

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202390864 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.06.20

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)

(22) Дата подачи заявки
2021.10.21

(54) АНТИТЕЛА К FGFR2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 63/104,377; 63/220,948; 63/253,858

(72) Изобретатель:

(32) 2020.10.22; 2021.07.12; 2021.10.08

Дэли Кристофер, Делфино Франк,
Хан Эми, Ниттоли Томас, Чжан Ли
(US)

(33) US

(86) PCT/US2021/056018

(87) WO 2022/087243 2022.04.28

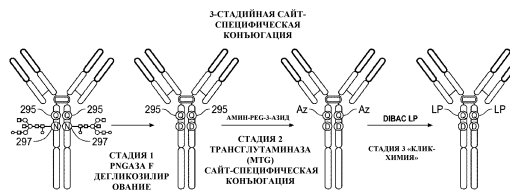
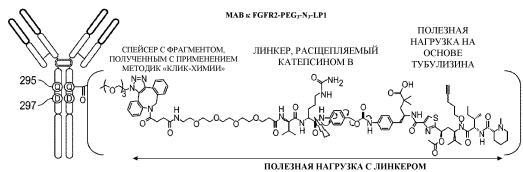
(74) Представитель:

(71) Заявитель:

РЕГЕНЕРОН ФАРМАСЬЮТИКАЛЗ,
ИНК. (US)

Джермакян Р.В., Угрюмов В.М.,
Гизатуллина Е.М., Строкова О.В.,
Костюшенкова М.Ю., Гизатуллин
Ш.Ф. (RU)

(57) В изобретении предусмотрены моноклональные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают рецептор 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), и способы их применения. Также включены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, связанные с цитотоксическим средством, радионуклидом или другим фрагментом, а также способы лечения с их применением.



A1

202390864

202390864

A1

АНТИТЕЛА К FGFR2 И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ
ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

[0001] Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, а также к конъюгатам антитело-лекарственное средство таких антител, которые специфически связываются с рецептором 2 фактора роста фибробластов (FGFR2), и к способам их применения.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Официальная копия перечня последовательностей подана одновременно с описанием в электронном виде через EFS-Web в виде перечня последовательностей в формате ASCII под названием 10680WO01_Sequence_Listing_ST25.TXT, который был создан 21 октября 2021 г. и имеет размер приблизительно 72 килобайта. Перечень последовательностей, содержащийся в данном документе в формате ASCII, является частью настоящего описания и включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0003] Семейство тирозинкиназных рецепторов (RTK) фактора роста фибробластов (FGF) состоит из рецептора 1 фактора роста фибробластов (FGFR1), FGFR2, FGFR3 и FGFR4 и охватывает рецепторы с высокой аффинностью к не менее чем 18 различным FGF-лигандам. Рецептор представляет собой трансмембранную тирозинкиназу, и передача сигнала FGFR управляет нисходящими путями, включая пути митоген-активируемой протеинкиназы (MAPK) и АКТ, которые имеют решающее значение для пролиферации, дифференцировки, выживания и миграции клеток. Связывание FGF-лиганда с рецептором вызывает димеризацию комплекса FGF:FGFR. Димеризация приводит к активации киназы и аутофосфорилированию множества остатков тирозина в цитоплазматическом домене рецептора, а также к активации нисходящей передачи сигналов в путях фосфоинозитид-3-киназы (PI3K)-АКТ и киназы, регулируемой внеклеточными сигналами (ERK), представляющей собой MAPK. Альтернативный сплайсинг петли IgIII в FGFR1-3 приводит к образованию изоформ FGFRIIIb или FGFRIIIc.

[0004] Сообщалось об амплификации FGFR2 при различных видах рака.

Амплификация FGFR2 влияет на передачу сигнала без изменения киназной активности, присущей рецептору. Передача сигнала при сверхэкспрессии FGFR2 также свидетельствует о том, что она является независимой от лиганда и чувствительной к ингибиторам FGFR (Lorenzi, 1997, Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptor-2 by carboxyl terminal alterations, *Oncogene*; Takeda, 1999, AZD2171 shows potent antitumor activity against gastric cancer over-expressing fibroblast growth factor receptor 2/keratinocyte growth factor receptor, *Clin Cancer Research*; Cha, 2009, Aberrant receptor internalization and enhanced FRS2-dependent signaling contribute to the transforming activity of the fibroblast growth factor receptor 2 IIIb C3 isoform, *J. Biol. Chem.*).

[0005] Кроме того, белок FGFR2 сверхэкспрессируется при приблизительно 3% случаев рака молочной железы, включая трижды негативный рак молочной железы, и в приблизительно 10% случаев рака желудка/пищевода. Сверхэкспрессия FGFR2 также обнаружена при других видах рака, включая рак толстой кишки, гепатоцеллюлярный рак, рак поджелудочной железы, яичника, матки, шейки матки, эндометрия, мочевого пузыря, легкого, толстой кишки, глиому и виды рака головы и шеи. Кроме того, мутации гена FGFR2 были зарегистрированы в приблизительно 12% случаев карцином эндометрия. Сверхэкспрессия FGFR2 была ассоциирована с плохой выживаемостью у пациентов с раком желудка.

[0006] Существует значительный интерес к FGFR2 как к терапевтической мишени при различных типах опухолей. Для пациентов с раком желудка, характеризующихся амплификацией FGFR2, было предложено терапевтическое вмешательство с использованием низкомолекулярных ингибиторов FGFR, таких как TAS-120 и AZD4547.

[0007] Как доклинические, так и клинические исследования продемонстрировали, что опухоли с амплификацией FGFR чувствительны к ингибированию FGFR и, следовательно, восприимчивы к терапевтическому целенаправленному воздействию. Сообщается, что лечение FGFR2-положительных опухолей терапевтическими средствами на основе антитела к FGFR2, такими как бемаритузумаб (также известный как HGS1036, HGS 1036, FP-1039, FPA144, GSK3052230), приводит к улучшениям в отношении ранней выживаемости и

заболевания поздней стадии. (Gemo et al. (2014) «FPA144: A Therapeutic Antibody for Treating Patients with Gastric Cancers Bearing FGFR2 Gene Amplification» AACR Abstract ID 5446; Powers et al. (2016) «FPA144, A Therapeutic Monoclonal Antibody Targeting the FGFR2b Receptor, Promotes Antibody Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity and Stimulates Sensitivity to PD-1 in the 4T1 Syngeneic Tumor Model» AACR Abstract ID 1407, и Lee et al. (2016) «Antitumor Activity and Safety of FPA144, an ADCC-Enhanced, FGFR2b Isoform-Selective Monoclonal Antibody, in Patients with FGFR2b+ Gastric Cancer and Advanced Solid Tumors» ASCO Abstract ID 2502).

[0008] Некоторые антитела к FGFR2 конъюгированы с цитотоксическими полезными нагрузками, включая торий-227 (апрутумаб, также известный как BAY1179470, BAY2304058) и ауристин (апрутумаб иксадотин, также известный как BAY1187982, BAY1179470 ADC). Сообщается, что апрутумаб-ТТС (антитело к FGFR2 с хелаторным фрагментом, ковалентно конъюгированным с антителом, и испускающим альфа-частицы радионуклидом торий-227) подавлял рост опухоли на нескольких моделях ксенотрансплантатов. (Wickstroem et al. (2019) «Preclinical Combination Studies of an FGFR2 Targeted Thorium Conjugate and the ATR Inhibitor Bay 1895344» Int J Radiat Oncol Biol Phys 105(2):410—422; Wittemer-Rump et al. (2014) «Pharmacokinetic and Pharmacodynamic (PK/PD) Modeling of Preclinical Data of a Novel Anti-Fibroblast Growth Factor Receptor 2 (FGFR2) Antibody (BAY 1179470) to Guide Dosing in Phase 1» AACR Abstract ID 672). При клиническом тестировании апрутумаб иксодотин плохо переносился, при этом минимальная переносимая доза, как было обнаружено, была ниже терапевтического порога, установленного доклинически; поэтому испытание было прекращено досрочно. (Sommer et al. (2016) «Preclinical Efficacy of the Auristatin-Based Antibody-Drug Conjugate BAY 1187982 for the Treatment of FGFR2-Positive Solid Tumors» Cancer Res 76(21):6331-6339; Sommer et al. (2014) «FGFR2-ADC Potently and Selectively Inhibits Growth of Gastric and Breast Cancer Xenograft Models» AACR Abstract ID 4491).

