которая будет образовывать ковалентную связь, представляет собой функциональную группу, которая не взаимодействует с функциональной группой выделенного



антитела, например, в качестве функциональной группы L^{P2} , в которой один из X_a и X_b представляет собой H, а другой представляет собой водорастворимую малеимидо-блокирующую группу, или X_a и X_b .

Например, L^{D1} содержит $-X-(CH_2)_v-C(=O)-$ с X, непосредственно связанным с карбонильной группой $-C(=O)-L^{D1}-$, где X представляет собой CH_2 , O или NH, и v представляет собой целое число от 1 до 6.

Например, каждый фрагмент $-C(=O)-L^{D1}-L^{P2}$ независимо представляет собой $-C(=O)-X-(CH_2)_v-C(=O)-NH-(CH_2)_u-NH-C(=O)-(CH_2)_w-(OCH_2)_x-NHC(=O)-(CH_2)_y-M$, где X представляет собой CH_2 , O или NH, каждый из v, u, w, x и y



независимо представляет собой целое число от 1 до 6, и M представляет собой, при этом один из X_a и X_b представляет собой H, а другой представляет собой водорастворимую малеимидо-блокирующую группу, или X_a и X_b , совместно с атомами углерода, с которыми они связаны, образуют углерод-углеродную двойную связь.

Например, каждый из v, u, w, x и y равен 2.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 20:1, 15:1, 10:1, 5:1, 2:1 или 1:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 14:1, 13:1 или 12:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 13:1 или 12:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 12:1.

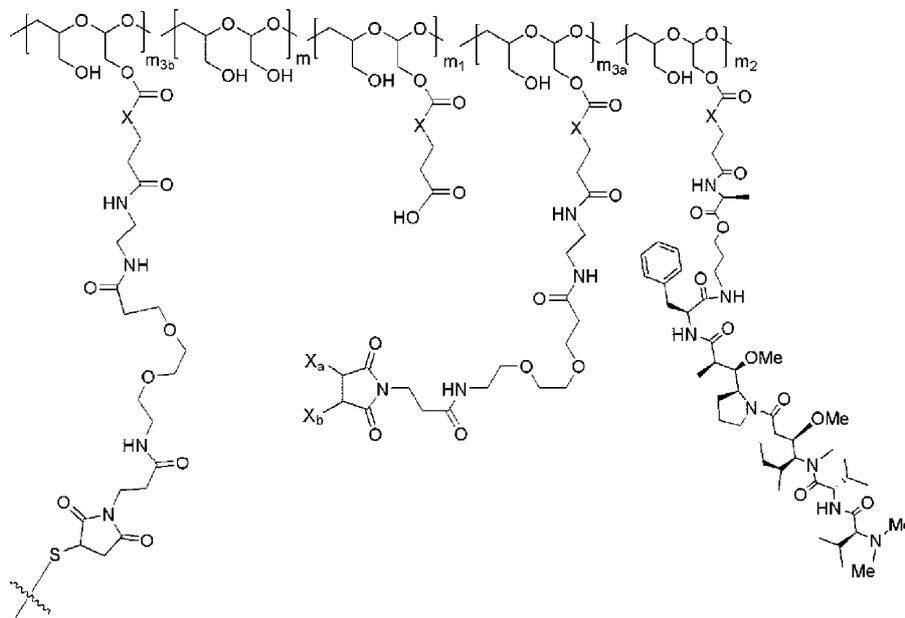
Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом XMT-1535 составляет примерно 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 составляет примерно 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

Например, соотношение между D и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 составляет примерно 11:1, 10:1 или 9:1.

Например, каждый из одного или более D-несущих полимерных каркасов независимо имеет формулу (II):



(II),

где: m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 17,

m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8 и концевой фрагмент  означает присоединение одного или более полимерных каркасов к NaPi2b-таргетированному антителу ХМТ-1535. Каркас формулы (II) может иметь один или более из следующих признаков:

Сумма m_{3a} и m_{3b} составляет от 1 до 18.

Когда RHF в формуле (II) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 40 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 15 до примерно 300, m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 140, m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 40, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 17, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 18; и соотношение между RHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 составляет 10 или менее.

Когда RHF в формуле (II) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 20 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 15 до примерно 150, m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 70, m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 20, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 9, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 10; и соотношение между RHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 представляет собой целое число от 2 до примерно 8 (например, от примерно 2 до примерно 6 или от примерно 2 до примерно 4).

Когда RHF в формуле (II) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 3 кДа до примерно 15 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 20 до примерно 110, m_1 представляет собой целое число от 2 до примерно 50, m_2 представляет собой целое число от 2 до примерно 15, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 7, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 8; и соотношение между RHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 представляет собой целое число от 2 до примерно 8 (например, от примерно 2 до примерно 6 или от примерно 2 до примерно 4).

Когда RHF в формуле (II) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 40 до примерно 75, m_1 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 35, m_2 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 10, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 4, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 5, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 5; и соотношение между RHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 представляет собой целое число от 2 до примерно 8 (например, от примерно 2 до примерно 6 или от примерно 2 до примерно 4).

В конкретных вариантах осуществления соотношение между гидроксипропиламидом ауристатином F

("AF HPA") и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 может составлять примерно 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В конкретных вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 может составлять примерно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом ХМТ-1535 может составлять примерно 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF HPA и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 11:1, 10:1 или 9:1.

В конкретных вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В конкретных вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1. В других вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 4:1, 3:1 или 2:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между PHF и выделенным NaPi2b-таргетированным антителом может составлять примерно 4:1 или 3:1.

Водорастворимые малеимидо-блокирующие группы (например, X_a или X_b) представляют собой группы, которые могут быть ковалентно присоединены к одному или двум олефиновым атомам углерода при реакции малеимидо-группы с тиол-содержащим соединением формулы (II):



(II)

где: R₉₀ представляет собой NHR₉₁, OH, COOR₉₃, CH(NHR₉₁)COOR₉₃ или замещенную фенильную группу;

R₉₃ представляет собой водород или C₁₋₄алкил;

R₉₁ представляет собой водород, CH₃ или CH₃CO и

d представляет собой целое число от 1 до 3.

В одном варианте осуществления водорастворимое малеимидо-блокирующее соединение формулы (II) может представлять собой цистеин, N-ацетилцистеин, сложный метиловый эфир цистеина, N-метицистеин, 2-меркаптоэтанол, 3-меркаптопропионовую кислоту, 2-меркаптоуксусную кислоту, меркаптотетанол (то есть, HOCH₂SH), бензилтиол, в котором фенил замещен одним или более гидрофильными заместителями, или 3-аминопропан-1-тиол. Один или более гидрофильных заместителей на фениле включают OH, SH, метокси, этокси, COOH, CHO, СОС₁₋₄алкил, NH₂, F, циано, SO₃H, PO₃H и тому подобное.

В другом аспекте водорастворимая малеимидо-блокирующая группа представляет собой $-S-(CH_2)_d-$ R_{90} , где

R_{90} представляет собой OH , $COOH$ или $CH(NHR_{91})COOR_{93}$;

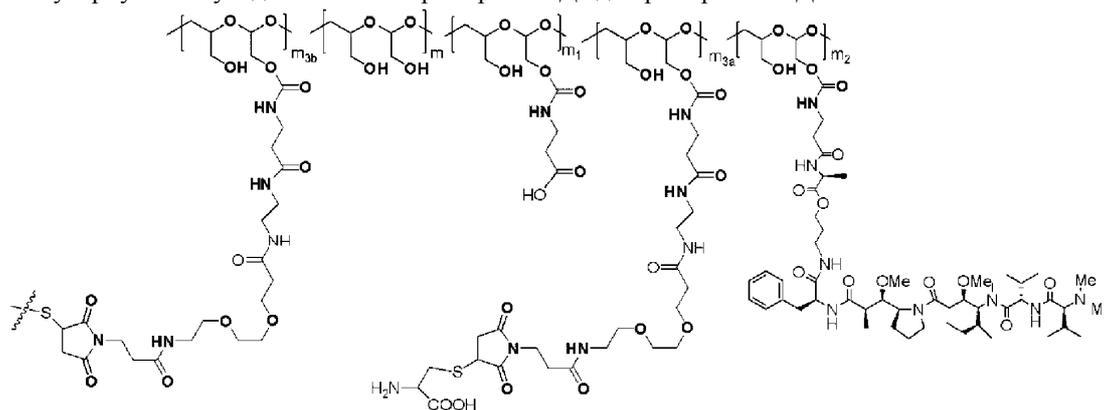
R_{93} представляет собой водород или CH_3 ;

R_{91} представляет собой водород или CH_3CO ; и

d равен 1 или 2.

В другом варианте осуществления водорастворимая малеимидо-блокирующая группа представляет собой $-S-CH_2-CH(NH_2)COOH$.

В конкретных вариантах осуществления конъюгат, описанный в настоящем документе, содержит один или более D-несущих РНФ, каждый из которых независимо имеет формулу (III), при этом РНФ имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 40 кДа:



(III)

где: m представляет собой целое число от 1 до примерно 300,

m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 140,

m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 40,

m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 17,

m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8;

сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 18;

сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 15 до примерно 300;

концевой фрагмент  означает присоединение одного или более РНФ полимерных каркасов к выделенному NaPi2b-таргетированному антителу ХМТ-1535, соотношение между РНФ и антителом составляет 10 или менее.

Каркас формулы (III) может иметь один или более из следующих признаков:

Когда РНФ в формуле (III) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 2 кДа до примерно 20 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 15 до примерно 150, m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 70, m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 20, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 9, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 10 и соотношение между РНФ и антителом представляет собой целое число от 2 до примерно 8.

Когда РНФ в формуле (III) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 3 кДа до примерно 15 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 20 до примерно 110, m_1 представляет собой целое число от 2 до примерно 50, m_2 представляет собой целое число от 2 до примерно 15, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 7, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 8; и соотношение между РНФ и антителом представляет собой целое число от 2 до примерно 8 (например, от примерно 2 до примерно 6 или от примерно 2 до примерно 4).

Когда РНФ в формуле (III) имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа, сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от примерно 40 до примерно 75, m_1 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 35, m_2 представляет собой целое число от примерно 2 до примерно 10, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 4, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 5, сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 5; и соотношение между РНФ и антителом представляет собой целое число от 2 до примерно 8 (например, от примерно 2 до примерно 6 или от примерно 2 до примерно 4).

В конкретных вариантах осуществления соотношение между гидроксипропиламидом ауристатиона F ("AF НРА") и антителом может составлять примерно 30:1, 29:1, 28:1, 27:1, 26:1, 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В конкретных вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 25:1, 24:1, 23:1, 22:1, 21:1, 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В других вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 20:1, 19:1, 18:1, 17:1, 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1, 9:1, 8:1, 7:1 или 6:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 16:1, 15:1, 14:1, 13:1, 12:1, 11:1 или 10:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 15:1, 14:1, 13:1, 12:1 или 11:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 15:1, 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 14:1, 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 13:1 или 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 12:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 14:1, 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 13:1, 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 12:1, 11:1, 10:1 или 9:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между AF НРА и антителом может составлять примерно 11:1, 10:1 или 9:1.

В конкретных вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 10:1, 9:1, 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В конкретных вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 8:1, 7:1, 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

В других вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1, 2:1 или 1:1.

В других вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 6:1, 5:1, 4:1, 3:1 или 2:1.

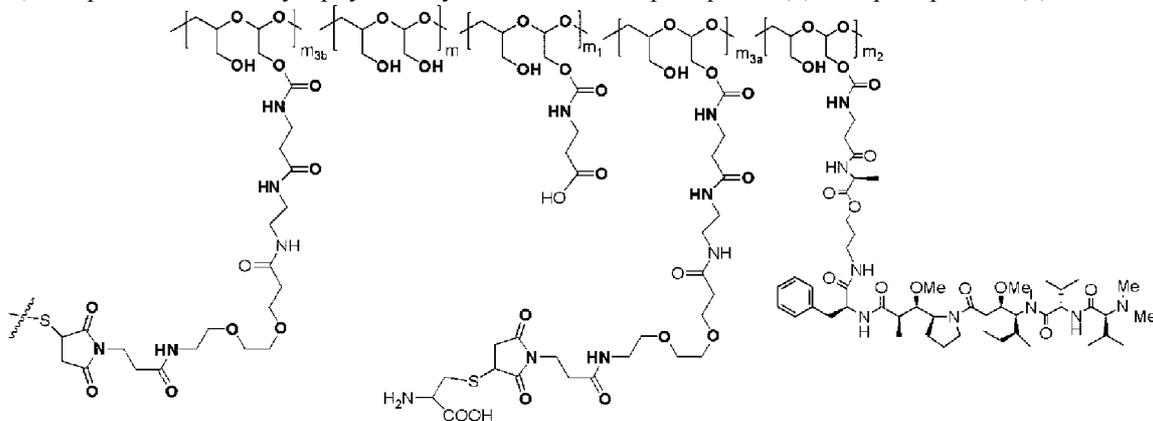
В других вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 6:1, 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 5:1, 4:1 или 3:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 4:1, 3:1 или 2:1.

В некоторых вариантах осуществления соотношение между PHF и антителом может составлять примерно 4:1 или 3:1.

В конкретных вариантах осуществления в конъюгате, описанном в настоящем документе, D-несущий полимерный каркас формулы (III) имеет формулу (IV), при этом полимер представляет собой PHF, который имеет молекулярную массу в диапазоне от примерно 5 кДа до примерно 10 кДа:



(IV)

где: m представляет собой целое число от 30 до примерно 35,

m_1 представляет собой целое число от 8 до примерно 10,

m_2 представляет собой целое число от 2 до примерно 5, m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 1, m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 2; сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 4;

концевой фрагмент $\text{---}\xi\text{---}$ означает присоединение одного или более PHF полимерных каркасов к выделенному NaPi2b-таргетированному антителу ХМТ-1535, соотношение между PHF и антителом составляет от примерно 3 до примерно 5.

Диагностические, предсказательные и прогностические способы по изобретению.

В различных аспектах изобретение относится к способу идентификации пациента с раком, подлежащего NaPi2b-таргетированной терапии, путем определения статуса экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, и идентификации пациента для лечения, основанной на экспрессии NaPi2b в образце опухоли.

В частности, изобретение относится к способам, позволяющим отличать пациентов с раком, которые будут отвечать на NaPi2b-таргетированное лечение, например, лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытым в WO 2017/160754, от тех, кто не будет отвечать на лечение, основанное на уровнях экспрессии NaPi2b. Профиль экспрессии NaPi2b коррелирует со способностью (и, таким образом, позволяет отличать) пациентов сильно или слабо отвечать на лечение.

В других вариантах осуществления изобретение относится к способу сравнения экспрессии NaPi2b в образце раковых клеток от пациента с контрольным профилем экспрессии NaPi2b для определения вероятного клинического или лечебного исхода для пациента, или естественного биологического результата. Эти варианты осуществления изобретения можно преимущественно использовать для удовлетворения важной неудовлетворенной диагностической потребности в возможности прогнозировать, получит ли пациент пользу от конкретного вида лечения, или для пациента больше подойдет иной метод лечения. Например, высокий показатель уровня экспрессии NaPi2b может быть сильно связан с ответом на лечение NaPi2b-таргетированными конъюгатами полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытыми в WO 2017/160574.

Способы по изобретению позволяют получать объективные паттерны белковой экспрессии, которые можно использовать отдельно или в сочетании с субъективными критериями для более точной оценки исходов для пациента, включая выживаемость и рецидив рака.

В различных аспектах изобретение относится к способу идентификации и/или лечения заболеваний или нарушений, связанных с aberrантной экспрессией NaPi2b, путем измерения экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента.

Способы по изобретению позволяют получать объективные паттерны белковой экспрессии, которые можно использовать отдельно или в сочетании с субъективными критериями для более точного диагностирования NSCLC. Например, изобретение относится к способам диагностирования NSCLC у пациента путем измерения экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента. В частности, изобретение относится к способам субтипирования NSCLC путем измерения экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, и идентификации NSCLC как аденокарциномы на основании экспрессии NaPi2b в образце опухоли. Необязательно, дополнительно определяют уровни экспрессии одного или более из TTF-1, напсина А, p63, p40 или CH5/6.

Пациент с раком имеет заболевание или нарушение, связанное с aberrантной активностью и/или экспрессией NaPi2b. Заболевания или нарушения, связанные с aberrантной активностью и/или экспрессией NaPi2b, включают, но без ограничения, рак. Рак может представлять собой рак яичника, такой как эпителиальный рак яичника, рак щитовидной железы, колоректальный рак, рак легкого, немелкоклеточный рак легкого (NSCLC), такой как неплоскоклеточная NSCLC, рак молочной железы, рак почки, карциному протоков слюнных желез, папиллярный рак щитовидной железы, папиллярный почечноклеточный рак, аденокарциному протоков слюнных желез, рак эндометрия и холангиокарциному.

Субъект является невосприимчивым к химиотерапии, включая стандартные, передовые химиотерапевтические средства. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет чувствительный к соединениям платины рак яичника. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет рефрактерный к соединениям платины рак яичника. В некоторых вариантах осуществления субъект имеет запущенный рак яичника и ранее не получал какую-либо терапию, направленную на лечение рака (например, рака яичника). В некоторых вариантах осуществления субъект имеет запущенный рак яичника и ранее не получал химиотерапию для лечения рака (например, рака яичника).

Образец получают от субъекта, имеющего, или предположительно имеющего, рак. Образец раковых клеток иссекают из ткани, извлеченной или полученной от субъекта.

В некоторых вариантах осуществления тестируемую клеточную популяцию получают из свежей незамороженной ткани полученного при биопсии образца. В других вариантах осуществления тестируемую клеточную популяцию получают из зоны первичной опухоли или метастазов. В некоторых вариантах осуществления тестируемую клеточную популяцию получают из свежей или замороженной ткани полученного при биопсии или хирургической операции образца, либо асцитной жидкости или плевраль-

ной жидкости. В некоторых вариантах осуществления тестируемую клеточную популяцию получают из фиксированной ткани (например, фиксированной в формалине или фиксированной в формалине залитой парафином ткани (FFPE)) полученного при биопсии или хирургической операции образца, либо клеточного блока, полученного из образца жидкости. Образец ткани может быть замороженным или свежим.

NaPi2b-таргетированная терапия включает терапию NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC). Например, такую терапию NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), которая описана в WO 2017/160754.

Необходимый уровень экспрессии NaPi2b может быть уровнем, который определяют любыми способами, известными в данной области, и более конкретно, способами, описанными в настоящем документе.