[0009] Остается значительная неудовлетворенная медицинская потребность в улучшенных противораковых лекарственных средствах, которые эффективны при видах рака с экспрессией FGFR2.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ

[0010] В данном документе предусмотрены антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают белок, представляющий собой рецептор 2 FGF человека (FGFR2). Антитела являются применимыми, *среди прочего*, для целенаправленного воздействия на опухолевые клетки, которые экспрессируют FGFR2. Антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие части можно использовать отдельно в немодифицированной форме или можно включать в качестве части конъюгата антитело-лекарственное средство.

[0011] Другие варианты осуществления будут очевидны из обзора следующего подробного описания.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0012] **Фигура 1А и фигура 1В.** На **фигуре 1А** изображено моноклональное антитело со спейсером на основе фрагмента, полученного с применением методик клик-химии, линкером, расщепляемым катепсином В, и полезной нагрузкой на основе тубулизина. На **фигуре 1В** показан способ сайт-специфической конъюгации антитела.

[0013] На **фигуре 2** представлены анализы конъюгата антитело к FGFR2 — тубулизин посредством SEC-HPLC.

[0014] На **фигуре 3** показано изменение объема опухоли и веса тела с ксенотрансплантатами рака желудка человека с течением времени при обработке с использованием различных доз конъюгата антитело к FGFR2 — тубулизин.

[0015] На **фигуре 4** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с ксенотрансплантатами рака желудка человека с течением времени при обработке с использованием различных доз конъюгата антитело к FGFR2 — майтанзиноид.

[0016] На **фигуре 5** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с опухолями PDX GA0033 рака желудка человека с течением времени при обработке с использованием различных доз конъюгата антитело к FGFR2 — тубулизин и конъюгата антитело к FGFR2 — майтанзиноид. Мышам вводили в день 0 и день 7 соответствующие ADC или контрольные антитела.

[0017] На **фигуре 6** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с ксенотрансплантатами рака желудка человека SNU-16 с течением времени при

обработке с использованием различных доз конъюгата антитела к FGFR2 — аналог камптотецина (DAR8). Мышам вводили в день 0 соответствующие конъюгаты и дозы.

[0018] На **фигуре 7** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с ксенотрансплантатами рака желудка человека SNU-16 с течением времени при обработке с использованием различных доз конъюгата антитела к FGFR2 с аналогом камптотецина (DAR4). Мышам вводили соответствующие дозы в день 0 и день 7.

[0019] На **фигуре 8** показаны структуры основных компонентов неограничивающих иллюстративных азидаминовых линкеров.

[0020] На **фигуре 9** показаны структуры основных компонентов иллюстративных неограничивающих азидаминовых линкеров с разветвленным алкилом.

[0021] На **фигуре 10** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с опухолями PDX GA1224 человека с течением времени при обработке с использованием различных доз ADC на основе антитела к FGFR2 и камптотецина (DAR4). Мышам вводили соответствующие дозы в день 0 и день 7.

[0022] На **фигуре 11** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с ксенотрансплантатами рака желудка человека SNU-16 (FGFR2b-положительными) с течением времени при обработке с использованием ADC на основе антитела к FGFR2 и камптотецина (DAR4) или ADC на основе антитела к FGFR2 и майтанзиноида.

[0023] На **фигуре 12** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с ксенотрансплантатами рака желудка человека SNU-5 (FGFR2b-отрицательными) с течением времени при обработке с использованием ADC на основе антитела к FGFR2 и камптотецина (DAR4) или ADC на основе антитела к FGFR2 и майтанзиноида.

[0024] На **фигуре 13** показано изменение объема опухоли и веса тела у мышей с совместной имплантацией в соотношении 2:1 ксенотрансплантатов рака желудка человека SNU-16 (FGFR2b-положительных) и SNU-5 (FGFR2b-отрицательных) при обработке с использованием ADC на основе антитела к FGFR2 и камптотецина (DAR4) или ADC на основе антитела к FGFR2 и майтанзиноида.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0025] Перед описанием настоящего изобретения необходимо понимать, что настоящее изобретение не ограничивается конкретными описанными способами и условиями экспериментов, поскольку такие способы и условия могут варьироваться. Также следует понимать, что терминология, используемая в данном документе, предназначена только для целей описания конкретных вариантов осуществления и не предназначена для ограничения, поскольку объем настоящего изобретения будет ограничиваться только прилагаемой формулой изобретения.

[0026] Если не указано иное, то все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют такое же значение, как это обычно понимает специалист в области техники, к которой принадлежит настоящее изобретение. Используемый в данном документе термин «приблизительно» при использовании в отношении конкретного указанного числового значения означает, что значение может отличаться от указанного значения на не более чем 1%. Например, используемое в данном документе выражение «приблизительно 100» включает 99 и 101 и все значения между ними (*например*, 99,1, 99,2, 99,3, 99,4 и *т. д.*).

[0027] Хотя при практическом осуществлении или тестировании настоящего изобретения можно применять любые способы и материалы, сходные с описанными в данном документе или эквивалентные им, в данном документе описаны только предпочтительные способы и материалы. Все патенты, заявки на патент и непатентные публикации, упомянутые в данном описании, включены в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

БЕЛОК FGFR2

[0028] Выражения «FGFR2» и т. п., используемые в данном документе, относятся к тирозиновой протеинкиназе, которая действует как рецептор клеточной поверхности в отношении факторов роста фибробластов. Белок также известен как рецептор фактора роста кератиноцитов и CD332. FGFR2b может относиться к аминокислотной последовательности, представленной под SEQ ID NO: 55, и/или характеризоваться аминокислотной последовательностью, представленной в NCBI

под номером доступа NP_075259.4, и кодируется геном FGFR2, находящимся на хромосоме 10.

[0029] Изоформа эпителиального белка 1, регулирующего сплайсинг (ESRP1), отвечает за сплайсинг FGFR2 и последующую экспрессию эпителиальной изоформы FGFR2b.

[0030] FGFR2 представляет собой тирозиновую протеинкиназу, которая действует как рецептор клеточной поверхности в отношении факторов роста фибробластов и играет важную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки, миграции и апоптоза клеток, а также в регуляции эмбрионального развития. Активация FGFR2 приводит к фосфорилированию PLCG1, FRS2 и PAK4 и активации нескольких сигнальных каскадов. Активация PLCG1 приводит к продуцированию клеточных сигнальных молекул диацилглицерола и инозитол-1,4,5-трифосфата. Фосфорилирование FRS2 запускает рекрутирование GRB2, GAB1, PIK3R1 и SOS1 и опосредует активацию RAS, MAPK1/ERK2, MAPK3/ERK1 и сигнального пути MAP-киназы, а также сигнального пути АКТ1. Передача сигнала FGFR2 подавляется убиквитинированием, интернализацией и деградацией. Мутации, которые приводят к конститутивной активации киназы или нарушают нормальное созревание, интернализацию и деградацию FGFR2, приводят к aberrантной передаче сигнала. Сходным образом, сверхэкспрессируемый FGFR2 способствует активации STAT1.

[0031] Все ссылки на белки, полипептиды и фрагменты белка в данном документе относятся к человеческой версии соответствующего белка, полипептида или фрагмента белка, если явно не указано, что они получены от видов, отличных от человека. Таким образом, выражение «FGFR2» означает FGFR2 человека, если не указано, что он получен от видов, отличных от человека, *например*, «FGFR2 мыши», «FGFR2 обезьяны» и *т. п.*

[0032] Используемое в данном документе выражение «FGFR2, экспрессируемый на клеточной поверхности», означает один или более белков FGFR2 или его внеклеточный домен, которые экспрессируются на поверхности клетки *in vitro* или *in vivo* таким образом, что по меньшей мере часть белка FGFR2 располагается на внеклеточной стороне клеточной мембраны и доступна для

антигенсвязывающей части антитела. «FGFR2, экспрессируемый на клеточной поверхности», может предусматривать белок FGFR2, экспрессируемый на поверхности клетки, которая обычно экспрессирует белок FGFR2, или состоять из него. В качестве альтернативы «FGFR2, экспрессируемый на клеточной поверхности» может предусматривать белок FGFR2, экспрессируемый на поверхности клетки, которая в норме не экспрессирует FGFR2 человека на своей поверхности, но была искусственно сконструирована для экспрессии FGFR2 на своей поверхности, или состоять из него.

АНТИТЕЛА К FGFR2 И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

[0033] Используемый в данном документе термин «антитело» означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с определенным антигеном (например, FGFR2). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие четыре полипептидные цепи, две тяжелые цепи (HC) и две легкие цепи (LC), связанные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Термин «антитело» также включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из четырех полипептидных цепей, двух HC и двух LC, соединенных между собой дисульфидными связями. Каждая HC содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена — C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Каждая LC содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления настоящего изобретения FR антитела к FGFR2 (или его антигенсвязывающей части) могут быть

идентичными последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе параллельного сравнения двух или более CDR.

[0034] Сходным образом, термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие восемь полипептидных цепей, четыре HC и четыре LC, соединенные между собой дисульфидными связями, т. е. биспецифическое антитело. Термин «антитело» также включает молекулы иммуноглобулина, состоящие из восьми полипептидных цепей, четырех HC и четырех LC, соединенных между собой дисульфидными связями.

[0035] Кроме того, термин «антитело» включает функционализированные молекулы иммуноглобулина, содержащие по меньшей мере одну HC, где HC содержит азидо-PEG₃-амин. В некоторых аспектах азидо-PEG₃-амин расположен в сайте Q295 в HC антитела. В некоторых аспектах азидо-PEG₃-амин расположен в сайте Q297 антитела. В некоторых аспектах антитело содержит две HC, функционализированные азидо-PEG₃-аминами, расположенными в обоих сайтах Q295 в HC. В некоторых аспектах антитело содержит две HC, функционализированные азидо-PEG₃-аминами, расположенными в обоих сайтах Q297 в HC. В некоторых аспектах антитело содержит две HC, функционализированные азидо-PEG₃-аминами, расположенными в обоих сайтах Q295 и в обоих сайтах Q297 в HC. Сайты Q297 в HC получают путем модификации N297 в Q297, также называемой в данном документе модификацией N297Q.

[0036] В соответствии с одним аспектом предусмотрены антитела к FGFR2. Иллюстративные антитела к FGFR2 в соответствии с этим аспектом перечислены в таблицах 3 и 4 в данном документе. В таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей тяжелой цепи (HCVR), переменных областей легкой цепи (LCVR), определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), тяжелых цепей (HC) и легких цепей (LC) антител к FGFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов, раскрытых в данном документе. В таблице 4 представлены идентификаторы

последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, LCVR, HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2, LCDR3, HC и LC иллюстративных антител.

[0037] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR в пределах HCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0038] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0039] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR в пределах LCVR, содержащей аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0040] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0041] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR в пределах пары аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR (HCVR/LCVR), содержащей любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3. В данном документе также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/28 и 40/44.

[0042] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0043] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0044] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3,

или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0045] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR1 легкой цепи (LCDR1), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0046] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR2 легкой цепи (LCDR2), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0047] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие CDR3 легкой цепи (LCDR3), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0048] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR1 и LCDR1 (HCDR1/LCDR1), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 3. В соответствии с определенными вариантами

осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат по меньшей мере одну пару аминокислотных последовательностей HCDR1/LCDR1, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к FGFR2, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR1/LCDR1 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4/12, 24/30 и 24/46.

[0049] Также предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR2 и LCDR2 (HCDR2/LCDR2), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 3. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат по меньшей мере одну пару аминокислотных последовательностей HCDR2/LCDR2, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к FGFR2, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR2/LCDR2 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 6/14 и 6/32.

[0050] Также в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HCDR3 и LCDR3 (HCDR3/LCDR3), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты содержат по меньшей мере одну пару аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3, содержащуюся в любом из иллюстративных антител к FGFR2, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HCDR3/LCDR3 выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 8/16, 26/34 и 42/34.

[0051] Также в данном документе предусмотрены антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие набор из шести CDR (*m. e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в любой из иллюстративных последовательностей антитела к FGFR2, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления наборы аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3 выбраны из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, 24-6-26-30-32-34 и 24-6-42-46-32-34.

[0052] В связанном варианте осуществления антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержат набор из шести CDR (*m. e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3), содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, определенных для любой из иллюстративных последовательностей антитела к FGFR2, перечисленных в таблице 3. Например, антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты могут содержать набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранных из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/28 и 40/44.

[0053] Способы и методики идентификации CDR в пределах аминокислотных последовательностей HCVR и LCVR хорошо известны из уровня техники и могут применяться для идентификации CDR в пределах указанных аминокислотных последовательностей HCVR и/или LCVR, раскрытых в данном документе. Иллюстративные общепринятые способы, которые можно использовать для идентификации границ CDR, включают, например, определение согласно Kabat, определение согласно Chothia и определение согласно AbM. В общих чертах, определение согласно Kabat основано на вариабельности последовательности, определение согласно Chothia основано на расположении структурных областей петли, а определение согласно AbM является компромиссным решением между подходами согласно Kabat и Chothia. *См., например, Kabat, «Sequences of Proteins of Immunological Interest», National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991); Al-Lazikani et al., J. Mol. Biol. 273:927—948 (1997), и Martin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:9268—9272 (1989).* Также для идентификации последовательностей CDR в

антителе доступны базы данных общего пользования.

[0054] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Например, в данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие HC, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, но содержащие модификацию N297Q или эквивалентную модификацию. В качестве примера в данном документе предусмотрены антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие тяжелую цепь, содержащую модификацию N297Q в пределах аминокислотной последовательности HC, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 36 и 49. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HC, содержащую модификацию N297Q в пределах аминокислотной последовательности HC под SEQ ID NO: 18. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HC, содержащую модификацию N297Q в пределах аминокислотной последовательности HC под SEQ ID NO: 36. В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HC, содержащую модификацию N297Q в пределах аминокислотной последовательности HC под SEQ ID NO: 49.

[0055] В некоторых аспектах антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HC, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 53 и 54. Такие последовательности HC содержат эквивалент модификации N297Q.