Например, уровень экспрессии NaPi2b можно измерять путем проведения известного иммунологического анализа, такого как иммуноферментный анализ, радиоиммунный анализ, конкурентный иммуноферментный анализ, анализ с двумя антителами в сэндвич-формате, флуороиммуноанализ, ELISA, метод вестерн-блоттинга, анализ агглютинации, цитофлуорометрия (например, проточная цитометрия) или анализ иммуногистохимического окрашивания с использованием антитела, которое специфически узнает NaPi2b (например, химерного антитела по изобретению). Клеточные анализы, такие как проточно-цитометрический анализ (ПЦ), иммуногистохимический анализ (ИГХ) или иммунофлуоресцентный анализ (ИФ), являются особенно предпочтительными при осуществлении на практике способов по изобретению, поскольку такие форматы анализа подходят для клинического применения. Соответственно, в некоторых вариантах осуществления способы по изобретению используют в формате проточно-цитометрического (ПЦ), иммуногистохимического (ИГХ) или иммунофлуоресцентного (ИФ) анализа. Предпочтительно, способы используют в формате ИГХ.

Проточную цитометрию (ПЦ) можно использовать для определения клеточной поверхностной экспрессии NaPi2b в образце опухоли до, в процессе и после лечения лекарственным средством, направленным на ингибирование экспрессии NaPi2b. Например, опухолевые клетки можно анализировать методом проточной цитометрии на NaPi2b, а также на маркеры, позволяющие идентифицировать типы раковых клеток, и так далее, при необходимости. Проточную цитометрию можно проводить стандартными методами. Смотри, например, Chow et al., *Cytometry (Communications in Clinical Cytometry)* 46: 72-78 (2001). Вкратце, и в качестве примера, можно использовать следующий протокол для цитометрического анализа: фиксация клеток 2% параформальдегидом в течение 10 мин при 37°C, с последующей пермеабиллизацией в 90% метаноле в течение 30 мин на льду. Затем клетки можно окрашивать NaPi2b-специфическим антителом, промывать и метить флуоресцентно-меченым вторичным антителом. Затем клетки можно анализировать на проточном цитометре (например, Beckman Coulter FC500) в соответствии с конкретными протоколами для используемого прибора. Такой анализ позволяет определять уровень экспрессированного NaPi2b в опухоли.

Имуногистохимическое (ИГХ) окрашивание также можно использовать для определения экспрессии NaPi2b в образце опухоли до, в процессе и после лечения лекарственным средством, направленным на ингибирование активности. ИГХ можно проводить хорошо известными методами. Смотри, например, ANTIBODIES; A LABORATORY MANUAL, глава 10, Harlow & Lane Eds., Cold Spring Harbor Laboratory (1988). Вкратце, и в качестве примера, залитую парафином ткань (например, ткань, полученную при биопсии опухоли) подготавливают для иммуногистохимического окрашивания путем депарафинизации срезов тканей ксилолом, а затем этанолом; гидратации в воде, а затем в PBS; демаскировки антигена путем нагревания препарата в буферном растворе цитрата натрия; инкубации срезов в перексиде водорода; блокирования в блокирующем растворе; инкубации препарата с первичным антителом и вторичным антителом; с последующим обнаружением методом на основе АВС комплекса авидин/биотин в соответствии с инструкциями производителя.

Имунофлуоресцентные (ИФ) анализы также можно использовать для определения экспрессии NaPi2b в образце опухоли до, в процессе и после лечения лекарственным средством, направленным на ингибирование активности. ИФ можно проводить хорошо известными методами. Смотри, например, J. M. Polak and S. Van Noorden (1997) INTRODUCTION TO IMMUNOCYTOCHEMISTRY, 2nd Ed.; ROYAL MICROSCOPY SOCIETY MICROSCOPY HANDBOOK 37, BioScientific/Springer-Verlag. Вкратце, и в качестве примера, образцы от пациентов можно фиксировать в параформальдегиде, а затем в метаноле, блокировать блокирующим раствором, таким как лошадиная сыворотка, инкубировать с первичным антителом против полипептида, а затем с вторичным антителом, меченым флуоресцентным красителем, таким как Alexa 488, и анализировать при помощи эпифлуоресцентного микроскопа.

Антитела, используемые в вышеописанных анализах, могут быть, предпочтительно, конъюгированы с флуоресцентными красителями (например, Alexa 488, PE) или другими метками, такими как квантовые точки, для использования в многопараметрических анализах наряду с другими антителами к маркерам сигнальной трансдукции (фосфо-АКТ, фосфо-Erk 1/2) и/или клеточным маркерам (цитокератин).

В предпочтительном варианте осуществления экспрессию NaPi2b в образце из опухоли определяют иммуногистохимически. В еще более предпочтительном варианте осуществления экспрессию NaPi2b в образце из опухоли определяют иммуногистохимическими методами (ИГХ) с использованием химерного

антитела, описанного в настоящем документе.

Альтернативно, анализ может включать получение РНК из образца, необязательно, для использования в ПЦР (полимеразной цепной реакции) или другом аналитическом методе. Метод ПЦР, необязательно, представляет собой, например, ОТ-ПЦР (ПЦР с обратной транскрипцией) или количественную ПЦР, такую как, например, ОТ-ПЦР в реальном времени, RNAseq и тому подобные. Альтернативно, анализ можно проводить с использованием матриц, например, микрочипов, как известно в соответствующей области.

Пациентов идентифицируют, как отвечающих на лечение, при этом мониторинг результатов лечения проводят, или рак обнаруживают, путем обнаружения и/или измерения уровня экспрессии NaPi2b в образце.

Обнаружение/измерение уровня экспрессии NaPi2b проводят, рассчитывая балльный показатель NaPi2b. Балльный показатель NaPi2b определяют количественно или полуколичественно. Например, балльный показатель определяют на основании шкалы патологии, получая балльный показатель патологии. Предусмотрено, что в способах по изобретению можно использовать любой из методов определения балльного показателя, известных в данной области. В частности, любые гистологические методы определения балльного показателя, известные в данной области.

Способы оценки результатов измерения, полученных в анализах иммуногистохимического окрашивания, включают, например, способ определения H-балла. H-балл определяют при помощи следующей расчетной формулы (Am J Clin Pathol. 1988; 90 (3): 233-9). H-балл = ((% при <1+) X0) + ((% при 1+)X1) + ((% при 2+) X2) + ((% при 3+) X3), где интенсивность окрашивания 0 соответствует отсутствию окрашивания; интенсивность окрашивания 1 соответствует слабому окрашиванию; интенсивность окрашивания 2 соответствует умеренному окрашиванию; и интенсивность окрашивания 3 соответствует сильному окрашиванию.

В некоторых вариантах осуществления H-балл может иметь значение от 0 до 300, и когда H-балл превышает порог отсечения, противоопухолевые эффекты можно наблюдать при химиотерапии с использованием NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Например, когда субъект имеет H-балл, равный 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, или выше, субъект отвечает на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство (ADC), описанным в настоящем документе и в WO 2017/160754.

При оценке способом определения H-балла используют только раковые клетки. Для отрицательных или положительных контролей на интенсивность окрашивания можно использовать фиксированные в формалине залитые парафином линейные клетки или ксенотрансплантаты (клеточные линии, для которых уровни белковой экспрессии известны заранее). В случае отсутствия контрольных образцов множество образцов оценивают одновременно для подтверждения общего распределения интенсивности окрашивания образцов, а затем можно устанавливать интенсивность окрашивания.

Помимо способа определения H-балла также можно использовать и другие способы определения балльного показателя, такие как способ Allred (Harvey, et al. Journal of Clinical Oncology 17, no. 5 (May 1999) 1474-1474). В каждом способе необходимо устанавливать порог отсечения. Показатель Allred=показатель процентной доли положительно окрашенных клеток+показатель интенсивности окрашивания. Балльный показатель образцов также можно определять полуколичественно, например, как показатель 1+ или 2+ или 3+ для экспрессии NaPi2b.

Показатели эффективности и точности изобретения

Эффективность и, следовательно, абсолютную и относительную клиническую полезность, изобретения можно оценивать множеством способов, как отмечено выше. Среди различных оценок эффективности, изобретение должно обеспечивать точность клинического диагностирования и прогнозирования. Точность диагностического, предсказательного или прогностического теста, анализа или способа означает способность теста, анализа или способа отличать субъектов, отвечающих на лечение химиотерапевтическим средством, от тех, которые не отвечают на лечение, на основании того, имеют ли субъекты "эффективное количество" или "значительное изменение уровней" NaPi2b. "Эффективное количество", или "значительное изменение уровней", означает, что количество NaPi2b отличается от заданного порога отсечения (или порогового значения) и, таким образом, является показателем способности субъекта отвечать на терапию или выживаемости без заболевания/общей выживаемости, для которых NaPi2b является определяющим фактором.

При категориальной диагностике болезненного состояния изменение порога отсечения, или порогового значения, теста (или анализа) обычно приводит к изменению чувствительности и специфичности, но в качественно обратной зависимости. Вследствие этого, при оценке точности и полезности предлагаемого медицинского теста, анализа или метода для оценки состояния субъекта всегда следует учитывать как чувствительность, так и специфичность, и помнить о том, каков порог отсечения, при котором определяют чувствительность и специфичность, потому что чувствительность и специфичность могут значительно варьироваться в диапазоне порогов отсечения.

Создание клинических алгоритмов.

Можно использовать любые формулы для объединения результатов определения NaPi2b в индексы,

полезные при осуществлении на практике изобретения. Как указано выше, и без ограничения, такие индексы могут служить показателями, в числе различных других показателей, возможности, вероятности, абсолютных и относительных шансов ответа на, например, химиотерапию или химическую и лучевую терапию, то есть NaPi2b-таргетированную терапию, например, лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, описанным в настоящем документе и раскрытым в WO 2017/160754. Это можно использовать для конкретного периода или промежутка времени, или для оценки риска на оставшийся срок жизни, или просто предоставлять в качестве индекса относительно другой эталонной популяции субъектов.

Хотя в настоящем документе описаны различные предпочтительные формулы, несколько других типов моделей и формул, помимо тех, которые указаны в настоящем документе и в приведенных выше определениях, хорошо известны специалистам в данной области. Фактические используемые типы моделей или формул сами могут быть выбраны из области потенциальных моделей на основе характеристик эффективности и диагностической точности их результатов в учебной популяции.

Конкретные детали самой формулы обычно могут быть получены из результатов определения NaPi2b в соответствующей учебной популяции. Среди прочего, такая формула может быть предназначена для картирования пространства признаков, полученного из одного или более входных данных для определения классов субъектов (например, быть полезна для прогнозирования классификации субъектов как нормальных, отвечающих и не отвечающих на лечение), для оценки функции вероятности риска с использованием байесовского подхода (например, риска рака или метастазирования) или для оценки условных вероятностей для класса, с последующим использованием правила Байеса для определения функции вероятности для класса, как в предыдущем случае.

Способы лечения.

Выборный для лечения пациент получает терапевтически эффективное количество конъюгата анти-NaPi2b антитела (например, NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, описанного в настоящем документе или раскрытого в WO 2017/160754).

Соответственно, настоящее изобретение также относится к способам лечения, предотвращения, замедления прогрессирования или иного ослабления симптома рака, выбранного из группы, состоящей из эпителиального рака яичника, рака щитовидной железы, колоректального рака, рака легкого, немелкоклеточного рака легкого (NSCLC), такого как неплоскоклеточная NSCLC, аденокарциномы, рака молочной железы, рака почки, карциномы протоков слюнных желез, папиллярного рака щитовидной железы, папиллярного почечноклеточного рака, аденокарциномы протоков слюнных желез, рака эндометрия и холангиокарциномы, путем введения конъюгата анти-NaPi2b антитела (например, NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, описанного в настоящем документе или раскрытого в WO 2017/160753) субъекту, идентифицированному способами, описанными в настоящем документе. Субъект, который будет получать лечение, является, например, человеком. Конъюгат вводят в количестве, достаточном для лечения, предотвращения или ослабления симптома, связанного с патологией.

"Терапевтически эффективное количество", как правило, означает количество, необходимое для достижения терапевтической цели. Необходимое вводимое количество, кроме того, будет зависеть от аффинности связывания антитела с его специфическим антигеном и также будет зависеть от скорости, с которой введенное антитело удаляется из свободного объема жидкостей организма субъекта, которому его вводят. Режим дозирования при использовании конъюгатов, раскрытых в настоящем документе, также выбирают в зависимости от различных других факторов, включая тип, биологический вид, возраст, массу тела, пол и медицинское состояние пациента; степень тяжести подвергаемого лечению состояния; путь введения; функции почек и печени пациента; а также конкретный используемый конъюгат. Квалифицированный врач или ветеринар может с легкостью определять и предписывать эффективное количество конъюгата, необходимое для предотвращения, противодействия или остановки прогрессирования состояния.

Обычные диапазоны для терапевтически эффективных доз конъюгата анти-NaPi2b антитела, раскрытого в настоящем документе, могут представлять собой, в качестве неограничивающего примера, от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 50 мг/кг массы тела, от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 100 мг/кг массы тела или от примерно 0,1 мг/кг массы тела до примерно 150 мг/кг массы тела. Диапазоны, раскрытые в настоящем документе, выражены в виде количеств, введенных на основании массы тела субъекта, и квалифицированный специалист сможет с легкостью выразить их в виде количеств, введенных в расчете на площадь поверхности тела субъекта. Например, количество 1 мг/кг массы тела для взрослого человека эквивалентно примерно 37 мг/м^2 , и количество 1 мг/кг массы тела для ребенка эквивалентно примерно 25 мг/м^2 .

Обычная частота дозирования может находиться в диапазоне, например, от двух раз в сутки до одного раза в месяц (например, один раз в сутки, один раз в неделю; один раз в две недели; один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в месяц). Например, конъюгаты ХМТ-1535, раскрытые в настоящем документе, можно вводить (например, в виде одной дозы, каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или каждый месяц) в дозе от примерно 0,1 мг/кг до примерно 20 мг/кг

(например, 0,2, 0,4, 0,5, 0,67, 0,8, 1, 1,25, 1,67, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг). Например, конъюгаты ХМТ-1535, раскрытые в настоящем документе, можно вводить (например, в виде одной дозы, каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или каждый месяц) в дозе от примерно 0,1 до примерно 20 мг/кг (например, 0,2, 0,4, 0,5, 0,67, 0,8, 1, 1,25, 1,67, 2, 2,5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мг/кг) для лечения NaPi2b-экспрессирующего рака яичника или NaPi2b-экспрессирующей NSCLC.

Обычная частота дозирования может находиться в диапазоне, например, от двух раз в сутки до одного раза в месяц (например, один раз в сутки, один раз в неделю; один раз в две недели; один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в месяц). Например, конъюгаты ХМТ-1535, раскрытые в настоящем документе, можно вводить (например, в виде одной дозы, каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или каждый месяц) в дозе от примерно 3 до примерно 53 мг/м² (например, 3, 6, 12, 20, 25, 30, 35, 40 или 53 мг/м²). Например, конъюгаты ХМТ-1535, раскрытые в настоящем документе, можно вводить (например, в виде одной дозы, каждую неделю, каждые 2 недели, каждые 3 недели, каждые 4 недели или каждый месяц) в дозе от примерно 3 мг/м до примерно 53 мг/м (например, 3, 6, 12, 20, 25, 30, 35, 40 или 53 мг/м²) для лечения NaPi2b-экспрессирующего рака яичника или NaPi2b-экспрессирующей NSCLC.

Эффективность лечения определяют для любого известного способа диагностирования или лечения конкретного связанного с NaPi2b заболевания. Ослабление одного или более симптомов связанного с NaPi2b заболевания указывает на то, что антитело приносит клиническую пользу.

Наборы

Изобретение относится к наборам, включающим химерные анти-NaPi2b антитела (например, MERS67), которые позволяют определять уровень экспрессии NaPi2b в образце от пациента (например, ряд антигенов на клетку), и терапевтическую композицию, содержащую эффективное количество NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, описанного в настоящем документе или раскрытого в WO 2017/160754. При необходимости, набор дополнительно включает указания по определению уровня экспрессии NaPi2b и определению того, будет ли NaPi2b-таргетированный конъюгат полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытый в WO 2017/160754, эффективным при введении пациенту. Предпочтительно, набор представляет собой набор для проведения иммуногистохимического теста. Необязательно, набор также включает инструкции по введению NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, описанного в настоящем документе или раскрытого в WO 2017/160754, пациенту, который выбран для получения такого лечения.

Определения.

Если нет иных указаний, научные и технические термины, используемые в связи с настоящим изобретением, должны иметь то значение, которое им обычно придают специалисты в данной области. Кроме того, если иное не следует из контекста, термины в единственном числе должны включать термины во множественном числе, и термины во множественном числе должны включать термины в единственном числе. В целом, номенклатуры, используемые для описания, и методы культивирования клеток и тканей, методы молекулярной биологии, химии белков и олиго- или полинуклеотидов, а также гибридизации, описанные в настоящем документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области. Стандартные методы используют для рекомбинантных ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также культивирования и трансформации тканей (например, электропорацию, липофекцию). Ферментативные реакции и методы очистки используют в соответствии с инструкциями производителей или как принято в данной области, или как описано в настоящем документе. Вышеупомянутые методы и процедуры, как правило, применяют общепринятым образом, как хорошо известно в данной области и как описано в различных общих и более специализированных литературных источниках, которые цитируют и обсуждают на всем протяжении настоящей спецификации. См. например, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Номенклатуры, используемые для описания, а также лабораторные процедуры и методы аналитической химии, химии органического синтеза, а также медицинской и фармацевтической химии, описанные в настоящем документе, являются хорошо известными и широко используемыми в данной области. Стандартные методы используют для химического синтеза, химических анализов, изготовления фармацевтических препаратов, формулирования, а также для доставки и лечения пациентов.

При использовании в соответствии с настоящим изобретением следующие термины, если нет иных указаний, должны иметь следующие значения.

Используемый в настоящем документе термин "NaPi2b" (также известный как натрий-зависимый белок-переносчик фосфата 2В, SLC34A2, NaPiIb, Npt2, Na(+)-зависимый котранспортер фосфата 2В; котранспортер натрия/фосфата 2В; котранспортер Na(+)/Pi 2В; NaPi3b; представитель 2 семейства 34 переносчиков растворенных веществ) относится к человеческому NaPi2b (например, имеющему регистрационный № GenBank 095436.3) и охватывает любые варианты, изоформы и видовые гомологи NaPi2b, которые естественным образом экспрессируются клетками, включая клетки опухолей, или экспрессируются на клетках, трансфицированных геном NaPi2b. Эти термины являются синонимами и могут быть использованы взаимозаменяемо.

Используемый в настоящем документе термин "антитело к NaPi2b" или "анти-NaPi2b антитело" означает антитело, которое специфически связывает антиген NaPi2b.