[0056] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность,

выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0057] В данном документе предусмотрены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают FGFR2, содержащие пару аминокислотных последовательностей HC и LC (HC/LC), содержащую любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, в паре с любой из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в таблице 3. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела содержат две пары аминокислотных последовательностей HC/LC, содержащиеся в любом из иллюстративных антител к FGFR2, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/20, 36/38 и 49/51. В некоторых аспектах HC содержит модификацию N297Q, как предусмотрено выше. Таким образом, пара аминокислотных последовательностей HC/LC выбрана из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52/20, 53/38 и 54/51.

[0058] В данном документе также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антитела к FGFR2 или их части. Например, настоящее изобретение предусматривает молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0059] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из

последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0060] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR1, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR1, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0061] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR2, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR2, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0062] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HCDR3, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCDR3, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0063] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR1, перечисленных в таблице 3;

в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR1, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0064] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR2, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR2, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0065] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LCDR3, перечисленных в таблице 3; в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCDR3, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0066] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие HCVR, где HCVR содержит набор из трех CDR (*m. e.* HCDR1-HCDR2-HCDR3), где набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3 является таким, как определено для любого из иллюстративных антител к FGFR2, перечисленных в таблице 3.

[0067] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие LCVR, где LCVR содержит набор из трех CDR (*m. e.* LCDR1-LCDR2-LCDR3), где набор аминокислотных последовательностей LCDR1-LCDR2-LCDR3 является таким,

как определено для любого из иллюстративных антител к FGFR2, перечисленных в таблице 3.

[0068] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие как HCVR, так и LCVR, где HCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, и где LCVR содержит аминокислотную последовательность из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты HCVR, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней, и полинуклеотидную последовательность, выбранную из любой из последовательностей нуклеиновой кислоты LCVR, перечисленных в таблице 4, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. В определенных вариантах осуществления в соответствии с данным аспектом молекула нуклеиновой кислоты кодирует HCVR и LCVR, где как HCVR, так и LCVR получены из одного и того же антитела к FGFR2, приведенного в таблице 3.

[0069] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, или кодирующие по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Например, молекулы нуклеиновой кислоты могут кодировать любую из аминокислотных последовательностей HC, перечисленных в таблице 3, где HC содержит модификацию N297Q.

[0070] Также предусмотрены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие любую из аминокислотных последовательностей LC, перечисленных в таблице 3, или кодирующие по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по

меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

[0071] Также в данном документе предусмотрены рекомбинантные векторы экспрессии, способные обеспечивать экспрессию полипептида, содержащего переменную область тяжелой или легкой цепи антитела к FGFR2. Например, рекомбинантные векторы экспрессии содержат любую из упомянутых в данном документе молекул нуклеиновой кислоты, *т. е.* молекул нуклеиновой кислоты, кодирующих любую из последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 3. Также в объем настоящего изобретения включены клетки-хозяева, в которые были введены такие векторы, а также способы получения антител или их частей путем культивирования клеток-хозяев в условиях, обеспечивающих продуцирование антител или фрагментов антител, и выделение полученных таким образом антител и фрагментов антител.

[0072] В данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, характеризующиеся модифицированным профилем гликозилирования. В некоторых вариантах осуществления может быть применима модификация для удаления нежелательных сайтов гликозилирования или антитело, лишенное фукозного фрагмента, присутствующего в олигосахаридной цепи, например, для повышения функции антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) (см. Shield et al. (2002) JBC 277:26733). В других путях применения модификацию галактозилирования можно осуществлять для изменения комплементзависимой цитотоксичности (CDC).

Антигенсвязывающие домены

[0073] Используемое в данном документе выражение «антигенсвязывающий домен» означает любой пептид, полипептид, молекулу нуклеиновой кислоты, молекулу каркасного типа, молекулу пептидного дисплея или конструкцию, содержащую полипептид, которые способны специфически связывать конкретный представляющий интерес антиген (например, FGFR2 человека). Термин «специфически связывает» или подобный, используемый в данном документе, означает, что антигенсвязывающий домен образует комплекс с определенным

антигеном, характеризующийся константой диссоциации (K_D), составляющей 500 пМ или меньше, и не связывает другие неродственные антигены в обычных условиях тестирования. «Неродственные антигены» представляют собой белки, пептиды или полипептиды, которые характеризуются менее чем 95% идентичностью аминокислот по отношению друг к другу.

[0074] Иллюстративные категории антигенсвязывающих доменов, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают антитела, антигенсвязывающие части антител, пептиды, которые специфически взаимодействуют с конкретным антигеном (например, пептитела), рецепторные молекулы, которые специфически взаимодействуют с конкретным антигеном, белки, содержащие лигандсвязывающую часть рецептора, которая специфически связывает конкретный антиген, антигенсвязывающие каркасы (например, DARPIn, белки с повторами HEAT, белки с повторами ARM, белки с тетраатрикопептидными повторами и другие каркасы на основе встречающихся в природе белков с повторами и т. п. [см., например, Voersma and Pluckthun, 2011, *Curr. Opin. Biotechnol.* 22:849—857, и ссылки, цитируемые в нем]), а также аптамеры или их части.

[0075] Способы определения наличия специфического связывания двух молекул друг с другом хорошо известны из уровня техники и включают, например, равновесный диализ, поверхностный плазмонный резонанс и т. п. Например, антигенсвязывающий домен, используемый в контексте настоящего изобретения, включает полипептиды, которые связывают конкретный антиген (например, молекулу-мишень [Т] или интернализирующий эффекторный белок [Е]) или его часть с K_D , составляющей менее чем приблизительно 500 пМ, менее чем приблизительно 400 пМ, менее чем приблизительно 300 пМ, менее чем приблизительно 200 пМ, менее чем приблизительно 100 пМ, менее чем приблизительно 90 пМ, менее чем приблизительно 80 пМ, менее чем приблизительно 70 пМ, менее чем приблизительно 60 пМ, менее чем приблизительно 50 пМ, менее чем приблизительно 40 пМ, менее чем приблизительно 30 пМ, менее чем приблизительно 20 пМ, менее чем приблизительно 10 пМ, менее чем приблизительно 5 пМ, менее чем приблизительно 4 пМ, менее чем приблизительно 2 пМ, менее чем приблизительно 1 пМ, менее чем приблизительно 0,5 пМ, менее чем приблизительно 0,2 пМ, менее чем

приблизительно 0,1 пМ или менее чем приблизительно 0,05 пМ, как измерено в анализе поверхностного плазмонного резонанса.

[0076] Термин «поверхностный плазмонный резонанс», используемый в данном документе, относится к оптическому явлению, которое обеспечивает возможность анализа взаимодействий в реальном времени посредством выявления изменений значений концентрации белков в биосенсорной матрице, например с применением системы VIAcore™ (подразделение Biacore Life Sciences в GE Healthcare, Пискатауэй, Нью-Джерси).

[0077] Термин « K_D », используемый в данном документе, означает равновесную константу диссоциации конкретного белок-белкового взаимодействия (например, взаимодействия антитело-антиген). Если не указано иное, значения K_D , раскрытые в данном документе, относятся к значениям K_D , определенным посредством анализа поверхностного плазмонного резонанса при 25°C.

[0078] Как указано выше, «антигенсвязывающий домен» может предусматривать антитело или антигенсвязывающий фрагмент антитела или состоять из них. Термин «антитело», используемый в данном документе, означает любую антигенсвязывающую молекулу или молекулярный комплекс, содержащий по меньшей мере одну определяющую комплементарность область (CDR), которая специфически связывается или взаимодействует с конкретным антигеном (например, FGFR2 человека). Термин «антитело» включает молекулы иммуноглобулина, содержащие две полипептидные цепи, одну тяжелую (H) цепь и одну легкую (L) цепь, соединенные между собой дисульфидными связями, а также их мультимеры (например, IgM). Тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как HCVR или V_H) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена — C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно обозначенную в данном документе как LCVR или V_L) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен (C_{L1}). Области V_H и V_L могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), чередующиеся с более консервативными областями, называемыми

каркасными областями (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксиконцу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. В различных вариантах осуществления FR антител, предусмотренных в данном документе (или их антигенсвязывающей части), могут быть идентичны последовательностям зародышевой линии человека или могут быть модифицированы естественным или искусственным путем. Консенсусную аминокислотную последовательность можно определить на основании анализа на основе параллельного сравнения двух или более CDR.