При использовании в настоящем документе в контексте двух или более антител термин "конкурирует с" или "перекрестно конкурирует с" указывает на то, что два или более антител конкурируют за связывание с NaPi2b, например, конкурируют за связывание с NaPi2b в любом признанном в данной области анализе. Антитело "блокирует" или "перекрестно блокирует" связывание одного или более других антител с NaPi2b, если антитело конкурирует с одним или более другими антителами на уровне 25% или более, при этом 25-74% соответствуют "частичному блокированию" и 75-100% соответствуют "полному блокированию", что определяют с использованием любого признанного в данной области анализа. Для некоторых пар антител конкуренцию или блокирование в любом признанном в данной области анализе наблюдают только когда одно антитело нанесено на планшет, и другое используют для конкуренции, но не наоборот. Если не указано иначе, и если иное не следует из контекста, термины "конкурирует с", "перекрестно конкурирует с", "блокирует" или "перекрестно блокирует" при использовании в настоящем документе должны также охватывать такие пары антител.

Используемый в настоящем документе термин "антитело" означает молекулы иммуноглобулинов и иммунологически активные фрагменты молекул иммуноглобулинов (Ig), то есть, молекулы, содержащие антигенсвязывающий сайт, который специфически связывается (иммунологически реагирует) с антигеном. Термины "специфически связывается" или "иммунологически реагирует" или "направлено против" означают, что антитело взаимодействует с одной или более антигенными детерминантами нужного антигена и не реагирует с другими полипептидами, или связывает их с гораздо более низкой аффинностью ($K_d > 10^{-6}$). Антитела включают, но без ограничения, поликлональные, моноклональные и химерные антитела.

Известно, что основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер. Каждый тетрамер состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара имеет одну "легкую" (примерно 25 кДа) и одну "тяжелую" (примерно 50-70 кДа) цепь. Амино-концевая часть каждой цепи включает вариабельную область из примерно 100-110 или более аминокислот, главным образом ответственных за узнавание антигена. Карбокси-концевая часть каждой цепи имеет константную область, главным образом ответственную за эффекторную функцию. Как правило, молекулы антител у людей относятся к какому-либо из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга характером тяжелой цепи, имеющейся в молекуле. Некоторые классы также имеют подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой цепь каппа или цепь ламбда.

Используемый в настоящем документе термин "моноклональное антитело" (mAb) или "композиция моноклонального антитела" означает популяцию молекул антитела, содержащую молекулы антитела только одного вида, состоящие из уникального продукта гена легкой цепи и уникального продукта гена тяжелой цепи. В частности, определяющие комплементарность области (CDR) моноклонального антитела являются идентичными во всех молекулах популяции. Моноклональные антитела (mAb) содержат антигенсвязывающий сайт, способный к иммунологическому взаимодействию с конкретным эпитопом антигена, характеризующему уникальной аффинностью связывания для него.

Используемый в настоящем документе термин "химерное" означает, что антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит последовательности из двух разных биологических видов. Химерные антитела представляют собой молекулы иммуноглобулинов, содержащие фрагменты человеческого антитела и не принадлежащего человеку антитела. Более конкретно, антигенсвязывающая область (вариабельная область) химерного антитела происходит из человеческого антитела, и константная область химерного антитела, которая придает иммуноглобулину биологические эффекторные функции, происходит из антитела, отличного от человеческого. Химерное антитело должно иметь специфичность связывания антигена молекулы человеческого антитела, и эффекторную функцию, придаваемую молекулой антитела, отличного от человеческого. Способы получения химерных антител по изобретению знакомы специалистам в данной области, смотри, например, патент США № 4816567, патент США № 5585089 и US 20030039649, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки в полном объеме. Такие способы требуют использования стандартных рекомбинантных методов.

Как правило, молекулы антител человека относятся к одному из классов IgG, IgM, IgA, IgE и IgD, которые отличаются друг от друга характером тяжелой цепи, имеющейся в молекуле. Некоторые классы также имеют подклассы, такие как IgG₁, IgG₂ и другие. Кроме того, у человека легкая цепь может представлять собой цепь каппа или цепь ламбда.

Термин "антигенсвязывающий сайт" или "связывающий фрагмент" означают часть молекулы иммуноглобулина, которая участвует в связывании антигена. Антигенсвязывающий сайт образован аминокислотными остатками N-концевых вариабельных ("V") областей тяжелой ("H") и легкой ("L") цепей. Три сильно отличающихся участка в V-областях тяжелой и легкой цепей, называемые "гипервариабельными областями", расположены между более консервативными фланкирующими участками, известными как "каркасные области" или "FR". Таким образом, термин "FR" означает аминокислотные последовательности, которые обычно расположены между, и рядом с, гипервариабельными областями в иммуног-

лобулинах. В молекуле антитела три гипервариабельные области легкой цепи и три гипервариабельные области тяжелой цепи расположены относительно друг друга в трехмерном пространстве, образуя антигенсвязывающую поверхность. Антигенсвязывающая поверхность комплементарна трехмерной поверхности связанного антигена, и три гипервариабельные области каждой из тяжелой и легкой цепей называют "определяющими комплементарность областями" или "CDR". Отнесение аминокислот к каждому домену производят в соответствии с определениями, приведенными в публикации Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)), или Chothia & Lesk J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987), Chothia et al. Nature 342:878-883 (1989).

Используемый в настоящем документе термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином, или его фрагментом, или Т-клеточным рецептором. Термин "эпитоп" включает любую белковую детерминанту, способную к специфическому связыванию с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. Эпитопные детерминанты, как правило, состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и обычно имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядные характеристики. Говорят, что антитело специфически связывает антиген, когда константа диссоциации составляет ≤ 1 мкМ; например, ≤ 100 нМ, предпочтительно ≤ 10 нМ и более предпочтительно ≤ 1 нМ.

Используемые в настоящем документе термины "иммунологическое связывание" и "свойства иммунологического связывания" относятся к нековалентным взаимодействиям, которые имеют место между молекулой иммуноглобулина и антигеном, для которого иммуноглобулин является специфическим. Силу, или аффинность, взаимодействий иммунологического связывания можно выражать константой диссоциации (K_d) взаимодействия, при этом более низкая K_d соответствует более высокой аффинности. Свойства иммунологического связывания выбранных полипептидов можно количественно определять методами, хорошо известными в данной области. Один такой метод включает измерение скоростей образования и диссоциации комплекса антигенсвязывающий сайт/антиген, при этом эти скорости зависят от концентраций партнеров по комплексу, аффинности взаимодействия и геометрических параметров, которые в равной степени влияют на скорость в обоих направлениях. Таким образом, как "константу скорости ассоциации" (K_{on}), так и "константу скорости диссоциации" (K_{off}), можно определять путем расчета концентраций и фактических скоростей ассоциации и диссоциации. (Смотри Nature 361:186-87 (1993)). Отношение K_{off}/K_{on} позволяет устранять все параметры, не связанные с аффинностью, и равно константе диссоциации K_d . (Смотри, в основном, Davies et al. (1990) Annual Rev Biochem 59:439-473). Говорят, что антитело по настоящему изобретению специфически связывает NaPi2b, если равновесная константа диссоциации (K_d или K_D) составляет ≤ 1 мкМ, предпочтительно ≤ 100 нМ, более предпочтительно ≤ 10 нМ и наиболее предпочтительно от ≤ 100 пМ до примерно 1 пМ, при измерении в таких анализах, как анализы связывания радиоактивного лиганда или аналогичные анализы, известные специалистам в данной области.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный полинуклеотид" должен означать полинуклеотид геномного, кДНК или синтетического происхождения, некоторые их сочетания, который, в силу его происхождения как "выделенного полинуклеотида" (1) не связан со всем или с частью полинуклеотида, в котором "выделенный полинуклеотид" встречается в природе, (2) функционально связан с полинуклеотидом, с которым он не связан в природе, или (3) не существует в природе в виде части большей по последовательности.

Используемый в настоящем документе термин "выделенный белок" означает белок, полученный из кДНК, рекомбинантной РНК, или синтетического происхождения, или некоторые их сочетания, который, в силу его происхождения или источника получения как "выделенного белка" (1) не связан с белками, встречающимися в природе, (2) свободен от других белков из того же источника, (3) экспрессируется клеткой другого биологического вида, или (4) не существует в природе.

Термин "полипептид" в настоящем документе используют в качестве общего термина для обозначения природного белка, фрагментов или аналогов полипептидной последовательности. Таким образом, фрагменты и аналоги природного белка являются разновидностями полипептида.

Термин "природный", используемый в настоящем документе применительно к объекту, отражает тот факт, что объект может встречаться в природе. Например, полипептидная или полинуклеотидная последовательность, присутствующая в организме (включая вирусы), которая может быть выделена из природного источника, и которая не была намеренно модифицирована рукой человека в лабораторных или иных условиях, является природной.

Используемый в настоящем документе термин "функционально связанные" означает, что компоненты, описанные подобным образом, находятся во взаимосвязи, позволяющей им функционировать предназначенным для них образом.

Контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью, связана таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности достигается в условиях, совместимых с контрольной последовательностью.

Используемый в настоящем документе термин "контрольная последовательность" относится к полинуклеотидным последовательностям, которые необходимы для осуществления экспрессии и процессинга кодирующих последовательностей, с которыми они связаны. Природа таких контрольных последовательностей отличается в зависимости от организма-хозяина; у прокариот такие контрольные последовательности, как правило, включают промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции; у эукариот, как правило, такие контрольные последовательности включают промоторы и последовательность терминации транскрипции. Термин "контрольные последовательности" должен включать, как минимум, все компоненты, присутствие которых необходимо для экспрессии и процессинга, и также может включать дополнительные компоненты, присутствие которых полезно, например, лидерные последовательности и последовательности партнеров по слиянию. Используемый в настоящем документе термин "полинуклеотид" означает полимер из нуклеотидов длиной по меньшей мере 10 оснований, или рибонуклеотидов, или дезоксирибонуклеотидов, или модифицированных форм нуклеотидов любого типа. Термин включает одно- и двухцепочечные формы ДНК.

Используемый в настоящем документе термин "олигонуклеотид" означает природные и модифицированные нуклеотиды, связанные вместе природными и не природными межнуклеотидными связями. Олигонуклеотиды составляют подгруппу полинуклеотидов, как правило, имеющих длину 200 или менее оснований. Предпочтительно, олигонуклеотиды имеют длину от 10 до 60 оснований, и наиболее предпочтительно, длину 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20-40 оснований. Олигонуклеотиды, как правило, являются одноцепочечными, например, в случае зондов, хотя олигонуклеотиды могут быть двухцепочечными, например, для использования в конструировании мутантного гена. Олигонуклеотиды, раскрытые в настоящем документе, являются либо смысловыми, либо антисмысловыми олигонуклеотидами.

Следующие термины используют для описания взаимосвязи последовательностей между двумя или более полинуклеотидными или аминокислотными последовательностями: "эталонная последовательность", "окно сравнения", "идентичность последовательностей", "процент идентичности последовательностей" и "существенная идентичность". "Эталонная последовательность" представляет собой последовательность, используемую в качестве основы для сравнения последовательностей, эталонная последовательность может представлять собой часть большей по размеру последовательности, например, сегмент полноразмерной кДНК или геновой последовательности, приведенной в списке последовательностей, или может содержать полную кДНК или геновую последовательность. Как правило, эталонная последовательность имеет длину по меньшей мере 18 нуклеотидов или 6 аминокислот, часто длину по меньшей мере 24 нуклеотидов или 8 аминокислот, и часто длину по меньшей мере 48 нуклеотидов или 16 аминокислот. Поскольку из двух полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей каждая может (1) содержать последовательность (то есть, часть полной полинуклеотидной или аминокислотной последовательности), которая является сходной у двух молекул, и (2) может дополнительно содержать последовательность, которая отличается у двух полинуклеотидных или аминокислотных последовательностей, то сравнение последовательностей между двумя (или более) молекулами, как правило, проводят путем сравнения последовательностей двух молекул в "окне сравнения" для идентификации и сравнения областей локального сходства последовательностей. Используемый в настоящем документе термин "окно сравнения" относится к концептуальному сегменту из по меньшей мере 18 смежных нуклеотидных положений или 6 аминокислот, при этом полинуклеотидная последовательность или аминокислотная последовательность может быть сравнена с эталонной последовательностью из по меньшей мере 18 смежных нуклеотидов или 6 аминокислот, и при этом часть полинуклеотидной последовательности в окне сравнения может иметь добавления, делеции, замены и тому подобное (то есть, пробелы) в количестве 20 процентов, или менее, в сравнении с эталонной последовательностью (которая не имеет добавления или делеции) для оптимального выравнивания двух последовательностей. Оптимальное выравнивание последовательностей для выравнивания окна сравнения можно проводить с помощью алгоритма локальной гомологии Смита-Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), с помощью алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана-Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), методом поиска подобия Пирсона-Липмана, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 85:2444 (1988), с помощью компьютеризированной реализации этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программ Wisconsin Genetics Software Package, выпуск 7.0, (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.), Geneworks, или пакет программ MacVector), или путем визуальной инспекции, и выбирают наилучшее выравнивание (то есть, приводящее к максимальному проценту гомологии в окне сравнения), достигнутое с помощью различных методов.

Термин "идентичность последовательностей" означает, что две полинуклеотидные или аминокислотные последовательности являются идентичными (то есть по нуклеотидам или аминокислотным остаткам) в окне сравнения. Термин "процент идентичности последовательностей" рассчитывают путем сравнения двух оптимально выровненных последовательностей в окне сравнения, определения числа положений, в которых идентичные нуклеотиды (например, А, Т, С, G, U или I) или аминокислотные остатки присутствуют в обеих последовательностях, с получением числа совпадающих положений, деления числа совпадающих положений на общее число положений в окне сравнения (то есть, ширину окна) и умножения результата на 100, с получением процента идентичности последовательностей. Используе-

мый в настоящем документе термин "существенная идентичность" является характеристикой полинуклеотидной или аминокислотной последовательности, указывающей на то, что полинуклеотидная или аминокислотная последовательность представляет собой последовательность, имеющую по меньшей мере 85-процентную идентичность последовательности, предпочтительно по меньшей мере 90-95-процентную идентичность последовательности, чаще по меньшей мере 99-процентную идентичность последовательности при сравнении с эталонной последовательностью в окне сравнения из по меньшей мере 18 нуклеотидных (6 аминокислотных) положений, часто в окне из по меньшей мере 24-48 нуклеотидных (8-16 аминокислотных) положений, при этом процент идентичности последовательностей рассчитывают путем сравнения эталонной последовательности с последовательностью, которая может иметь делеции или добавления, составляющие в сумме 20 процентов, или менее, от эталонной последовательности в окне сравнения. Эталонная последовательность может представлять собой часть большей по размеру последовательности.

В настоящем документе для двадцати обычных аминокислот используют общепринятые в данной области аббревиатуры. Смотри Immunology - A Synthesis (2-е издание, E.S. Golub and D.R. Green, Eds., Sinauer Associates, Sunderland 7 Mass. (1991)). Стереоизомеры (например, D-аминокислоты) двадцати обычных аминокислот, неприродные аминокислоты, такие как α -, α -двухзамещенные аминокислоты, N-алкиламинокислоты, молочная кислота и другие необычные аминокислоты, также могут быть подходящими компонентами полипептидов по настоящему изобретению. Примеры необычных аминокислот включают: 4-гидроксипролин, γ -карбоксиглутамат, ϵ -N, N,N-триметиллизин, ϵ -N-ацетиллизин, O-фосфосерин, N-ацетилсерин, N-формилметионин, 3-метилгистидин, 5-гидроксилизин, σ -N-метиларгинин и другие аналогичные аминокислоты и иминокислоты (например, 4-гидроксипролин). При описании в настоящем документе полипептидов слева находится аминоконцевая часть и справа находится карбокси-концевая часть, в соответствии со стандартными правилами.

Аналогично, если не указано иначе, левый конец одноцепочечной полинуклеотидной последовательности представляет собой 5'-конец, и левостороннее направление двухцепочечной полинуклеотидной последовательности называют 5'-направлением. Области добавления образующихся РНК-транскриптов в направлении от 5'- к 3'-концу называют областями последовательности в направлении транскрипции на цепи ДНК, имеющей ту же последовательность, что и РНК, и области, которые находятся в 5'-направлении относительно 5'-конца РНК-транскрипта, называют "вышерасположенными последовательностями" на цепи ДНК, имеющей ту же последовательность, что и РНК, а области, расположенные в 3'-направлении относительно 3'-конца РНК-транскрипта, называют "нижнерасположенными последовательностями".

Применительно к полипептидам термин "существенная идентичность" означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, например, при помощи программ GAP или BEST-FIT с использованием штрафов за пробелы по умолчанию, имеют по меньшей мере 80-процентную идентичность последовательностей, предпочтительно по меньшей мере 90-процентную идентичность последовательностей, более предпочтительно по меньшей мере 95-процентную идентичность последовательностей, и наиболее предпочтительно по меньшей мере 99-процентную идентичность последовательностей.

Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются вследствие консервативных аминокислотных замен.

Консервативные аминокислотные замены означают взаимные замены остатков, имеющих аналогичные боковые цепи. Например, группа аминокислот, имеющих алифатические боковые цепи, включает глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; группа аминокислот, имеющих алифатические гидроксильные боковые цепи, включает серин и треонин; группа аминокислот, имеющих амид-содержащие боковые цепи, включает аспарагин и глутамин; группа аминокислот, имеющих ароматические боковые цепи, включает фенилаланин, тирозин и триптофан; группа аминокислот, имеющих основные боковые цепи, включает лизин, аргинин и гистидин; и группа аминокислот, имеющих сера-содержащие боковые цепи, включает цистеин и метионин. Предпочтительными группами для консервативных аминокислотных замен являются: валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутаминовая кислота-аспарагиновая кислота и аспарагин-глутамин.