[0079] Термины «антигенсвязывающая часть» антитела, «антигенсвязывающий фрагмент» антитела и т. п., используемые в данном документе, включают любой встречающийся в природе, получаемый ферментативным путем, синтетический или генетически сконструированный полипептид или гликопротеин, который специфически связывает антиген с образованием комплекса. Антигенсвязывающие фрагменты антитела могут быть получены, например, из молекул полного антитела с применением любых подходящих стандартных методик, таких как протеолитическое расщепление или рекомбинантные методики генной инженерии, включающие манипуляцию с ДНК, кодирующей переменные и необязательно константные домены антитела, и ее экспрессию. Такая ДНК известна и/или легко доступна, например, из коммерческих источников, библиотек ДНК (включая, например, фаговые библиотеки антител), или может быть синтезирована. ДНК можно секвенировать и с ней можно проводить химические манипуляции или манипуляции с применением методик молекулярной биологии, например, для расположения одного или более переменных и/или константных доменов в подходящей конфигурации или для введения кодонов, включения остатков цистеина, модификации, добавления или удаления аминокислот и т. п.

[0080] Неограничивающие примеры антигенсвязывающих фрагментов включают: (i) Fab-фрагменты; (ii) F(ab')₂-фрагменты; (iii) Fd-фрагменты; (iv) Fv-фрагменты; (v) одноцепочечные молекулы Fv (scFv); (vi) dAb-фрагменты и (vii) минимальные распознающие единицы, состоящие из аминокислотных остатков, которые имитируют гиперпеременную область антитела (например, выделенная определяющая комплементарность область (CDR), такая как пептид CDR3), или

пептид FR3-CDR3-FR4 с ограниченной конформационной свободой. Другие сконструированные молекулы, такие как домен-специфические антитела, однодоменные антитела, антитела с удаленным доменом, химерные антитела, антитела с привитой CDR, диатела, триатела, тетратела, миниантитела, нанотела (например, моновалентные нанотела, бивалентные нанотела и т. п.), иммунофармацевтические средства на основе небольшого модульного белка (SMIP) и переменные домены IgNAR акулы также охватываются выражением «антигенсвязывающий фрагмент», используемым в данном документе.

[0081] Антигенсвязывающий фрагмент антитела обычно будет содержать по меньшей мере один переменный домен. Переменный домен может быть любого размера или аминокислотного состава и будет, как правило, содержать по меньшей мере одну CDR, которая находится в смежном положении или в одной рамке считывания с одной или более каркасными последовательностями. В антигенсвязывающих фрагментах, содержащих домен V_H , ассоциированный с доменом V_L , домены V_H и V_L могут располагаться друг относительно друга в любом подходящем порядке. Например, переменная область может быть димерной и содержать димеры V_H - V_H , V_H - V_L или V_L - V_L . В качестве альтернативы, антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать мономерный домен V_H или V_L .

[0082] В определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела может содержать по меньшей мере один переменный домен, ковалентно связанный с по меньшей мере одним константным доменом. Неограничивающие иллюстративные конфигурации переменных и константных доменов, которые могут находиться в пределах антигенсвязывающего фрагмента антитела по настоящему изобретению, включают: (i) V_H - C_H1 ; (ii) V_H - C_H2 ; (iii) V_H - C_H3 ; (iv) V_H - C_H1 - C_H2 ; (v) V_H - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (vi) V_H - C_H2 - C_H3 ; (vii) V_H - C_L ; (viii) V_L - C_H1 ; (ix) V_L - C_H2 ; (x) V_L - C_H3 ; (xi) V_L - C_H1 - C_H2 ; (xii) V_L - C_H1 - C_H2 - C_H3 ; (xiii) V_L - C_H2 - C_H3 и (xiv) V_L - C_L . В любой конфигурации переменных и константных доменов, в том числе любой из иллюстративных конфигураций, перечисленных выше, переменные и константные домены могут быть либо непосредственно соединены друг с другом, либо могут быть соединены посредством целой шарнирной или линкерной области

или ее части. Шарнирная область может состоять из по меньшей мере 2 (например, 5, 10, 15, 20, 40, 60 или больше) аминокислот, которые обеспечивают образование гибкой или полугибкой связи между смежными переменными и/или константными доменами в одной молекуле полипептида. Более того, антигенсвязывающий фрагмент может предусматривать гомодимер или гетеродимер (или другой мультимер) из любых конфигураций переменных и константных доменов, перечисленных выше, нековалентно связанных друг с другом и/или с одним или более мономерными доменами V_H или V_L (например, посредством дисульфидной связи(связей)).

[0083] Антитела, предусмотренные в данном документе, могут предусматривать человеческие антитела и/или рекомбинантные человеческие антитела или их фрагменты или состоять из них. Термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, включает антитела, содержащие переменные и константные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии. Человеческие антитела могут, тем не менее, содержать аминокислотные остатки, не кодируемые человеческими последовательностями иммуноглобулинов зародышевой линии (например, за счет мутаций, вводимых посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro*, или посредством введения соматической мутации *in vivo*), например в CDR, и, в частности, в CDR3. Однако подразумевается, что термин «человеческое антитело», используемый в данном документе, не включает антитела, в которых последовательности CDR, полученные из последовательностей зародышевой линии другого вида млекопитающего, такого как мышь, привиты на человеческие каркасные последовательности.

[0084] Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут предусматривать рекомбинантные антитела человека или их антигенсвязывающие фрагменты или состоять из них. Используемый в данном документе термин «рекомбинантное человеческое антитело» предназначен для включения всех человеческих антител, которые получены, экспрессированы, созданы или выделены рекомбинантным путем, таких как антитела, экспрессируемые с использованием рекомбинантного вектора экспрессии, которым трансфицировали клетку-хозяина (дополнительно описанную ниже), антитела, выделенные из

рекомбинантной комбинаторной библиотеки человеческих антител (дополнительно описанной ниже), антитела, выделенные из организма животного (например, мыши), которое является трансгенным по генам человеческого иммуноглобулина (см., например, Taylor et al. (1992) Nucl. Acids Res. 20:6287—6295), или антитела, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные любым другим способом, который включает сплайсинг последовательностей генов человеческого иммуноглобулина с другими последовательностями ДНК. Такие рекомбинантные человеческие антитела содержат переменные и константные области, полученные из человеческих последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии. Однако в определенных вариантах осуществления такие рекомбинантные человеческие антитела подвергаются мутагенезу *in vitro* (или, если используют животное, трансгенное по последовательностям человеческого Ig, соматическому мутагенезу *in vivo*) и, следовательно, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител представляют собой последовательности, которые, хотя и получены из человеческих последовательностей V_H и V_L зародышевой линии и родственны им, могут не существовать в природе в репертуаре человеческих антител зародышевой линии *in vivo*.

[0085] Антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, предусмотренные в данном документе, могут быть «выделенными». Используемый в данном документе термин «выделенное антитело к FGFR2» означает антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые были идентифицированы и отделены и/или извлечены из по меньшей мере одного компонента своего природного окружения. Например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые были отделены или удалены от по меньшей мере одного компонента организма или из ткани или клетки, в которых антитело продуцируется, являются «выделенным антителом к FGFR2» для целей настоящего изобретения. Выделенное антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент также включают молекулы *in situ* в пределах рекомбинантной клетки. Выделенные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты представляют собой молекулы, которые были подвергнуты по меньшей мере одной стадии очистки или выделения. В соответствии с определенными вариантами осуществления выделенное антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут по сути не содержать другого клеточного

материала и/или химических соединений.

ВАРИАНТЫ

[0086] Антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в данном документе, могут содержать одну или более аминокислотных замен, вставок и/или делеций в каркасной области и/или областях CDR переменных доменов тяжелой и легкой цепей по сравнению с соответствующими последовательностями зародышевой линии, из которых были получены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты. Такие мутации можно легко определить посредством сравнения аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, с последовательностями зародышевой линии, доступными, например, из общедоступных баз данных последовательностей антител. Настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые получены из любых аминокислотных последовательностей, раскрытых в данном документе, где одна или более аминокислот в пределах одной или более каркасных областей и/или областей CDR подвергнуты мутации с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) из последовательности зародышевой линии, из которой получено антитело, или с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) из другой последовательности зародышевой линии человека, или с получением консервативной аминокислотной замены из соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) зародышевой линии (такие изменения последовательности в данном документе в совокупности обозначены как «мутации зародышевой линии»).

[0087] Специалист средней квалификации в данной области техники, принимая за основу раскрытые в данном документе последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепей, может легко получить множество антител или их антигенсвязывающих фрагментов, которые содержат одну или более отдельных мутаций зародышевой линии или их комбинации. В определенных вариантах осуществления все остатки из каркасной области и/или CDR в пределах доменов V_H и/или V_L подвергнуты обратной мутации с получением остатков, встречающихся в первоначальной последовательности зародышевой линии, из которой было получено антитело. В других вариантах осуществления только

определенные остатки подвергнуты обратной мутации с получением первоначальной последовательности зародышевой линии, например, только подвергнутые мутации остатки, находящиеся в пределах первых 8 аминокислот FR1 или в пределах последних 8 аминокислот FR4, или только подвергнутые мутации остатки, находящиеся в пределах CDR1, CDR2 или CDR3. В других вариантах осуществления один или более остатков каркасной области и/или CDR подвергнуты мутации с получением соответствующего(соответствующих) остатка(остатков) другой последовательности зародышевой линии (т. е. последовательности зародышевой линии, которая отличается от последовательности зародышевой линии, из которой первоначально было получено антитело).

[0088] Кроме того, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут содержать любую комбинацию из двух или более мутаций зародышевой линии в пределах каркасных областей и/или областей CDR, например, где определенные отдельные остатки подвергнуты мутации с получением соответствующего остатка определенной последовательности зародышевой линии, в то время как определенные другие остатки, которые отличаются от исходной последовательности зародышевой линии, сохранены или подвергнуты мутации с получением соответствующего остатка другой последовательности зародышевой линии. После получения антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат одну или более мутаций зародышевой линии, можно легко протестировать в отношении одного или более требуемых свойств, таких как улучшенная специфичность связывания, повышенная аффинность связывания, улучшенные или усиленные антагонистические или агонистические биологические свойства (в случае необходимости), сниженная иммуногенность и т. п. Настоящее изобретение охватывает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные посредством этого общего способа.

[0089] Обычно антитело или антигенсвязывающий фрагмент, предусмотренные в данном документе, которые модифицированы некоторым образом, сохраняют способность специфически связываться с FGFR2, например, сохраняют по меньшей мере 10% от своей активности связывания FGFR2 (по сравнению с исходным антителом) при выражении этой активности на основе молей.

В некоторых аспектах антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению сохраняют по меньшей мере 20%, 50%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100% или больше от аффинности связывания FGFR2 исходного антитела. Также предусматривается, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержать консервативные или неконсервативные аминокислотные замены (называемые «консервативными вариантами» или «вариантами с сохранением функции» антитела), которые по сути не изменяют их биологическую активность.

[0090] «Вариант» полинуклеотида относится к полинуклеотиду, содержащему нуклеотидную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70—99,9% (например, по меньшей мере приблизительно 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5 или 99,9%) идентична эталонной нуклеотидной последовательности, которая представлена в данном документе (например, SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 27, 29, 31, 33, 35, 37, 39, 41, 43, 45, 47, 48 и 50), при выполнении сравнения с помощью алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, порог значения ожидания: 10; длина слова: 28; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; показатели совпадения/несовпадения: 1, -2; штрафы за пропуск: линейные).

[0091] Термин «идентичность по сути» или «по сути идентичный» по отношению к нуклеиновой кислоте или ее фрагменту указывает на то, что при оптимальном выравнивании соответствующих нуклеотидных вставок или делеций с другой нуклеиновой кислотой (или ее комплементарной нитью) идентичность нуклеотидной последовательности составляет по меньшей мере приблизительно 90% и более предпочтительно по меньшей мере приблизительно 95%, 96%, 97%, 98% или 99% нуклеотидных оснований, как измерено с помощью хорошо известного алгоритма определения идентичности последовательностей, такого как FASTA, BLAST или GAP, как обсуждается ниже. Молекула нуклеиновой кислоты, которая по сути идентична молекуле эталонной нуклеиновой кислоты, в определенных случаях

может кодировать полипептид, характеризующийся такой же или по сути сходной аминокислотной последовательностью, что и полипептид, кодируемый молекулой эталонной нуклеиновой кислоты.

[0092] «Вариант» полипептида, такого как цепь иммуноглобулина (например, V_H, V_L, HC или LC mAb1, V_H, V_L, HC или LC mAb2 или V_H, V_L, HC или LC mAb3) относится к полипептиду, содержащему аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере приблизительно 70—99,9% (например, 70, 72, 74, 75, 76, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 99,5, 99,9%) идентична или сходна с эталонной аминокислотной последовательностью, которая представлена в данном документе (например, SEQ ID NO: 2, 10, 18, 20, 22, 28, 36, 38, 40, 44, 49 или 51), при выполнении сравнения с помощью алгоритма BLAST, где параметры алгоритма выбраны для получения наибольшего совпадения между соответствующими последовательностями по всей длине соответствующих эталонных последовательностей (например, порог значения ожидания: 10; длина слова: 3; максимальное количество совпадений в диапазоне запроса: 0; матрица BLOSUM 62; штрафы за пропуск: наличие – 11, удлинение – 1; условная композиционная корректировка оценочной матрицы).

[0093] Применительно к полипептидам термин «сходство по сути» или «по сути сходный» означает, что две пептидные последовательности при оптимальном выравнивании, как, например, с помощью программ GAP или BESTFIT с применением штрафов за открытие гэпа по умолчанию, характеризуются по меньшей мере 90% идентичностью последовательностей, еще более предпочтительно по меньшей мере 95%, 98% или 99% идентичностью последовательностей. Предпочтительно, положения остатков, которые не являются идентичными, отличаются консервативными аминокислотными заменами. Термин «консервативно модифицированный вариант» или «консервативная замена» относится к варианту, где имеется одна или более замен аминокислот в полипептиде на другие аминокислоты, обладающие сходными характеристиками (например зарядом, размером боковой цепи, гидрофобностью/гидрофильностью, конформацией остова и жесткостью и т. п.). Такие изменения зачастую могут быть осуществлены без значительного нарушения биологической активности антитела или фрагмента. Специалистам в

данной области техники известно, что, как правило, одиночные аминокислотные замены в несущественных областях полипептида по сути не изменяют биологическую активность (см., например, Watson et al. (1987) *Molecular Biology of the Gene*, The Benjamin/Cummings Pub. Co., p. 224 (4th Ed.)). Кроме того, замены структурно или функционально сходных аминокислот с меньшей вероятностью существенно нарушат биологическую активность.