Как описано в настоящем документе, предусмотрено, что незначительные вариации аминокислотных последовательностей антител или молекул иммуноглобулинов охвачены настоящим изобретением, при условии, что измененная аминокислотная последовательность сохраняется на по меньшей мере 75%, более предпочтительно по меньшей мере 80, 85, 90, 95%, и наиболее предпочтительно 99%. В частности, предусмотрены консервативные аминокислотные замены. Консервативными заменами являются такие замены, которые происходят в пределах семейства аминокислот, имеющих аналогичные боковые цепи. Генетически кодируемые аминокислоты, как правило, подразделяют на следующие семейства: (1) кислыми аминокислотами являются аспартат, глутамат; (2) основными аминокислотами являются лизин, аргинин, гистидин; (3) неполярными аминокислотами являются аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин, триптофан, и (4) незаряженными полярными аминокислотами являются

глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин, тирозин. Гидрофильные аминокислоты включают аргинин, аспарагин, аспартат, глутамин, глутамат, гистидин, лизин, серин и треонин. Гидрофобные аминокислоты включают аланин, цистеин, изолейцин, лейцин, метионин, фенилаланин, пролин, триптофан, тирозин и валин. Другие семейства аминокислот включают (i) серин и треонин, которые являются представителями семейства алифатических гидроксикаминокислот; (ii) аспарагин и глутамин, которые являются представителями семейства амид-содержащих аминокислот; (iii) аланин, валин, лейцин и изолейцин, которые являются представителями семейства алифатических аминокислот; и (iv) фенилаланин, триптофан и тирозин, которые являются представителями семейства ароматических аминокислот. Например, есть основания ожидать, что отдельная замена лейцина на изолейцин или валин, аспартата на глутамат, треонина на серин, или аналогичная замена аминокислоты на структурно родственную аминокислоту не будет оказывать сильного влияния на связывание или свойства полученной молекулы, особенно, если замена не затрагивает аминокислоту в области каркаса. Приводит ли замена аминокислоты к функциональному пептиду, можно с легкостью определять путем анализа специфической активности производного полипептида. Анализы подробно описаны в настоящем документе. Аналоги антител или молекул иммуноглобулинов могут быть с легкостью получены специалистами в данной области. Предпочтительные амино- и карбокси-концы аналогов находятся вблизи границ функциональных доменов. Структурные и функциональные домены можно идентифицировать путем сравнения данных по нуклеотидным и/или аминокислотным последовательностям с общедоступными или проприетарными базами данных для последовательностей. Предпочтительно, используют компьютеризованные методы сравнения для идентификации фрагментов последовательностей или предсказания конформации белковых доменов, имеющих в других белках с известной структурой и/или функцией. Способы идентификации белковых последовательностей, которые сворачиваются в известную трехмерную структуру, известны. Bowie et al. *Science* 253:164 (1991). Таким образом, приведенные выше примеры показывают, что специалисты в данной области могут узнавать фрагменты последовательностей и структурные конформации, которые могут быть использованы для определения структурных и функциональных доменов по изобретению.

Предпочтительными аминокислотными заменами являются такие, которые:

- (1) уменьшают подверженность протеолизу,
- (2) уменьшают подверженность окислению,
- (3) приводят к изменению аффинности связывания для образования белковых комплексов,
- (4) приводят к изменению аффинности связывания и (4) придают или изменяют другие физико-химические или функциональные свойства таких аналогов.

Аналоги могут включать различные мутации последовательности, отличные от природной пептидной последовательности. Например, одну или несколько аминокислотных замен (предпочтительно консервативных аминокислотных замен) можно производить в природной последовательности (предпочтительно в части полипептида за пределами домена(ов), участвующих в межмолекулярных контактах). Консервативная аминокислотная замена не должна существенно изменять структурные характеристики исходной последовательности (например, замена аминокислоты не должна приводить к разрыву спирали, которая имеет место в исходной последовательности, или нарушать другие виды вторичной структуры, характерной для исходной последовательности). Примеры признанных в данной области вторичных и третичных структур полипептидов приведены в публикациях *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman and Company, New York (1984)); *Introduction to Protein Structure* (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N.Y. (1991)); и Thornton et al. *Nature* 354:105 (1991).

Используемый в настоящем документе термин "средство" означает химическое соединение, смесь химических соединений, биологическую макромолекулу или экстракт из биологических материалов.

Используемые в настоящем документе термины "метка" или "мечение" означают включение подающегося определению маркера, например, за счет включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду молекул биотина, которые могут быть обнаружены при помощи маркированного авидина (например, стрептавидина, содержащего флуоресцентный маркер, или фермент, активность которого может быть обнаружена оптическими или колориметрическими методами). В конкретных ситуациях метка или маркер также могут быть терапевтическими. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны в данной области и могут быть использованы. Примеры меток для полипептидов включают, но без ограничения, следующие: радиоизотопы или радиоактивные изотопы (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные метки (например, FITC, родамин, люминофоры на основе комплексов лантанидов), ферментные метки (например, пероксидаза хрена, п-галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные, биотинильные группы, установленные полипептидные эпитопы, узнаваемые вторичным репортером (например, пары последовательностей "лейциновые застежки", сайты связывания для вторичных антител, металл-связывающие домены, эпитопные метки). В некоторых вариантах осуществления потенциального стерического препятствия. Используемый в настоящем документе термин "фармацевтическое средство или лекарственное средство" означает химическое соединение, или композицию, способное оказывать желаемый терапевтический

эффект при правильном введении пациенту.

Другие химические термины в настоящем документе используют в соответствии с их общепринятым применением в данной области, примеры приведены в The McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms (Parker, S., Ed., McGraw-Hill, San Francisco (1985)).

При использовании в настоящем документе выражение "практически чистая" означает, что конкретная молекула является преобладающей присутствующей молекулой (то есть, в молярном выражении она присутствует в большем количестве, чем молекулы любых других видов в композиции), и предпочтительно, практически очищенная фракция представляет собой композицию, в которой конкретная молекула составляет по меньшей мере примерно 50 процентов (в молярном выражении) от всех присутствующих макромолекул.

Как правило, практически чистая композиция будет содержать более примерно 80 процентов от всех макромолекул, присутствующих в композиции, более предпочтительно, более примерно 85, 90, 95 и 99%, молекул одного вида. Наиболее предпочтительно, конкретная молекула очищена практически до гомогенности (примесные молекулы не могут быть обнаружены в композиции общепринятыми методами обнаружения), когда композиция состоит практически из макромолекул одного вида.

Термины в единственном числе, как в описании, так и в формуле изобретения, должны включать как термины в единственном числе, так и термины во множественном числе, если в настоящем документе нет иных указаний или это не противоречит контексту. Термины "состоящий", "имеющий", "представляющий собой", а также "имеющий химическую формулу", "включающий" и "содержащий" следует считать открытыми терминами (то есть, означающими "включая, но без ограничения"), если нет иных указаний. Например, полимерный каркас с конкретной формулой включает все мономерные единицы, представленные в формуле, и также может включать дополнительные мономерные единицы, не представленные в формуле. Кроме того, когда термин "состоящий" или другой открытый термин используют в варианте осуществления, следует понимать, что тот же вариант осуществления может быть заявлен в более узком смысле с использованием промежуточного термина "состоящий в основном из" или закрытого термина "состоящий из".

Термины "примерно", "около" или "приблизительно" при использовании в связи с числовым значением означают, что включен набор диапазонов значений. Например, "примерно X" включает диапазон значений, которые составляют ± 20 , ± 10 , ± 5 , ± 2 , ± 1 , $\pm 0,5$, $\pm 0,2$ или $\pm 0,1\%$ от X, где X представляет собой числовое значение. В одном варианте осуществления термин "примерно" означает диапазон значений, которые составляют на 5% больше, или меньше, чем указанное значение. В другом варианте осуществления термин "примерно" означает диапазон значений, которые составляют на 2% больше, или меньше, чем указанное значение. В другом варианте осуществления термин "примерно" означает диапазон значений, которые составляют на 1% больше, или меньше, чем указанное значение.

Перечисление диапазонов значений в основном служит способом сокращения перечисления отдельно каждого индивидуального значения, попадающего в данный диапазон, если нет иных указаний в настоящем документе, и каждое отдельное значение включено в спецификацию, как если бы оно было отдельно перечислено в настоящем документе. Диапазон, используемый в настоящем документе, если не указано иначе, включает два предельных значения диапазона. Например, оба выражения "x представляет собой целое число от 1 до 6" и "x представляет собой целое число в диапазоне 1-6" означают "x представляет собой 1, 2, 3, 4, 5 или 6", то есть, термины "от X до Y" и "в диапазоне X-Y", включают значения X и Y и целые числа между ними.

"Лекарственное средство": Используемый в настоящем документе термин "лекарственное средство" означает соединение, которое является биологически активным и оказывает желаемое физиологическое действие после введения субъекту, который нуждается в этом (например, активный фармацевтический ингредиент).

"Средство против ангиогенеза" или "ингибитор ангиогенеза" означает низкомолекулярное соединение, полинуклеотид, полипептид, выделенный белок, рекомбинантный белок, антитело, или его конъюгаты или слитые белки, которые ингибируют ангиогенез, васкулогенез или нежелательную проницаемость сосудов, либо непосредственно, либо опосредованно. Ингибитор ангиогенеза включает средства, которые связывают и блокируют ангиогенную активность ангиогенного фактора или его рецептора. Например, средство против ангиогенеза представляет собой антитело или другой антагонист ангиогенного средства, включая, но без ограничения, антитела к рецептору VEGF-A или VEGF-A (например, рецептору KDR или рецептору Flt-1), VEGF-ловушку, анти-PDGFR ингибиторы, такие как глибекTM (иматиниб мезилат). Средства против ангиогенеза также включают природные ингибиторы ангиогенеза, например, ангиостатин, эндостатин и тому подобное.

"Цитотоксические": Используемый в настоящем документе термин "цитотоксические" означает токсические для клеток или выбранной клеточной популяции (например, раковых клеток). Токсический эффект может приводить к гибели и/или лизису клеток. В некоторых случаях токсический эффект может представлять собой сублетальный деструктивный эффект на клетки, например, замедление или остановку клеточного роста. Для достижения цитотоксического эффекта лекарственное средство или пролекар-

ство можно выбирать из группы, состоящей из повреждающего ДНК средства, деполимеризатора микротрубочек, либо цитотоксического белка или полипептида, в числе прочих.

"Цитостатические": используемый в настоящем документе термин "цитостатические" относится к лекарственным средствам или другим соединениям, которые ингибируют или останавливают рост и/или размножение клеток.

"Малая молекула": используемый в настоящем документе термин "малая молекула" относится к молекулам, или природным, или искусственно созданным (например, путем химического синтеза), которые имеют относительно низкую молекулярную массу. Предпочтительные малые молекулы являются биологически активными в том, что они производят локальный или системный эффект в организме животных, предпочтительно млекопитающих, более предпочтительно людей. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления малая молекула представляет собой лекарственное средство, и малую молекулу называют "молекула лекарственного средства" или "лекарственное средство", или "терапевтическое средство". В конкретных вариантах осуществления молекула лекарственного средства имеет ММ менее или ровно примерно 5 кДа. В других вариантах осуществления молекула лекарственного средства имеет ММ менее или ровно примерно 1,5 кДа. В вариантах осуществления молекулу лекарственного средства выбирают из алкалоидов барвинка, ауристатинов, дуокармицинов, тубулизинов, неприродных соединений камптотецина, ингибиторов топоизомеразы, ДНК-связывающих лекарственных средств, ингибиторов киназы, ингибиторов МЕК, ингибиторов KSP, калихеамицинов, SN38, пирролобензодиазепинов, а также их аналогов. Предпочтительно, хотя и не обязательно, лекарственное средство представляет собой лекарственное средство, которое уже признано соответствующим государственным агентством или организацией, например, FDA, безопасным и эффективным для использования. Например, все лекарственные средства для использования применительно к человеку, перечисленные в документах FDA в разделе 21 C.F.R. §§ 330.5, 331-361 и 440-460; лекарственные средства для ветеринарного применения, перечисленные в документах FDA в разделе 21 C.F.R. §§ 500-589, содержание которых включено в настоящий документ посредством ссылки, считаются подходящими для использования с гидрофильными полимерами, описанными в настоящем документе.

Используемые в настоящем документе термины "производное лекарственного средства" или "модифицированное лекарственное средство", или тому подобные, означают соединение, которое содержит молекулу лекарственного средства, предназначенную для доставки с помощью конъюгата, раскрытого в настоящем документе, и функциональную группу, способную присоединять молекулу лекарственного средства к полимерному носителю.

Используемый в настоящем документе термин "активная форма" означает форму соединения, которая проявляет ожидаемую фармацевтическую эффективность *in vivo* или *in vitro*. В частности, когда молекула лекарственного средства, предназначенная для доставки с помощью конъюгата, раскрытого в настоящем документе, высвобождается из конъюгата, активная форма может представлять собой само лекарственное средство или его производные, которые проявляют ожидаемые терапевтические свойства. Высвобождения лекарственного средства из конъюгата можно добиваться путем расщепления биоразлагаемой связи линкера, который соединяет лекарственное средство с полимерным носителем. Соответственно, активные производные лекарственного средства могут содержать часть линкера.

"РНФ" означает поли(1-гидроксиметилэтилен гидроксиметил-формаль).

Все используемые в настоящем документе термины "единица полимера", "мономерная единица", "мономер", "мономерная составляющая", "единица" означают повторяющуюся структурную единицу в полимере.

Используемый в настоящем документе термин "молекулярная масса", или "ММ", полимера или полимерного носителя/каркаса, или полимерных конъюгатов, означает средневзвешенную молекулярную массу не модифицированного полимера, если не указано иначе.

Используемый в настоящем документе термин "лечение", или "лечить", означает принятие необходимых мер и уход за пациентом с целью борьбы с заболеванием, состоянием или нарушением, и включает введение конъюгата по изобретению, или его фармацевтической композиции, для ослабления симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения, или для устранения заболевания, состояния или нарушения.

Используемый в настоящем документе термин "предотвращение", или "профилактика", означает уменьшение риска развития заболевания или состояния, либо уменьшение проявления или устранение развития симптомов или осложнений заболевания, состояния или нарушения.

Термин "эффективное количество", или "достаточное количество", применительно к активному средству означает количество, необходимое для вызывания желаемого биологического ответа. Используемый в настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество", или "терапевтически эффективная доза", означает количество, или количественную меру, средства, соединения, материала или композиции, содержащей соединение, которое является по меньшей мере достаточным для оказания подающего обнаружению терапевтического эффекта. Эффект можно обнаруживать любым аналитическим методом, известным в данной области. Точное эффективное количество для субъекта будет зависеть от массы тела субъекта, его размеров и состояния здоровья; природы и степени тяжести заболева-

ния; а также терапевтического средства, выбранного для введения.

"Субъект" включает человека, а также не являющегося человеком животное, на любой стадии развития, включая, например, любое млекопитающее, человека, примата, птицу, мышь, крысу, домашнюю птицу, собаку, кошку, корову, лошадь, козу, верблюда, овцу или свинью. Предпочтительно, не являющееся человеком животное представляет собой млекопитающее (такое как грызун, мышь, крыса, кролик, обезьяна, собака, кошка, примат или свинья). Животное может быть трансгенным животным или человеческим клоном. Предпочтительно, млекопитающее является человеком. Термин "субъект" охватывает животных.

Используемый в настоящем документе термин "набор" означает сочетание компонентов, например, сочетание композиций, описанных в настоящем документе, и другого объекта, служащего определенной цели, включая, но без ограничения, восстановление, активацию, а также инструменты/устройства для доставки, введения, диагностирования и оценки биологической активности или свойства. Наборы, необязательно, включают инструкции по применению.

Используемый в настоящем документе термин "создание контакта" означает проведение реакции, оказание воздействия, инкубацию образца опухоли, или пробы, с анти-NaPi2b антителом.

Описанный в настоящем документе "ответ пациента", или "ответ", или "пользу", в результате лечения можно оценивать с использованием любого критерия эффективности, указывающего на пользу для пациента, включая, без ограничения, (1) ингибирование, в некоторой степени, прогрессирования заболевания, в том числе, но без ограничения, замедление и полную остановку; (2) уменьшение числа эпизодов и/или симптомов заболевания; (3) уменьшение размера опухоли; (4) ингибирование (то есть уменьшение, замедление или полную остановку) распространения заболевания; (5) облегчение, в некоторой степени, одного или более симптомов, связанных с заболеванием; (6) уменьшение смертности в конкретный период времени после лечения.

Используемый в настоящем документе термин "образец ткани" означает набор аналогичных клеток, полученных из ткани субъекта или индивидуума. Источником ткани может быть твердая ткань в форме свежего, замороженного и/или консервированного органа, образца ткани, биоптата и/или аспирационного биоптата; кровь или любые компоненты крови, такие как плазма; жидкости организма, такие как спинномозговая жидкость, амниотическая жидкость, внутрибрюшная жидкость или кишечный сок; клетки из организма субъекта на любой стадии созревания или развития субъекта. Образец ткани также может представлять собой первичные или культивируемые клетки, или линии клеток. Необязательно, образец ткани получают из пораженной заболеванием ткани/органа. Например, "образец опухоли" представляет собой образец ткани, полученный из опухоли или другой раковой ткани. Образец ткани может содержать смешанную популяцию клеточных типов (например, опухолевые клетки и не опухолевые клетки, злокачественные клетки и незлокачественные клетки). Образец ткани может содержать соединения, которые естественным образом не смешиваются с тканью в природе, такие как консерванты, антикоагулянты, буферы, фиксаторы, питательные вещества, антибиотики или тому подобное.

Используемый в настоящем документе термин "прогнозирование", или "предсказание", означает определение вероятности того, что пациент будет отвечать либо благоприятным, либо неблагоприятным образом на лекарственное средство (терапевтическое средство), или набор лекарственных средств, или терапевтический режим. В одном варианте осуществления прогнозирование означает определение степени таких ответов. В одном варианте осуществления прогнозирование означает определение возможности и/или вероятности того, что пациент выживет или его состояние улучшится после лечения, например, лечения конкретным терапевтическим средством, или в течение определенного периода времени без рецидива заболевания. Способы прогнозирования по изобретению можно использовать в клинических условиях для принятия решений о лечении путем выбора наиболее подходящих вариантов лечения для любого конкретного пациента. Способы прогнозирования по настоящему изобретению являются ценными инструментами для предсказания вероятности того, что пациент будет отвечать благоприятным образом на режим лечения, например, конкретный режим лечения, включая, например, введение конкретного терапевтического средства или сочетания, хирургическое вмешательство, лечение стероидами и так далее, или вероятности долгосрочного выживания пациента после применения режима лечения.

Термин "клинические параметры" охватывает все не являющиеся образцами или не являющиеся NaPi2b показатели состояния здоровья субъекта или другие характеристики, такие как, без ограничения, возраст (Возраст), этническая принадлежность (РАСА), половая принадлежность (Пол) или семейный анамнез (FamHX).

Термин "ЛО" означает ложноотрицательный результат, который в случае болезненного состояния означает неправильную классификацию больного субъекта как не больного, не отвечающего на лечение или здорового.

Термин "ЛП" означает ложноположительный результат, который в случае болезненного состояния означает неправильную классификацию здорового субъекта как имеющего заболевание или отвечающего на лечение. "Формула", "алгоритм" или "модель" представляет собой любое математическое уравнение, алгоритм, аналитический или программируемый процесс, или статистический метод, в котором используют один или более непрерывных или категориальных входных показателей (в настоящем доку-

менте называемых "параметры") и рассчитывают итоговое значение, иногда называемое "индексом" или "индексным показателем". Неограничивающие примеры "формул" включают операторы суммы, отношения и регрессии, такие как коэффициенты или экспоненты, преобразования и нормирования значений биомаркеров (включая, без ограничения, схемы нормирования на основе клинических параметров, таких как пол, возраст или этническая принадлежность). Полученные прогностические модели могут быть валидированы в других исследованиях, или перекрестно валидированы в исследовании, в котором они исходно были разработаны, с использованием таких методов как Bootstrap, Leave-One-Out (LOO) и 10-кратная кросс-валидация (10-кратная CV). На различных этапах уровень ложноположительных результатов может быть оценен путем расчета пермутаций методами, известными в данной области.

"Функция экономической полезности для здоровья" представляет собой формулу, выведенную из сочетания ожидаемой вероятности диапазона клинических результатов в идеализированной подходящей популяции пациентов, как до, так и после, проведения диагностического или терапевтического вмешательства в стандарт оказания медицинской помощи. Она включает оценку точности, эффективности и технико-экономических характеристик такого вмешательства, а также определение стоимости и/или ценности (полезности), связанной с каждым результатом, которая может быть получена, исходя из фактических затрат системы здравоохранения на оказание помощи (услуги, принадлежности, устройства, лекарственные средства и так далее), и/или в виде оценочного приемлемого значения на год жизни с учетом ее качества (QALY), приводящего к каждому результату. Сумма, по всем прогнозируемым результатам, показателя прогнозируемого размера популяции для результата, умноженного на соответствующую ожидаемую полезность для результата, представляет собой общую экономическую полезность для здоровья данного стандарта оказания медицинской помощи. Разница между (i) общей экономической полезностью для здоровья, рассчитанной для стандарта оказания медицинской помощи с вмешательством, и (ii) общей экономической полезностью для здоровья стандарта оказания медицинской помощи без вмешательства позволяет определять общую меру экономической стоимости или ценности вмешательства для здоровья. Сам этот показатель можно делить на численность всей анализируемой группы пациентов (или исключительно группы с применением вмешательства) для расчета стоимости на единицу вмешательства и в качестве руководства при принятии таких решений, как позиционирование на рынке, ценообразование и допущения о приемлемости для системы здравоохранения. Такие функции экономической полезности для здоровья обычно используют для сравнения экономической эффективности вмешательства, но они также могут быть преобразованы для оценки приемлемой цены в расчете на QALY, которую готова платить система здравоохранения, или приемлемых экономически эффективных характеристик клинической результативности, необходимых для нового вмешательства.

Для диагностических (или прогностических) вмешательств по изобретению, поскольку каждый результат (который в диагностическом тесте, позволяющем классифицировать заболевание, может быть ИП, ЛП, ИО или ЛО) имеет разную стоимость, функция экономической полезности для здоровья может предпочтительно говорить в пользу чувствительности, а не специфичности, или ПЦПР, а не ПЦОР, исходя из клинической ситуации, а также стоимости и ценности отдельных результатов, и, таким образом, предоставлять другую меру экономической эффективности и ценности для здоровья, которая может отличаться от более прямой клинической или аналитической оценки эффективности. Эти различные методы измерения и относительные компромиссы обычно сходятся только в случае идеального теста с нулевым коэффициентом ошибок (то есть, с нулевым показателем неправильной классификации прогнозируемых результатов для субъектов, или ЛП и ЛО), которому будет отдано предпочтение перед несовершенством при всех оценках эффективности, но в разной степени.

"Измерение" или "количественное определение", или, альтернативно, "обнаружение" или "детекция", означает оценку присутствия, отсутствия, величины или количества (которое может представлять собой эффективное количество) либо конкретного вещества в клиническом или полученном от субъекта образце, включая получение качественных или количественных уровней концентрации таких веществ, либо иных оцениваемых показателей, или категоризацию отличных от анализируемых веществ клинических параметров субъекта.

"Прогностическую ценность отрицательного результата", или "ПЦОР", рассчитывают, как ИО/(ИО+ЛО), или фракцию истинно отрицательных результатов из всех отрицательных результатов теста. На нее, по определению, оказывает влияние распространенность заболевания и вероятность до тестирования среди популяции, предназначенной для тестирования. Смотри, например, публикацию O'Meara A S, Jacobson R M, "Estimating The Predictive Value Of A Diagnostic Test, How To Prevent Misleading Or Confusing Results", Clin. Ped. 1993, 32(8): 485-491, в которой обсуждается специфичность, чувствительность, а также прогностическая ценность положительных и отрицательных результатов теста, например, клинического диагностического теста. Часто при бинарных подходах к классификации болезненного состояния с использованием непрерывного диагностического тестового измерения показатели чувствительности и специфичности суммируют при помощи графиков зависимости чувствительности от частоты ложно положительных заключений (ROC) в соответствии с публикацией Pepe et al., "Limitations of the Odds Ratio in Gauging the Performance of a Diagnostic, Prognostic, or Screening Marker", Am. J. Epidemiol 2004, 159 (9): 882-890, и суммируют на основании площади под кривой (AUC) или C-индекса,

показателя, который позволяет отображать чувствительность и специфичность теста, анализа или способа во всем диапазоне порогов отсечения теста (или анализа) только одним значением. См. также, например, Shultz, "Clinical Interpretation Of Laboratory Procedures", глава 14 в: Teitz, Fundamentals of Clinical Chemistry, Burtis and Ashwood (eds.), 4. sup. th edition 1996, W.B. Saunders Company, pages 192-199; и Zweig et al., "ROC Curve Analysis: An Example Showing The Relationships Among Serum Lipid And Apolipoprotein Concentrations In Identifying Subjects With Coronary Artery Disease", Clin. Chem., 1992, 38(8): 1425-1428. Альтернативный подход с использованием функции правдоподобия, отношения шансов, теории информации, прогностической ценности, калибровки (включая соответствие) и измерений реклассификации, описан в публикации Cook, "Use and Misuse of the Receiver Operating Characteristic Curve in Risk Prediction", Circulation 2007, 115: 928-935. И наконец, отношения рисков, а также абсолютные и относительные отношения рисков в группах субъектов, определяемые в тесте, являются дополнительными показателями клинической точности и полезности. Различные способы часто используют для определения аномальных или связанных с болезнью значений, включая пределы эталонного диапазона значений, пределы дискриминации и пороги риска.

"Аналитическая точность" означает воспроизводимость и предсказуемость самого процесса измерения, и может быть обобщена в таких измерениях в виде коэффициентов вариации, за счет тестов согласования и калибровки одних и тех же образцов или контролей в разное время, разными пользователями, с разным оборудованием и/или реагентами. Эти и другие соображения при оценке разных биомаркеров также описаны в публикации Vasan, 2006.

Термин "эффективность" означает общую полезность и качество диагностического или прогностического теста, включая, в числе прочего, клиническую и аналитическую точность, другие аналитические характеристики и характеристики процесса, такие как эксплуатационные характеристики (например, стабильность, легкость в использовании), экономическую ценность для здоровья и относительную стоимость компонентов теста. Любые из этих факторов могут служить источником превосходной эффективности и, следовательно, полезности теста, и могут быть измерены с помощью соответствующих "показателей эффективности", таких как AUC, время до результата, срок годности и так далее, в зависимости от обстоятельств.

"Прогностическую ценность положительного результата", или "ПЦПР", рассчитывают, как ИП/(ИП+ЛП), или фракцию истинно положительных результатов из всех положительных результатов теста. На нее, по определению, оказывает влияние распространенность заболевания и вероятность до тестирования среди популяции, предназначенной для тестирования.

"Чувствительность" рассчитывают, как ИП/(ИП+ЛО), или фракцию истинно положительных результатов у субъектов.

"Специфичность" рассчитывают, как ИО/(ИО+ЛП), или фракцию истинно отрицательных результатов у нормальных субъектов.

"Статистическая значимость" означает, что изменение больше, чем можно было бы ожидать только в результате случайности (что могло бы быть "ложноположительным результатом"). Статистическую значимость можно определять любым методом, известным в данной области. Обычно используемые показатели статистической значимости включают р-значение, которое представляет вероятность получения результата, по меньшей мере такого же экстремального, как данная точка данных, при условии, что точка данных была результатом лишь случайности. Результат считают в высокой степени значимым при р-значении, составляющем 0,05 или менее. Предпочтительно, р-значение составляет 0,04, 0,03, 0,02, 0,01, 0,005, 0,001 или менее.

"Традиционные лабораторные факторы риска" соответствуют биомаркерам, выделенным, или полученным из образцов от субъекта, и которые в настоящее время оценивают в клинической лаборатории и используют в традиционных глобальных алгоритмах оценки риска. Традиционные лабораторные факторы риска для рецидива опухоли включают, например, пролиферативный индекс, опухолевый инфильтрирующий лимфоциты. Другие традиционные лабораторные факторы риска для рецидива опухоли известны специалистам в данной области.

Все способы, описанные в настоящем документе, можно применять в любом подходящем порядке, если не указано иначе в настоящем документе или явно не противоречит контексту. В настоящем документе использование любого, и всех примеров или иллюстративных оборотов речи (например, "такие как") предназначено лишь для лучшей иллюстрации изобретения, и не должно восприниматься, как ограничение объема формулы изобретения, если специально не указано иначе. Никакие фразы в спецификации не должны восприниматься, как указывающие на то, что какой-либо незаявленный элемент является необходимым для заявленного объема изобретения.

Примеры.

Пример 1. Клонирование, продуцирование и очистка MERS67.

MERS67 представляет собой человеческое-кроличье химерное антитело, которое сконструировано на основе гуманизированного анти-NaPi2b антитела XMT-1535 (также известного как RebMab200 (Lopes dos Santos, 2013)). Оно состоит из переменных последовательностей тяжелой и легкой цепей человеческого антитела, объединенных с константной областью кроличьего IgG1 или C-областью цепи каппа-b4

кроличьего Ig, соответственно. Целевые последовательности ДНК были сконструированы с оптимизацией кодонов из аминокислотных последовательностей гуманизированных переменных областей тяжелой и легкой цепей, а также константных областей кроличьего антитела. Синтез гена, конструирование экспрессионного вектора, получение плазмид и временную экспрессию проводили с использованием GenScript®. Последовательности ДНК для химерной тяжелой и легкой цепи приведены на фиг. 1. Для продуцирования клетки ExpiCHO-S выращивали в бессывороточной среде ExpiCHO™ для экспрессии (Thermo Fisher Scientific). Клетки поддерживали в колбах Эрленмейера (Corning Inc., Acton, MA) при 37°C в атмосфере с 8% CO₂ на орбитальном шейкере (VWR Scientific). За один день до трансфекции клетки высевали при соответствующей плотности в колбы Эрленмейера (Corning). В день трансфекции ДНК и реагент для трансфекции смешивали в оптимальном соотношении, а затем добавляли в колбу с клетками, готовыми для трансфекции. Рекомбинантные плазмиды, кодирующие тяжелую и легкую цепи Mers67, временно совместно трансфицировали в суспензионные клетки ExpiCHO-S. Клетки переносили в инкубатор с температурой 32°C и атмосферой с 5% CO₂ в день 1 после трансфекции для культивирования. Реагент-усилитель и подпитку (Thermo Fisher Scientific) добавляли в день 1, и подпитку добавляли в день 5 после трансфекции. Супернатант клеточной культуры, собранный в день 14, использовали для очистки.

Бульон от клеточной культуры центрифугировали, с последующим фильтрованием. Фильтрованный супернатант наносили на колонку с белком А (GenScript, каталожный № L00433) в концентрации 3 мл/мин. После промывания и элюирования соответствующим буфером, буфер в элюированных фракциях заменяли на PBS. Целевой белок дополнительно очищали на колонке HiLoad Superdex 200 16/600 пг (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) для удаления высокомолекулярных агрегатов. Очищенный белок анализировали методами SDS-ПААГ, вестерн-блоттинга и ЭХ-ВЭЖХ с использованием стандартных протоколов для определения молекулярной массы, выхода и чистоты, как показано на фиг. 2 и фиг. 3А (после одноэтапной очистки, лот U0859BH) и фиг. 3В (после двухэтапной очистки, лот U5696BL). 5 мкг образца наносили на SDS-ПААГ, и 0,3 мкг суммарного белка наносили на вестерн-блот. Первичное антитело для вестерн-блоттинга представляло собой антитело козы против кроличьего IgG-HRP (GenScript, каталожный № A00131).

Пример 2. Связывание MERS67 с человеческим пептидом NaPi2b.

Связывание MERS67 оценивали в сравнении со связыванием исходного антитела XMT-1535.

Получали и лиофилизировали человеческий циклизированный пептид NaPi2b, содержащий аминокислоты, идентифицированные в эпитопе XMT-1535 (New England Peptide, Gardner, MA). Для ELISA лиофилизированный пептид NaPi2b восстанавливали в ДМСО. Человеческий пептид NaPi2b использовали для покрытия 96-луночных прозрачных планшетов для ELISA с высокой степенью связывания (Corning, 3369) в концентрации 1 мкг/мл в буферном растворе карбоната натрия, pH 9, с общим объемом 100 мкл на лунку. После 2-часовой инкубации планшеты промывали 4 раза по 100 мкл на лунку TBS-Tween 20, блокировали 3% БСА в TBS-Tween 20 (100 мкл на лунку) в течение 1 часа и вновь промывали. Тестируемые препараты MERS67 (лот U0859BH и лот U5696BL), XMT-1535 и не связывающийся контроль (трастузумаб) добавляли в лунки в диапазоне концентраций дозы от 100 до 0,002 нМ, 8 точек при 3-кратном серийном разведении в буфере TBS-Tween 20, в объеме 100 мкл на лунку. Планшеты инкубировали в течение 1 часа с качанием, затем промывали, как описано выше. Вторичное, конъюгированное с пероксидазой антитело козы, специфическое для фрагмента F(ab')₂ человеческого IgG AffiniPure (Jackson ImmunoResearch, 109-035-097) использовали в разведении 5000х в буфере TBS-Tween 20, добавляя по 100 мкл в лунку, в случае XMT-1535; трастузумаб и вторичное конъюгированное с HRP антитело козы против иммуноглобулинов кролика (Abcam, ab6721) использовали в случае MERS67. Планшеты вновь инкубировали в течение 1 часа с качанием, затем промывали, как описано выше. Субстрат TMB (Bethyl Lab, E102) добавляли в объеме 50 мкл на лунку, и инкубировали до развития окраски, затем реакцию гасили равным количеством 0,2 Н H₂SO₄. Оптическую плотность (O.D.) измеряли при 450 нм на планшетном ридере SpectraMax M5 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). Значения O.D. для каждого варианта использовали для построения графика, и K_d рассчитывали для каждого антитела при помощи программы GraphPad Prism (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA) методом нелинейной регрессии с использованием модели специфического связывания в одном сайте.

MERS67 из двух изученных лотов (лот U0859BH и лот U5696BL) связывало человеческий NaPi2b с K_d 0,2561 нМ и 0,1045 нМ, соответственно; XMT-1535 связывало человеческий NaPi2b с K_d 0,536 нМ. В случае отрицательного контрольного антитела связывание отсутствовало.

Пример 3. MERS67 способно обнаруживать NaPi2b в иммуногистохимическом формате FFPE.

Уровни клеточной поверхностной экспрессии NaPi2b определяли методом проточной цитометрии. 1×10⁶ клеток OVCAR3 или JIMT-1 в объеме 100 мкл инкубировали в течение одного часа на льду с конъюгированным с фикоэритрином RebMAB200 в концентрации 5 мкг/мл. Используя набор Quantibrite PE fluorescence calibration kit (BD BioSciences) и прибор MACS Quant Instrument (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany), рассчитывали число клеточных поверхностных рецепторов на основании стандартной кривой, которое составляло 1,95×10⁵ и 120 для OVCAR3 и JIMT-1, соответственно.

Фиксированные в формалине и залитые парафином блоки осадка клеток и ксенотрансплантата готовили из клеток линий OVCAR3 и JMT-1 стандартными методами.

Для ручного иммуногистохимического анализа использовали набор DAKO Envision+System-HRP (DAB) (K4010, Agilent, Santa Clara, CA) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, получали срезы толщиной 5 мкм, запекали при 56°C в течение 15 минут и регидратировали с использованием ксилола и набора спиртов повышающейся концентрации. Перед блокированием пероксидазы в препаратах проводили извлечение антигена раствором с pH 6,0 (Vector Laboratories, Burlingame, CA) при 99°C. Для этапа инкубации с первичным антителом MERS67 сначала титровали в диапазоне разведений в разбавителе DAKO со снижающимися уровнем фона компонентами (S3022, Agilent, Santa Clara, CA). В некоторые эксперименты был включен контроль "без первичного антитела" для оценки способа в отношении фонового неспецифического связывания. Препараты докрасивали гематоксилином Майера, дегидратировали и подготавливали для изучения под световым микроскопом. Различные разведения сравнивали для серии ксенотрансплантатов с известным ответом на NaPi2b-таргетированный конъюгат полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытый в WO 2017/160754, *in vivo*, и было выбрано разведение, приводящее к ИГХ окрашиванию, которое при визуальном изучении под световым микроскопом наилучшим образом позволяло различать отвечающие и не отвечающие на лечение в серии доклинических моделей ксенотрансплантатов. Результаты контрольного окрашивания ксенотрансплантатов OVCAR3 и JMT1 представлены на фиг. 4. Иммуногистохимический анализ также проводили с использованием автоматизированной платформы TechMate 500 или TechMate 1000 (BioTek Solutions/Ventana medical Systems), в котором тестировали различные условия извлечения антигена и разведения первичного антитела для разработки протокола с более высокой пропускной способностью. Протокол был выбран на основании окрашивания контрольного материала и окрашивания доклинического материала с известным ответом на воздействие ADC. Вкратце, для разработанного протокола получали срезы толщиной 4 мкм, проводили их депарафинизацию и регидратацию с использованием ксилола и набора спиртов повышающейся концентрации. Для препаратов проводили извлечение антигена в стандартном аппарате для обработки паром, используя раствор BioGenex AR-10. На платформе TechMate проводили дополнительное извлечение при помощи протеазы K (DAKO). После блокирования сывороткой добавляли первичное антитело на 30 минут при комнатной температуре, затем проводили блокирование эндогенной пероксидазы, добавляли полимерную систему обнаружения без биотина (кроличья система обнаружения Polink-2 Plus, GBI) и в завершение кратковременно докрасивали гематоксилином.

Пример 4. MERS67 использовали для обнаружения иммунореактивного материала в человеческих опухолях и в моделях человеческих первичных ксенотрансплантатов.

Используя ручной метод, разработанный для ИГХ, микропанель опухолевых тканей человеческого легкого, состоящую из 37 опухолей, окрашивали MERS67. 21/37 (57%) тканей имели поддающуюся обнаружению иммунореактивность мембран. Результаты иммуногистохимического окрашивания двух человеческих аденокарцином легкого представлены на фиг. 5.

Также оценивали дополнительную микропанель тканей с опухолями разных типов, иммунореактивность была отмечена в случае карциномы яичника и отдельные очаги были обнаружены в случае холангиокарциномы. Иммунореактивность также можно было обнаружить в модели человеческого первичного ксенотрансплантата карциномы протоков слюнных желез.

Пример 5. Влияние ведения NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство на рост опухоли.

Модели ксенотрансплантатов первичной карциномы яичника использовали из набора опухолевых моделей, полученных из серозного рака яичника или рака фаллопиевых труб, и имплантировали мышам с иммунной недостаточностью в группах (n=3), которые получали 3 мг/кг NaPi2b-таргетированного конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство, раскрытого в WO 2017/160754, еженедельно в течение трех недель после достижения опухолями стратифицированного среднего объема 125-250 мм³. Не получавших лечение животных в группах (n=2-4) включали в исследование в качестве контроля. Запланированной конечной точкой исследования был объем опухоли 1 см³ или срок 45 дней. В случае полного ответа мышам наблюдали в течение более длительного времени для оценки повторного роста опухоли. На фиг. 6 представлена гистограмма, показывающая средний лучший ответ, рассчитанный относительно дня 0 в каждой временной точке для каждого животного, а затем выраженный в виде среднего значения лучшего ответа для каждой модели. На оси y показан средний лучший ответ; на оси x показан номер модели. Модели были получены как от пациентов, которые ранее получали лечение, так и от пациентов, ранее не получавших лечение. Противоопухолевый эффект NaPi2b-таргетированной конъюгата полимер-антитело-лекарственное средство наблюдали для опухолей обоих видов. Столбики окрашены следующим образом: опухоли, не подвергавшиеся ранее лечению (темные столбики), или опухоли после лечения (светлые столбики). Из 10 моделей, продемонстрировавших средний лучший ответ от -50 до -100, 5 были получены из не подвергавшихся ранее лечению опухолей и 5 были получены из подвергавшихся ранее лечению опухолей.

Модель ST206 с наблюдаемым устойчивым противоопухолевым эффектом продолжали изучать в течение более длительного периода времени. Ткани, собранные в конце исследования (день 73) из опу-

холи с неполным ответом, оценивали в отношении экспрессии NaPi2b методами ИГХ, и была продемонстрирована экспрессия NaPi2b.

Препараты опухолей от не получавших лечение экспериментальных животных оценивали для определения взаимосвязи эффективности/паттерна окрашивания. Паттерн окрашивания, наблюдаемый в моделях рака яичника, сравнивали с окрашиванием, наблюдаемым в человеческих первичных опухолях. На фиг. 7 представлена гистограмма, показывающая модели рака яичника START, расположенные в порядке, основанном на показателях среднего лучшего ответа; и окрашенные в соответствии с H-баллами (все модели). Более темный цвет соответствует большему H-баллу. NaPi2b-таргетированный конъюгат полимер-антитело-лекарственное средство вызывал уменьшение по меньшей мере на 50% объема опухоли относительно исходного размера у 10/20 (50%) моделей при введении в дозе 3 мг/кг один раз в неделю в течение 3 недель. Отсутствовала существенная разница в степени регрессии между не подвергнутыми лечению и подвергнутыми лечению модельными опухолями (5/8, 5/12, соответственно). Среди ксенотрансплантатов опухолей с H-баллом ≥ 70 у 10/13 (76%) моделей было достигнуто уменьшение объема опухоли на 50% или более после лечения NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство, в сравнении с 0/7 (0%) моделей с H-баллом ≤ 70 . При использовании того же ИГХ анализа для первичных опухолей яичника человека 12/20 (60%) протестированных опухолей имели H-балл ≥ 70 . Наблюдалась связь между ИГХ H-баллом NaPi2b и изменением объема опухоли после лечения NaPi2b-таргетированным конъюгатом полимер-антитело-лекарственное средство (коэффициент ранговой корреляции Спирмена 0,76).

Используя автоматизированный ИГХ анализ, изучали серию моделей ксенотрансплантатов человеческих опухолей из 20 аденокарцином легкого, 20 карцином яичника и 20 первичных карцином яичника, и интерпретировали с использованием "H-балльного" метода. H-балл включает интенсивность окрашивания (определяемую по возрастанию интенсивности от 0 до 3+), а также процентную долю клеток с положительными результатами окрашивания мембран клеток опухолей. H-балл = (% при <1+ X0) + (% при 1+) X1 + ((% при 2+) X2) + ((%3+) X3). H-баллы находились в диапазоне 1-220, 1-250 и 0-290 для тканей легкого, яичника и ксенотрансплантатов, соответственно, как показано на диаграмме разброса данных на фиг. 8, где диаграмма построена на основании H-баллов (ось y) и типов ткани (ось x), и окрашена в зависимости от среднего лучшего ответа для ксенотрансплантатов.

Пример 6. Классификация рака легкого.

Гистопатологическая классификация рака легкого основана на морфологических признаках, но может потребоваться дополнительное иммуногистохимическое окрашивание для точного диагноза. Немелкоклеточную карциному можно подразделять на ряд подтипов, включая плоскоклеточную карциному (SCC) и аденокарциному (ACA). Применение конкретных терапевтических средств может быть показано, или противопоказано, при разных подтипах рака легкого (смотри, например, *Am J Surg Pathol.*, Volume 35, Number 1, January 2011). В настоящее время для категоризации опухолей используют панели иммуногистохимического окрашивания, например, цитокератин 5/6, TTF-1, напсин А, p40 и p63. Белок NaPi2b, обнаруживаемый MERS67, экспрессируется в нормальной ткани легкого, включая типы клеток, которые могут быть предшественниками ACA легкого (то есть, альвеолярные клетки II типа), и может служить маркером аденокарциномы. Его можно использовать в качестве отдельного окрашиваемого маркера, или использовать для усовершенствования современных иммуногистохимических панелей.

Кроме того, данные из общедоступных источников данных, показатели экспрессии РНК генов, обычно анализируемых на белковом уровне в формате ИГХ, имитируют ИГХ профили, характерные для аденокарциномы и плоскоклеточной карциномы, на популяционной основе. Рассмотрение крупномасштабных данных экспрессии на основе отдельных опухолей также предполагает, что понимание уровня экспрессии NaPi2b может способствовать более точной классификации аденокарциномы и плоскоклеточной карциномы.

На фиг. 9 представлена коробчатая диаграмма, демонстрирующая полученные методом RNAseq данные, извлеченные из TCGA, показывающие дифференциальную экспрессию NaPi2b, напсина А, CK5 и TTF1 в SCC и ACC легкого. Иммуногистохимическое обнаружение белковой экспрессии таких панелей, как напсин А, CK5 и TTF1, можно использовать для классификации плоскоклеточной карциномы легкого и аденокарциномы легкого. Определение экспрессии NaPi2b можно использовать в качестве дополнения к используемой в настоящее время панели.

На фиг. 10 представлена диаграмма разброса данных, демонстрирующая полученные методом RNAseq данные, извлеченные из TCGA. Данные для NaPi2b показаны на оси x, и данные для напсина А показаны на оси y. Экспрессия цитокератина 5 показана цветом, при этом самый темный цвет соответствует наивысшему уровню экспрессии. Большинство тканей, аннотированных как плоскоклеточная карцинома (в форме кружков), находятся внутри очерченного жирной линией овала. Большинство тканей, аннотированных как аденокарцинома (в форме квадратов), находятся в верхнем правом квадранте графика. Некоторые опухоли, классифицированные как плоскоклеточная карцинома, также расположенные в правом верхнем квадранте, находятся в круге, очерченном пунктирной линией, и экспрессируют цитокератин на низком уровне. Использование такого белкового маркера, как NaPi2b, может способствовать

уточнению классификации опухолей, таких как те, которые находятся в очерченном пунктирной линией круге.

На фиг. 11 представлены предварительные данные в TCGA на 21 мая 2018 г. для SCC и ACA легкого, извлеченные из cBioPortal (Cerami et al. *Cancer Discov* May 1 2012 (2) (5) 401-404; Gao et al., *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl) и использованные для построения графика, показывающего относительную экспрессию РНК NaPi2b в сравнении с показателями экспрессии РНК генов TTF-1, напсина А, CK5, p63, которые часто оценивают методом ИГХ, чтобы отличить SCC от ACA в клинических условиях. В верхнем ряду показаны результаты РНК для ACA, и в нижнем ряду показаны результаты для РНК SCC. Данные для NaPi2b показаны на оси x, и интересные гены показаны на оси y. Судя по всему, имеет место корреляция между экспрессией РНК NaPi2b и генов напсина А в случае ACA, в то время как для остальных генов наблюдается менее выраженная корреляция, или ее отсутствие.

На фиг. 12 представлены предварительные данные в TCGA на 21 мая 2018 г. для SCC и ACA легкого, извлеченные из cBioPortal (Cerami et al., *Cancer Discov* May 1 2012 (2) (5) 401-404; Gao et al., *Sci Signal*. 2013 Apr 2;6(269):pl) и использованные для построения графика, демонстрирующего экспрессию генов SCL34A2, TTF-1, напсина А, CK5 и p63 при ACA и SCC. В каждом графике результаты для ACA находятся слева. На оси y показаны данные экспрессии РНК, полученные методом RNAseq. Результаты показывают, что, в целом, экспрессия SLC34A2 выглядит более высокой при аденокарциноме, в сравнении с плоскоклеточной карциномой.

Хотя различия, определенные на основании экспрессии РНК, некоторым образом перекрываются с результатами для белков, которые оценивают в клинике методами ИГХ, классификация на основе РНК обычных используемых генов до настоящего времени не была валидирована. Опубликованные результаты непредвзятой попытки обнаружить гены, наиболее дифференциально экспрессируемые при раке легкого, указывают лишь на TTF1/TTF1 в списке генов для SCC в сравнении с ACA (Wilkerson et al., *Journal of Molecular Diagnostics*, 2013 15:4, 485-497), свидетельствуя о том, что профилирование РНК на основе генов, используемых для выявления отличий методами ИГХ, является не лучшим способом отличать ACA от SCC.

Пример 7. Различение ACA и SCC с использованием экспрессии белка NaPi2b.

Был разработан иммуногистохимический анализ для MERS67 на приборе Leica BondRx. Анализ проводили на панелях тканей (ТМА), включая панели линий клеток NSCLC и мелкоклеточного рака легкого (SCLC), а также панель человеческих опухолей NSCLC. Опухоли в панели NSCLC ранее были классифицированы только на основе морфологических признаков. Для всех панелей определяли балльные показатели с использованием метода определения H-баллов.

Для дополнительной характеристики первичных опухолей ТМА окрашивали на TTF-1 и p40, маркеры ACA и плоскоклеточной карциномы (SCC), соответственно. Результаты этого окрашивания сравнивали с паттернами окрашивания MERS67. H-баллы для ТМА линии клеток NSCLC находились в диапазоне 0-260, и в диапазоне 0-100 для ТМА мелкоклеточной карциномы легкого (SCLC). В микропанели тканей оценке подлежали 99 отдельных образцов. В соответствии с морфологической классификацией 63 образца представляли собой SCC, и 23 образца представляли собой ACA. С использованием произвольного порога отсечения H=50 была обнаружена статистически значимая разница в количестве NaPi2b-положительных образцов ACA (19/23) в сравнении с SCC (3/63). На фиг. 13 представлена коробчатая диаграмма H-баллов, полученная при сравнении ИГХ окрашивания MERS67 в случае SCC и ACA, когда эти опухоли были классифицированы лишь на основании морфологии.

На фиг. 14 представлены результаты окрашивания NaPi2b на основании гистологии для группы NSCLC только в тех образцах, для которых классификация как ACA и SCC по гистологическим признакам и ИГХ результаты для TTF-1/p40 совпадали. H-балл для NaPi2b, определенный методами ИГХ, показан на оси Y, и гистологический подтип показан на оси X. Из 43 образцов, в которых p40 и TTF-1 могли быть оценены, и результаты совпадали с морфологическим диагнозом, 7/7 образцов ACA были положительны по NaPi2b, при этом 0/36 SCC были положительными.

Другие варианты осуществления

При том, что изобретение подробно описано в спецификации, указанная спецификация предназначена для иллюстрации, но не для ограничения объема изобретения, который определен объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации входят в объем прилагаемой формулы изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ прогнозирования ответной реакции пациента с NaPi2b-экспрессирующим раком на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство, включающий:

а) измерение уровня экспрессии NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, путем создания контакта образца опухоли с химерным анти-NaPi2b антителом, содержащим константную область кроличьего антитела и переменную область человеческого антитела,

где переменная область человеческого антитела содержит определяющую комплементарность об-

ласть 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 7), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8), и где константная область кроличьего антитела содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12; и

b) прогнозирование, что пациент будет отвечать на лечение, если обнаружено присутствие NaPi2b в образце опухоли таким образом, что уровень экспрессии NaPi2b в образце опухоли выше заданного количественного или полуколичественного балльного показателя порога отсека, определенного методом определения H-балла, методом световой микроскопии или путем анализа изображения.

2. Способ лечения NaPi2b-экспрессирующего рака у субъекта NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство, включающий:

a) определение того, присутствует ли NaPi2b в образце опухоли, полученном от пациента, путем создания контакта образца опухоли с химерным анти-NaPi2b антителом, содержащим константную область кроличьего антитела и варибельную область человеческого антитела,

где варибельная область человеческого антитела содержит определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 7), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8), и где константная область кроличьего антитела содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12;

b) прогнозирование, что пациент будет отвечать на лечение NaPi2b-таргетированным конъюгатом антитело-лекарственное средство, если уровень экспрессии NaPi2b в образце опухоли выше заданного количественного или полуколичественного балльного показателя порога отсека; и

c) введение NaPi2b-таргетированного конъюгата антитело-лекарственное средство субъекту, который, по прогнозу, будет отвечать на лечение;

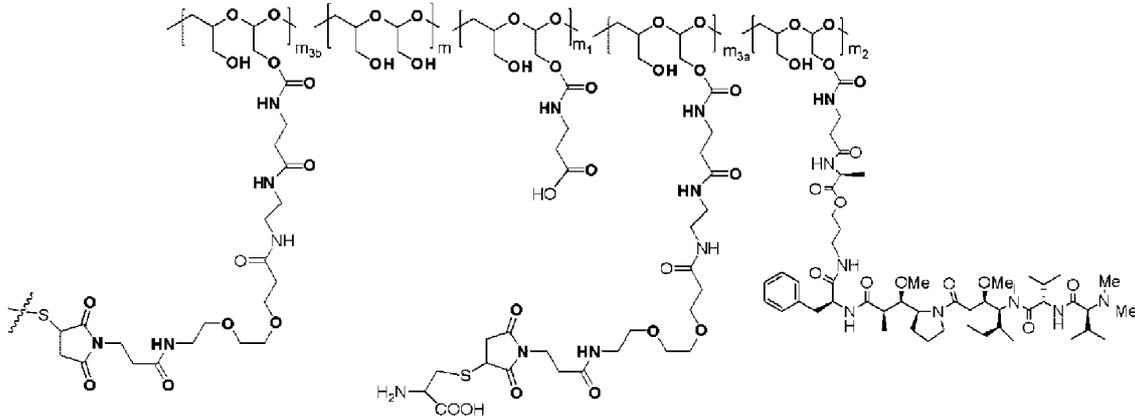
где NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство содержит NaPi2b-таргетированное антитело XMT-1535, содержащее определяющую комплементарность область 1 варибельной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 варибельной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 варибельной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), определяющую комплементарность область 1 варибельной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), определяющую комплементарность область 2 варибельной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 7), определяющую комплементарность область 3 варибельной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8).

3. Способ по п.1 или 2, при этом заданный количественный или полуколичественный балльный показатель порога отсека определяют методом определения H-балла, световой микроскопией или путем анализа изображения.

4. Способ по п.1 или 2, при этом NaPi2b-экспрессирующий рак представляет собой рак легкого, рак яичника, рак молочной железы, колоректальный рак, рак почки, рак щитовидной железы, почечнопочечный рак, аденокарциному протоков слюнных желез, рак эндометрия, холангиокарциному, папиллярный рак щитовидной железы или папиллярный почечнопочечный рак.

5. Способ по п.4, при этом рак легкого представляет собой немелкоклеточную карциному легкого (NSCLC).

6. Способ по п.5, при этом NSCLC представляет собой аденокарциному.
 7. Способ по п.4, при этом рак яичника представляет собой эпителиальный рак яичника.
 8. Способ по п.4, при этом рак яичника является рефрактерным к соединениям платины раком яичника.
 9. Способ по п.4, где рак яичника является чувствительным к соединениям платины раком яичника.
 10. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом NaPi2b-таргетированный конъюгат антитело-лекарственное средство представляет собой:



где: m представляет собой целое число от 1 до примерно 300,
 m_1 представляет собой целое число от 1 до примерно 140,
 m_2 представляет собой целое число от 1 до примерно 40,
 m_{3a} представляет собой целое число от 0 до примерно 17,
 m_{3b} представляет собой целое число от 1 до примерно 8;
 сумма m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 1 до примерно 18; и
 сумма m , m_1 , m_2 , m_{3a} и m_{3b} находится в диапазоне от 15 до примерно 300;

концевой фрагмент $\begin{matrix} -\xi- \\ \xi \end{matrix}$ означает присоединение одного или более полимерных каркасов к NaPi2b-таргетированному антителу XMT-1535.

11. Способ субтипирования немелкоклеточной карциномы легкого как аденокарциномы, включающий: определение того, присутствует ли NaPi2b в образце немелкоклеточной карциномы легкого, путем создания контакта образца с химерным анти-NaPi2b антителом, содержащим константную область кроличьего антитела и переменную область человеческого антитела,

где переменная область человеческого антитела содержит определяющую комплементарность область 1 переменной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 переменной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 переменной области тяжелой цепи (CDRH3), содержащую аминокислотную последовательность GETARATFAY (SEQ ID NO: 5), определяющую комплементарность область 1 переменной области легкой цепи (CDRL1), содержащую аминокислотную последовательность SASQDIGNFLN (SEQ ID NO: 6), определяющую комплементарность область 2 переменной области легкой цепи (CDRL2), содержащую аминокислотную последовательность YTSSLYS (SEQ ID NO: 7), определяющую комплементарность область 3 переменной области легкой цепи (CDRL3), содержащую аминокислотную последовательность QQYSKLPLT (SEQ ID NO: 8), и где константная область кроличьего антитела содержит константную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, и константную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12,

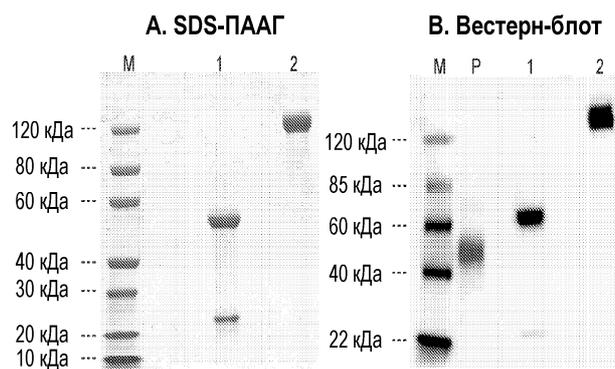
и обнаружения связывания между NaPi2b и антителом; и субтипирование немелкоклеточной карциномы легкого как аденокарциномы, если обнаружено присутствие NaPi2b в образце.

12. Способ по п.11, дополнительно включающий обнаружение одного или более из TTF-1, напсина A, p63, p40 или CK5/6 в образце немелкоклеточной карциномы легкого.

13. Способ по любому из предшествующих пунктов, при этом антитело обнаруживают при помощи меченого вторичного антитела, где метка содержит флуоресцентную метку.

14. Химерное анти-NaPi2b антитело, содержащее константную область кроличьего антитела и переменную область человеческого антитела,

где переменная область человеческого антитела содержит определяющую комплементарность область 1 переменной области тяжелой цепи (CDRH1), содержащую аминокислотную последовательность GYTFTGYNIH (SEQ ID NO: 3), определяющую комплементарность область 2 переменной области тяжелой цепи (CDRH2), содержащую аминокислотную последовательность AIYPGNGDTSYKQKFRG (SEQ ID NO: 4), определяющую комплементарность область 3 переменной области тяжелой цепи



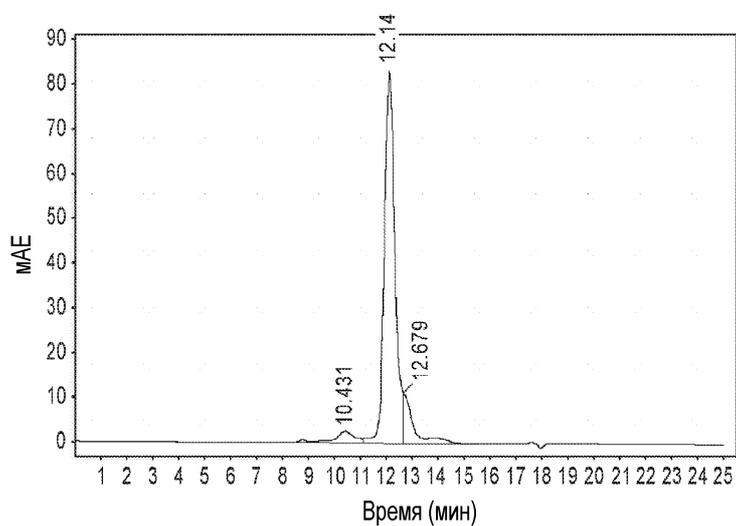
Дорожка М: Белковые маркеры

Дорожка 1: Восстанавливающие условия

Дорожка 2: Не восстанавливающие условия

Дорожка Р: IgG из кроличьей сыворотки (Sigma, каталожный № 15006)
в качестве положительного контроля

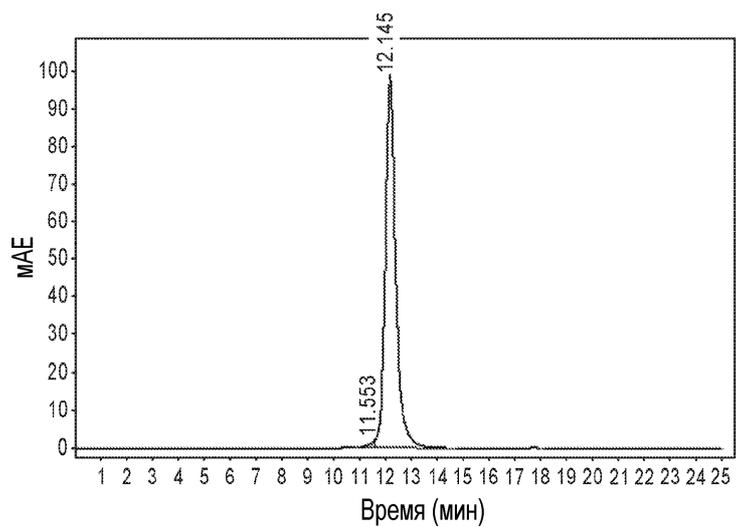
Фиг. 2



Сигнал: VWD1 A, Длина волны=280 нм

RT (мин)	Высота	Ширина (мин)	Площадь	Площадь%
10.431	2.5755	0.8921	137.8544	4.9464
12.140	82.9476	0.4726	2352.0483	84.3939
12.679	11.0842	0.4467	297.0854	10.6597
		Сумма	2786.9881	

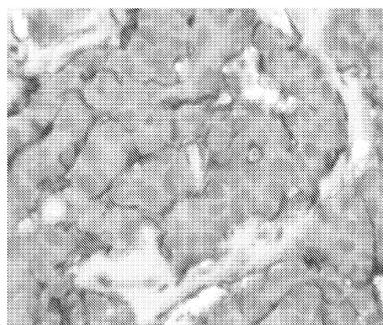
Фиг. 3А



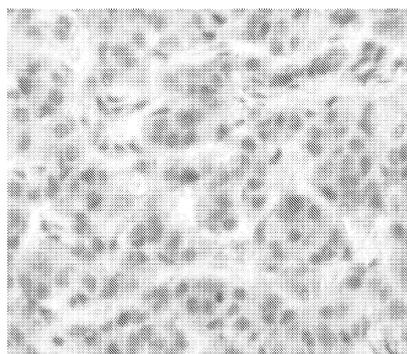
Сигнал: VWD1 A, Длина волны=280 нм

RT (мин)	Высота	Ширина (мин)	Площадь	Площадь%
11.553	1.8725	0.2489	27.9661	0.9941
12.145	98.6371	0.4706	2785.2646	99.0059
		Сумма	2813.2308	

Фиг. 3В

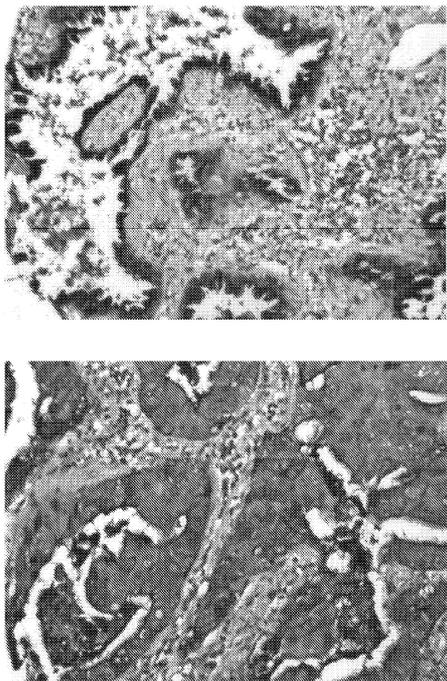


OVCAR3

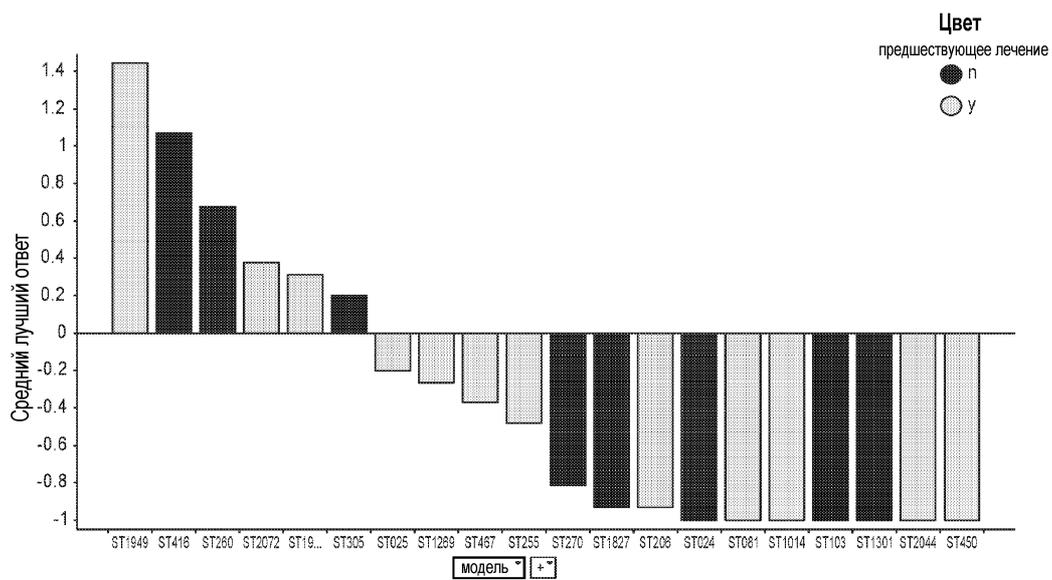


JMT-1

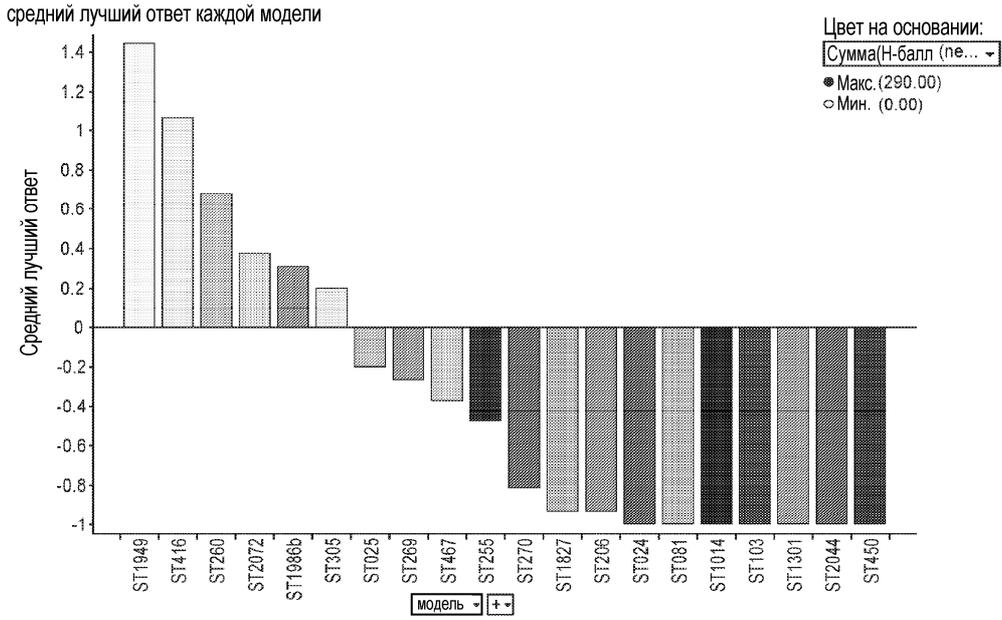
Фиг. 4



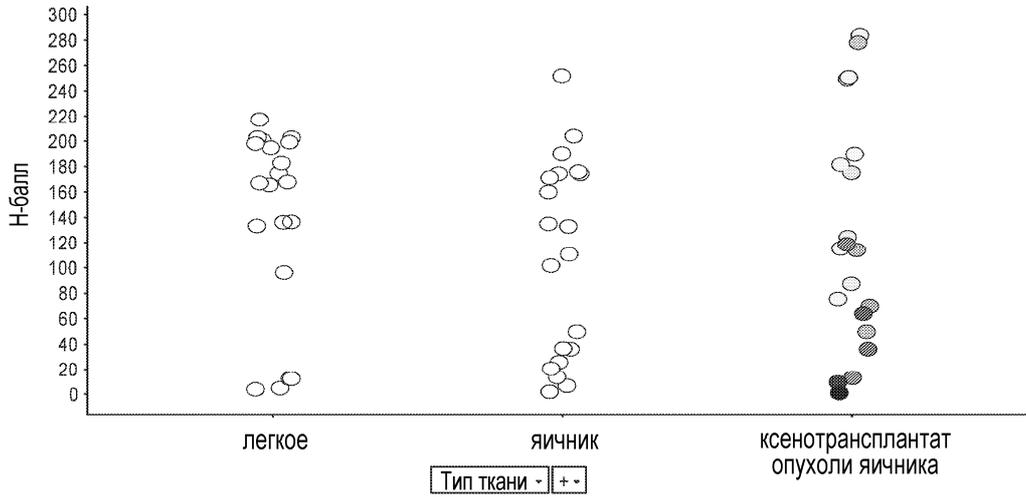
Фиг. 5



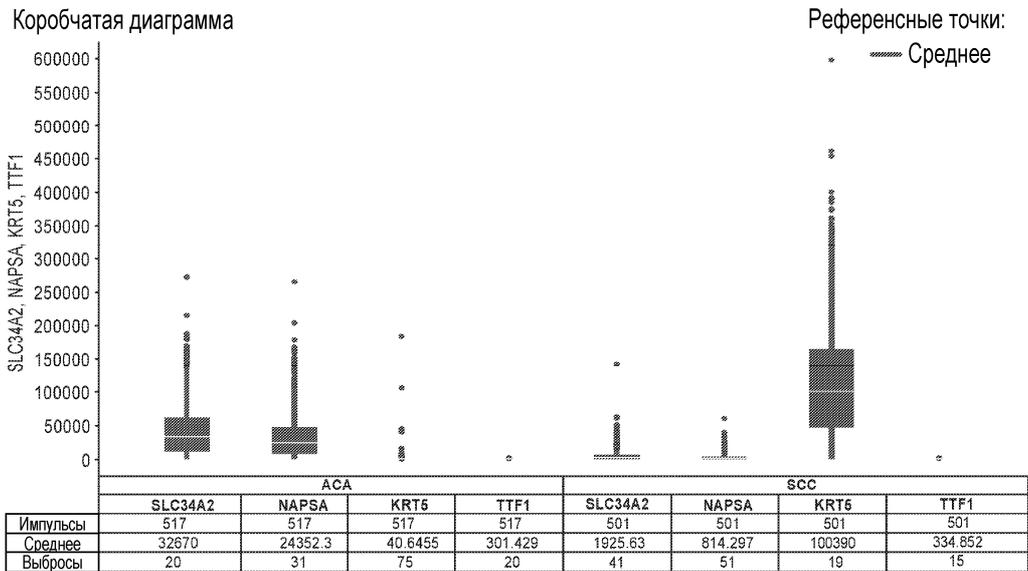
Фиг. 6



Фиг. 7



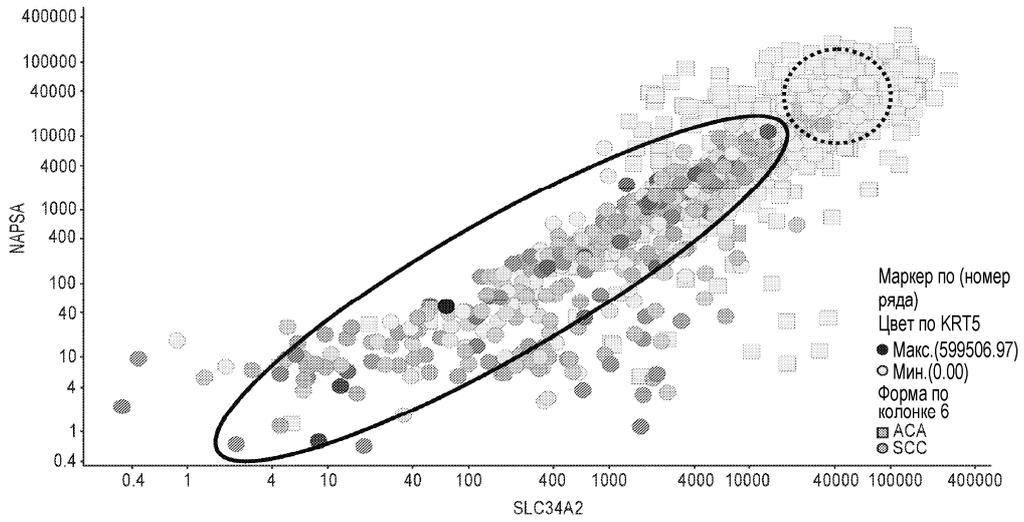
Фиг. 8



Колонка 6

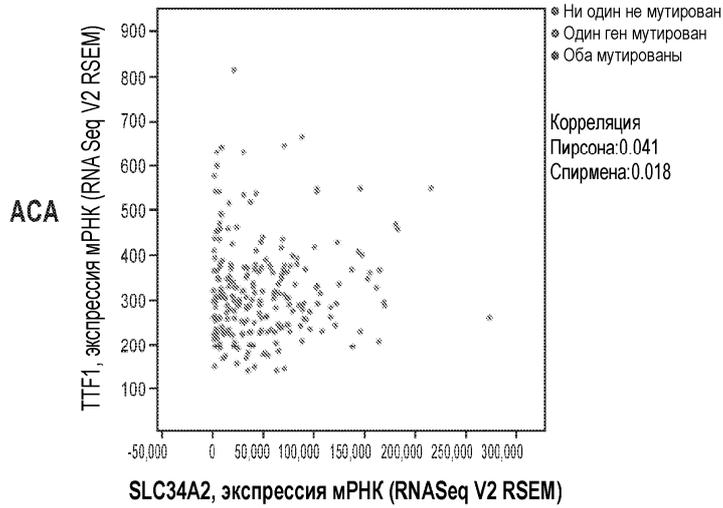
Фиг. 9

NAPSA против SLC34A2

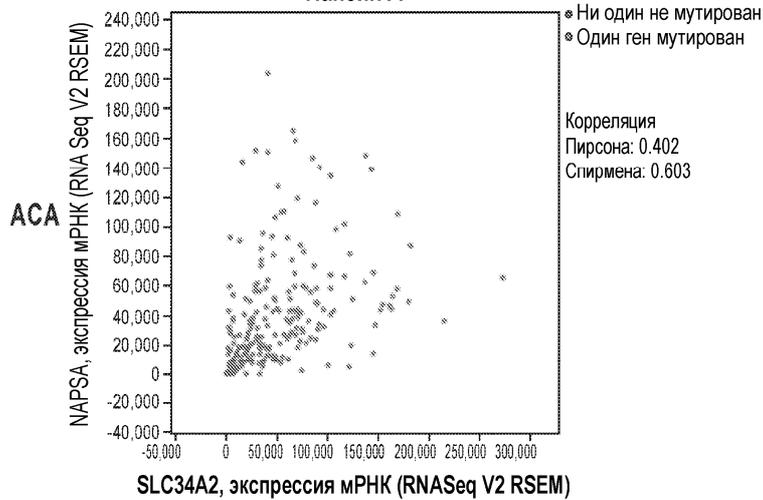


Фиг. 10

TTF-1

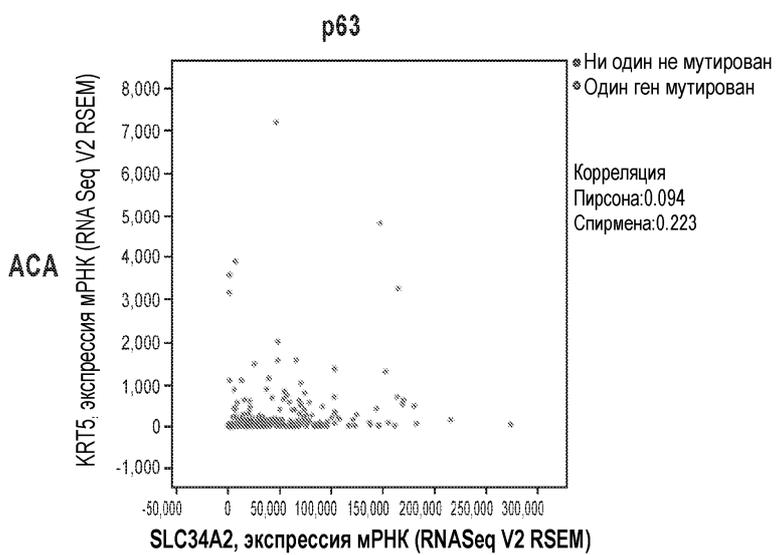
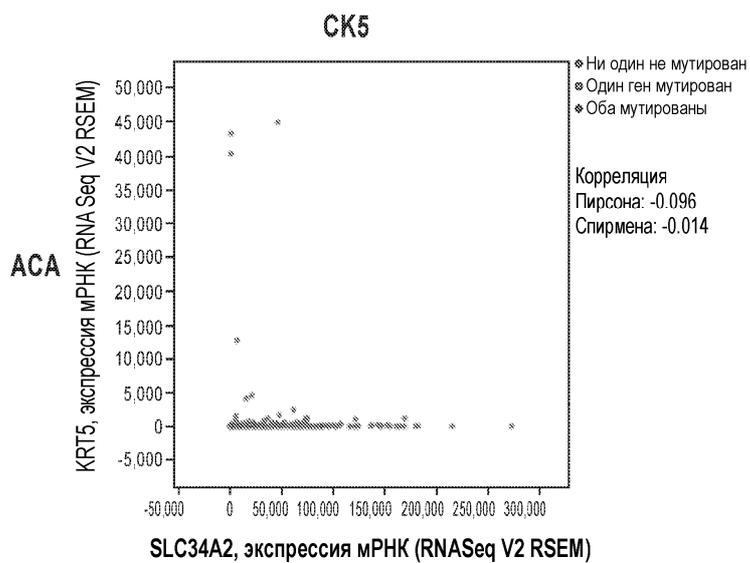


Напсин А



NaPi2b

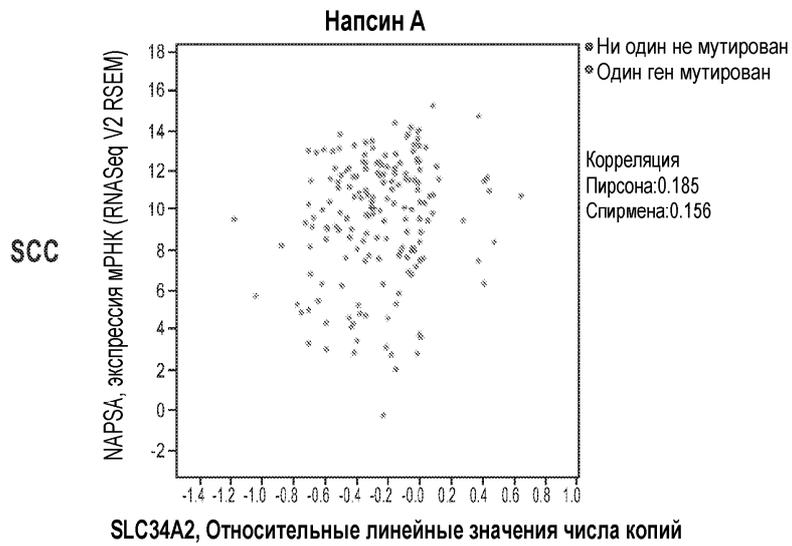
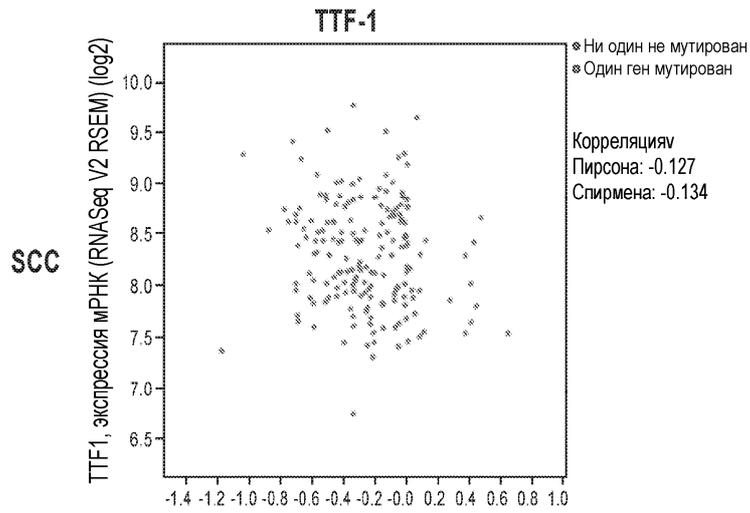
Фиг. 11



NaPi2b

Фиг. 11 (продолжение)

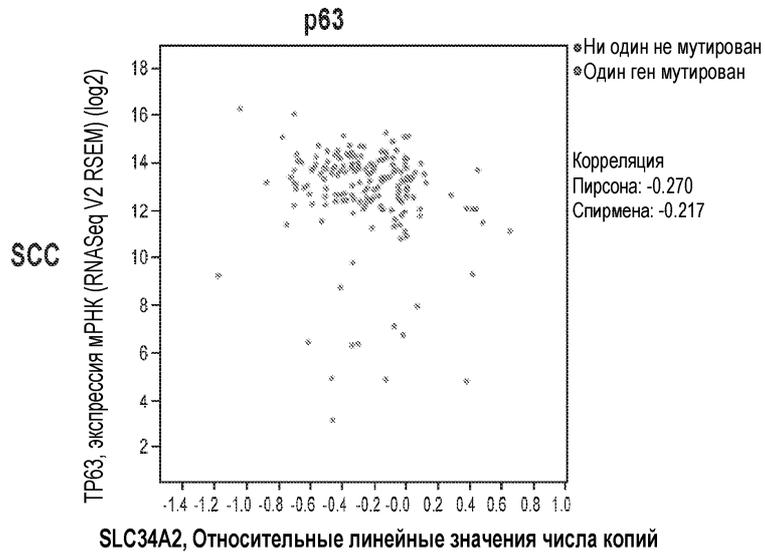
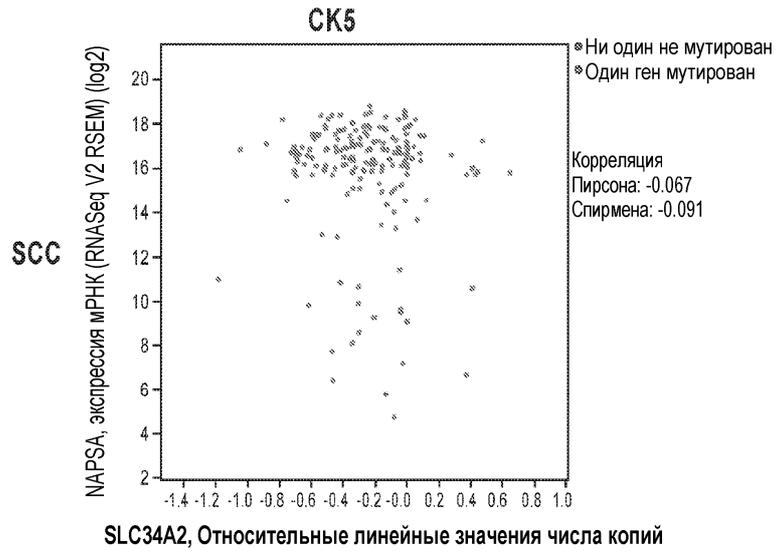
045779



NaPi2b

Фиг. 11 (продолжение)

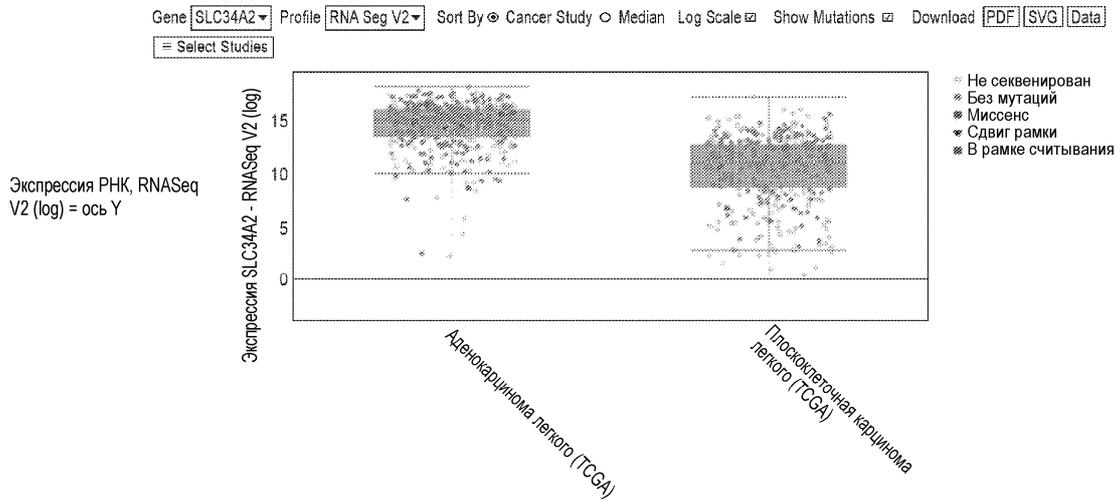
045779



NaPi2b

Фиг. 11 (продолжение)

SLC34A2

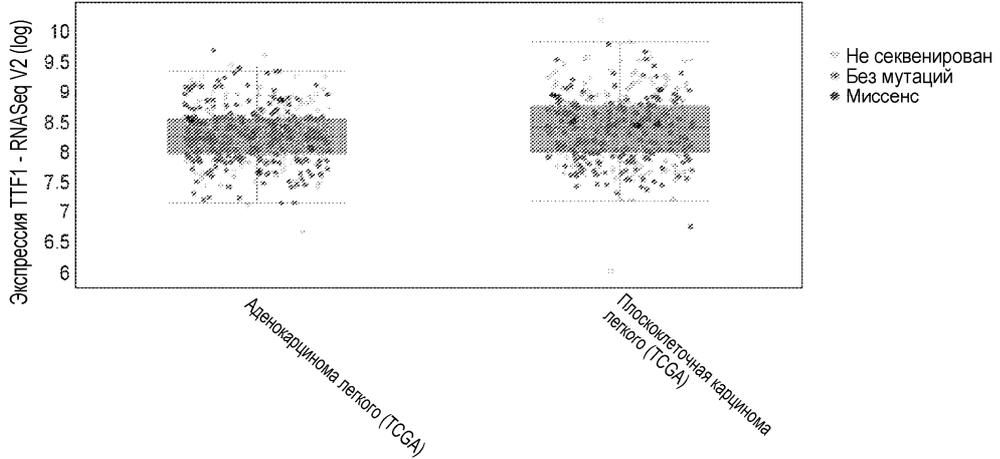


Фиг. 12

045779

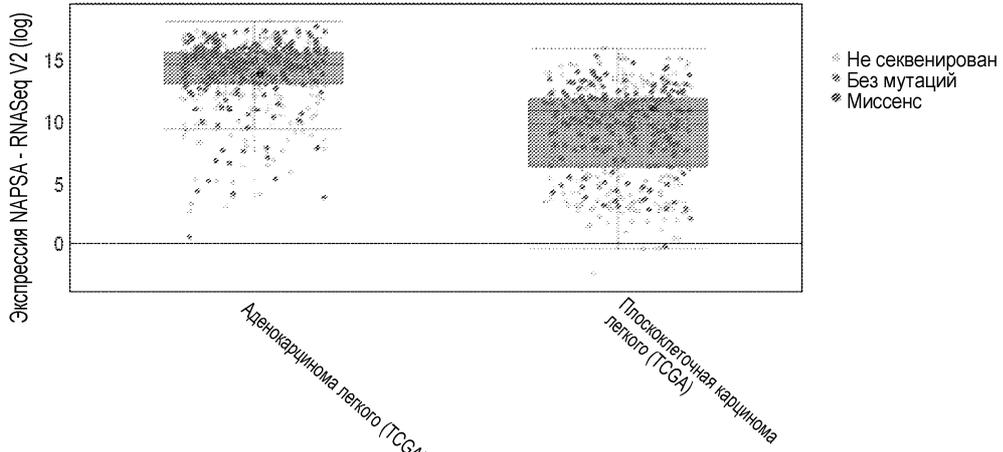
TTF1

Gene **TTF1** Profile **RNA Seg V2** Sort By Cancer Study Median Log Scale Show Mutations Download [PDF](#) [SVG](#) [Data](#)



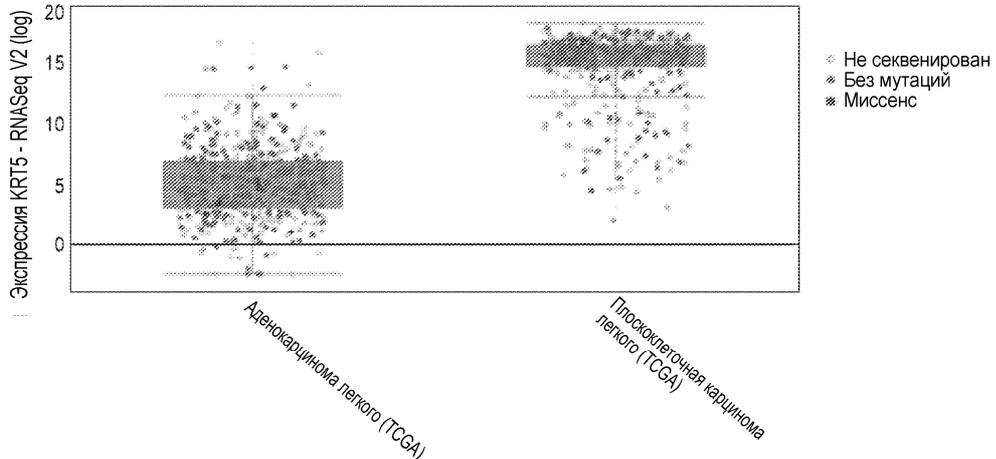
Напсин А

Gene **NAPSA** Profile **RNA Seg V2** Sort By Cancer Study Median Log Scale Show Mutations Download [PDF](#) [SVG](#) [Data](#)



СК5

Gene **KRT5** Profile **RNA Seg V2** Sort By Cancer Study Median Log Scale Show Mutations Download [PDF](#) [SVG](#) [Data](#)

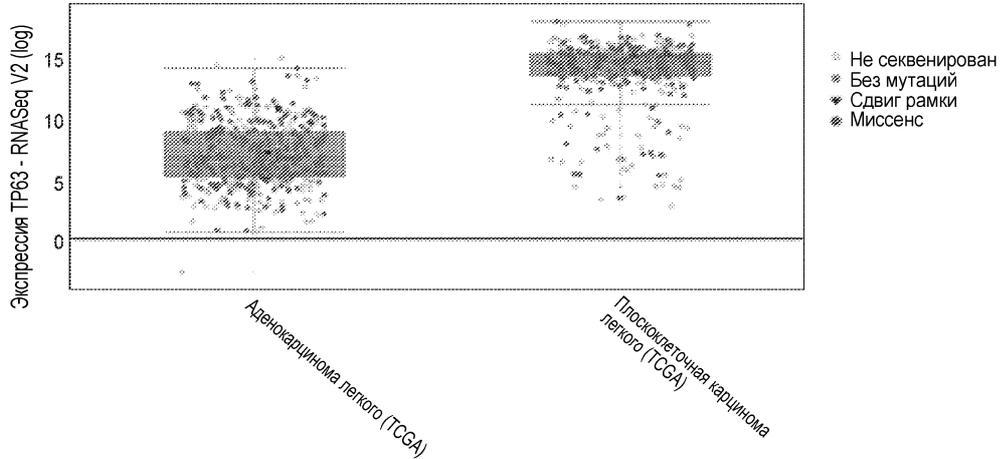


Фиг. 12 (продолжение)

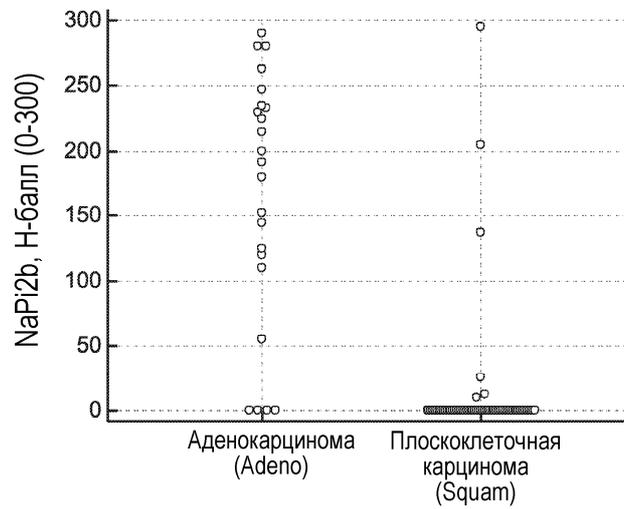
P63

Gene TP63 Profile RNA Seg V2 Sort By Cancer Study Median Log Scale Show Mutations Download PDF SVG Data

Select Studies

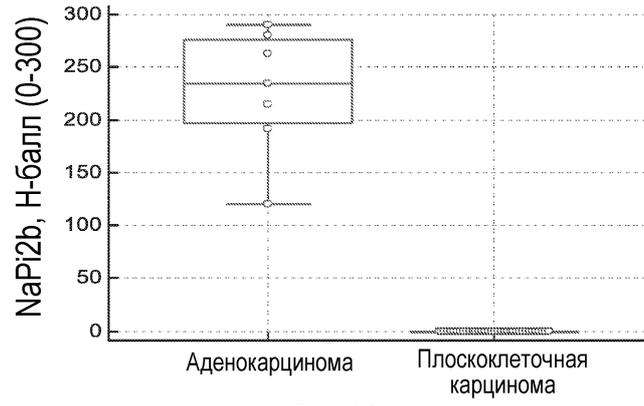


Фиг. 12 (продолжение)



		Положит.	Отрицат.
Тип патологии	Squam	3	60
	Adeno	19	4
	Другое	4	9
Произвольный порог отсеечения H-балл ≥ 50			

Фиг. 13



Фиг. 14