[0094] В случаях, когда две или более аминокислотных последовательностей отличаются друг от друга консервативными заменами, процент или степень сходства можно регулировать в сторону повышения для коррекции консервативного характера замены. Средства для осуществления такой коррекции хорошо известны специалистам в данной области техники. (См., например, Pearson (1994) *Methods Mol. Biol.* 24: 307—331). Примеры групп аминокислот, которые содержат боковые цепи со сходными химическими свойствами, включают 1) алифатические боковые цепи: глицин, аланин, валин, лейцин и изолейцин; 2) алифатические боковые цепи с гидроксильными группами: серин и треонин; 3) амид-содержащие боковые цепи: аспарагин и глутамин; 4) ароматические боковые цепи: фенилаланин, тирозин и триптофан; 5) основные боковые цепи: лизин, аргинин и гистидин; 6) кислые боковые цепи: аспартат и глутамат и 7) серосодержащие боковые цепи: цистеин и метионин. Предпочтительными группами консервативных аминокислотных замен являются валин-лейцин-изолейцин, фенилаланин-тирозин, лизин-аргинин, аланин-валин, глутамат-аспартат и аспарагин-глутамин. В качестве альтернативы, консервативной заменой является любое изменение, характеризующееся положительным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250, раскрытой в Gonnet *et al.* (1992) *Science* 256: 1443 45. «Умеренно консервативная» замена представляет собой любое изменение, характеризующееся неотрицательным значением в матрице логарифмической функции правдоподобия PAM250.

[0095] Сходство последовательностей полипептидов обычно измеряют с применением программного обеспечения для анализа последовательностей. Программное обеспечение для анализа белков сопоставляет сходные последовательности с использованием показателей сходства, присваиваемых различным заменам, делециям и другим модификациям, в том числе консервативным

аминокислотным заменам. Например, программное обеспечение GCG включает программы, такие как GAP и BESTFIT, которые можно использовать с параметрами по умолчанию для определения гомологии последовательностей или идентичности последовательностей у близкородственных полипептидов, таких как гомологичные полипептиды из различных видов организмов, или белка дикого типа и его мутеина. См., например, GCG версии 6.1. Полипептидные последовательности также можно сравнивать с использованием FASTA с применением параметров по умолчанию или рекомендованных параметров; программа в GCG версии 6.1. FASTA (например, FASTA2 и FASTA3) обеспечивает выравнивания и расчет процента идентичности последовательностей в областях с наибольшим перекрытием между запрашиваемой и найденной последовательностями (Pearson (2000) выше). Другим предпочтительным алгоритмом при сравнении предусмотренной в данном документе последовательности с базой данных, содержащей большое количество последовательностей от разных организмов, является компьютерная программа BLAST, в частности BLASTP или TBLASTN, с применением параметров по умолчанию. См., например, Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403—410 и Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Res.* 25:3389—3402, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[0096] Настоящее изобретение также включает антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие варианты любой из раскрытых в данном документе аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR. Иллюстративные варианты, включенные в данный аспект, включают варианты любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, раскрытых в данном документе, содержащие одну или более замен, например, консервативных замен. В некоторых аспектах настоящее изобретение включает антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие аминокислотные последовательности HCVR, LCVR и/или CDR с, например, 10 или меньше, 8 или меньше, 6 или меньше, 4 или меньше, 3 или меньше, 2 или 1 аминокислотной заменой относительно любой из аминокислотных последовательностей HCVR, LCVR и/или CDR, представленных в таблице 3 в данном документе, где модифицированные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты сохраняют активность связывания в отношении FGFR2.

[0097] Антигенсвязывающие белки, связывающие FGFR2, например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, в одном варианте осуществления содержат переменную область тяжелой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотами, представленными в SEQ ID NO: 2, 22 или 40, и/или переменную область легкой цепи иммуноглобулина, характеризующуюся по меньшей мере 70% (например, 80%, 85%, 90%, 95%, 99%) идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотами, представленными в SEQ ID NO: 10, 28 или 44.

[0098] Кроме того, вариант антигенсвязывающего белка, связывающего FGFR2, может содержать полипептид, содержащий аминокислотную последовательность, которая представлена в данном документе, за исключением одной или более (например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10) мутаций, таких как, например, миссенс-мутации (например, консервативные замены), нонсенс-мутации, делеции или вставки. Например, настоящее изобретение включает антигенсвязывающие белки, которые содержат вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 2, 22 или 40, но содержащую одну или более из таких мутаций, и/или вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 10, 28 или 44, но содержащую одну или более из таких мутаций. В одном варианте осуществления настоящего изобретения вариант антигенсвязывающего белка, связывающего FGFR2, содержит вариант тяжелой цепи иммуноглобулина, содержащий HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где одна или более (например, 1, или 2, или 3) из таких CDR содержат одну или более из таких мутаций (например, консервативных замен), и/или вариант легкой цепи иммуноглобулина, содержащий LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где одна или более (например, 1, или 2, или 3) из таких CDR содержат одну или более из таких мутаций (например, консервативных замен).

[0099] В настоящем изобретении дополнительно предусмотрены варианты антигенсвязывающих белков, связывающих FGFR2, например, антитела или их

антигенсвязывающие фрагменты, содержащие один или более вариантов CDR (например, любой один или более из HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3), которые представлены в данном документе, с по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98%, 99% или 99,9% идентичностью последовательности или сходством с, например, SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и/или 16, или 24, 6, 26, 30, 32 и/или 34, или 24, 6, 42, 46, 32 и/или 34.

[0100] Варианты осуществления настоящего изобретения также включают варианты антигенсвязывающих белков, например, антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат V_H и V_L иммуноглобулина, или HC и LC, которые содержат аминокислотную последовательность, характеризующуюся 70% или большей (например, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) общей идентичностью аминокислотной последовательности или сходством с аминокислотными последовательностями соответствующих V_H , V_L , HC или LC, конкретно представленных в данном документе, но где HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и/или LCDR3 таких иммуноглобулинов не являются вариантами и содержат аминокислотную последовательность, представленную под SEQ ID NO: 4, 6, 8, 12, 14 и/или 16, или 24, 6, 26, 30, 32 и/или 34, или 24, 6, 42, 46, 32 и/или 34 соответственно. Таким образом, в таких вариантах осуществления CDR в вариантах антигенсвязывающих белков как таковых не являются вариантами.

[0101] В некоторых аспектах в данном документе предусмотрено антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0102] В некоторых аспектах HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность под

SEQ ID NO: 4, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, содержащую две или меньше аминокислотных замен, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, содержащую две или меньше аминокислотных замен.

[0103] В некоторых аспектах HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

[0104] В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей.

[0105] В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

[0106] В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 22 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 28 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0107] В некоторых аспектах HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, содержащую две или меньше аминокислотных замен, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, содержащую две или меньше аминокислотных замен.

[0108] В некоторых аспектах HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

[0109] В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей.

[0110] В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22; и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

[0111] Функционально-консервативные варианты антител к FGFR2 и их антигенсвязывающих фрагментов также являются частью настоящего изобретения. Любой из вариантов антител к FGFR2 и их антигенсвязывающих фрагментов (как обсуждается в данном документе) может быть «функционально-консервативным вариантом». Такие функционально-консервативные варианты в некоторых случаях также могут быть охарактеризованы как консервативно модифицированные варианты. «Функционально-консервативные варианты», как используется в данном документе, относятся к вариантам антител к FGFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов, в которых один или более аминокислотных остатков были изменены без значительного изменения одного или более функциональных свойств антитела или фрагмента. В одном варианте осуществления настоящего изобретения функционально-консервативный вариант антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению предусматривает вариант аминокислотной последовательности и проявляет одно или более из следующих функциональных свойств:

- связывается с FGFR2b с K_D , равной $2,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- селективно связывает hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c и/или
- характеризуется периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 10 минут, как измерено посредством

поверхностного плазмонного резонанса.

Антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие варианты Fc

[0112] В соответствии с определенными вариантами осуществления, предусмотренными в данном документе, предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более мутаций, которые обеспечивают усиление или ослабление связывания антитела с FcRn-рецептором, например, при кислом значении pH по сравнению с нейтральным значением pH. Например, настоящее изобретение включает антитела к FGFR2, содержащие мутацию в C_H2- или C_H3-области Fc-домена, где мутация(мутации) обеспечивает(обеспечивают) повышение аффинности Fc-домена к FcRn в кислой среде (например, в эндосоме, где значение pH варьируется от приблизительно 5,5 до приблизительно 6,0). Результатом таких мутаций может быть увеличение периода полужизни антитела в сыворотке крови при введении животному. Неограничивающие примеры таких модификаций Fc включают, например, модификацию в положении 250 (например, E или Q); 250 и 428 (например, L или F); 252 (например, L/Y/F/W или T), 254 (например, S или T) и 256 (например, S/R/Q/E/D или T), или модификацию в положении 428 и/или 433 (например, H/L/R/S/P/Q или K), и/или 434 (например, A, W, H, F или Y [N434A, N434W, N434H, N434F или N434Y]), или модификацию в положении 250 и/или 428, или модификацию в положении 307 или 308 (например, 308F, V308F) и 434. В одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 428L (например, M428L) и 434S (например, N434S); модификацию 428L, 259I (например, V259I) и 308F (например, V308F); модификацию 433K (например, H433K) и 434 (например, 434Y); модификацию 252, 254 и 256 (например, 252Y, 254T и 256E); модификацию 250Q и 428L (например, T250Q и M428L) и модификацию 307 и/или 308 (например, 308F или 308P). В еще одном варианте осуществления модификация предусматривает модификацию 265A (например, D265A) и/или 297A (например, N297A).

[0113] Например, в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2, содержащие Fc-домен, содержащий одну или более пар или групп мутаций, выбранных из группы, состоящей из 250Q и 248L (например, T250Q и M248L); 252Y,

254T и 256E (например, M252Y, S254T и T256E); 428L и 434S (например, M428L и N434S); 257I и 311I (например, P257I и Q311I); 257I и 434H (например, P257I и N434H); 376V и 434H (например, D376V и N434H); 307A, 380A и 434A (например, T307A, E380A и N434A) и 433K и 434F (например, H433K и N434F). Объемом настоящего изобретения предусмотрены все возможные комбинации вышеупомянутых мутаций в Fc-домене и другие мутации в пределах вариабельных доменов антитела, раскрытых в данном документе.

[0114] Настоящее изобретение также включает антитела к FGFR2, содержащие химерную константную область тяжелой цепи (C_H), где химерная область C_H содержит сегменты, полученные из областей C_H более чем одного изотипа иммуноглобулина. Например, антитела по настоящему изобретению могут содержать химерную область C_H , содержащую часть домена C_{H2} или весь этот домен, полученный из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с частью домена C_{H3} или всем этим доменом, полученным из молекулы человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления антитела, предусмотренные в данном документе, содержат химерную область C_H , содержащую химерную шарнирную область. Например, химерный шарнир может содержать «верхнюю шарнирную» аминокислотную последовательность (аминокислотные остатки из положений 216—227 согласно нумерации EU), полученную из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4, в комбинации с «нижней шарнирной» последовательностью (аминокислотные остатки из положений 228—236 согласно нумерации EU), полученной из шарнирной области человеческого IgG1, человеческого IgG2 или человеческого IgG4. В соответствии с определенными вариантами осуществления химерная шарнирная область содержит аминокислотные остатки, полученные из верхней шарнирной последовательности человеческого IgG1 или человеческого IgG4, и аминокислотные остатки, полученные из нижней шарнирной последовательности человеческого IgG2. Антитело, содержащее химерную область C_H , описанную в данном документе, может в определенных вариантах осуществления проявлять эффекторные функции модифицированного Fc без неблагоприятного воздействия на терапевтические или фармакокинетические свойства антитела. (См., например, предварительную заявку на

патент США № 61/759578, поданную 1 февраля 2013 года).

Полиспецифические антитела

[0115] Антитела, предусмотренные в данном документе, могут быть моноспецифическими, биспецифическими или полиспецифическими. Полиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов одного целевого полипептида или могут содержать антигенсвязывающие домены, специфические в отношении более чем одного целевого полипептида. См., например, Tutt et al., 1991, *J. Immunol.* 147:60—69; Kufer et al., 2004, *Trends Biotechnol.* 22:238—244.

[0116] Любые из предусмотренных в данном документе полиспецифических антигенсвязывающих молекул или их вариантов можно конструировать с применением стандартных молекулярно-биологических методик (например, технологии рекомбинантной ДНК и экспрессии белков), известных специалисту в данной области техники.

[0117] В некоторых вариантах осуществления антитела, специфические в отношении FGFR2, получают в биспецифическом формате («биспецифическая» молекула), в котором переменные области, связывающиеся с отличающимися доменами FGFR2, соединены вместе для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Полученные соответствующим образом биспецифические молекулы способны усиливать общую ингибиторную эффективность в отношении FGFR2 посредством повышения как специфичности, так и авидности связывания. Переменные области со специфичностью к отдельным доменам, или области, которые способны связываться с разными областями в пределах одного домена, объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой области одновременно связываться с отдельными эпитопами или с разными областями в пределах одного домена. В одном примере для получения биспецифической молекулы переменные области тяжелой цепи (V_H) из связывающей молекулы со специфичностью к одному домену подвергают рекомбинации с переменными областями легкой цепи (V_L) из ряда связывающих молекул со специфичностью ко второму домену для идентификации некогатных

партнеров V_L , которые можно объединять в пару с исходной V_H без нарушения исходной специфичности данной V_H . Таким же способом можно объединять отдельный сегмент V_L (например, V_{L1}) с двумя разными V_H -доменами (например, V_{H1} и V_{H2}) для получения биспецифической молекулы, состоящей из двух связывающих «плеч» ($V_{H1} - V_{L1}$ и $V_{H2} - V_{L1}$). Использование отдельного сегмента V_L уменьшает сложность системы и тем самым упрощает и повышает эффективность способов клонирования, экспрессии и очистки, используемых для получения биспецифических молекул (см., например, USSN13/022759 и US2010/0331527).

[0118] В качестве альтернативы, антитела, которые связывают несколько доменов и вторую мишень, такие как без ограничения, например, второе отличающееся антитело к FGFR, можно получать в биспецифическом формате с использованием описанных в данном документе методик или других методик, известных специалисту в данной области техники. Варибельные области антитела, связывающиеся с отличающимися областями, можно соединять вместе с варибельными областями, которые связываются с соответствующими сайтами на, например, FGFR2, для придания двойной антигенной специфичности в пределах одной связывающей молекулы. Соответственно сконструированные биспецифические молекулы с данными свойствами служат в качестве молекул с двойной функцией. Варибельные области со специфичностью в отношении одного антигена объединяют с варибельными областями со специфичностью в отношении FGFR2 и объединяют в пару на структурном каркасе, что позволяет каждой варибельной области связываться с отдельными антигенами.

[0119] Иллюстративный формат биспецифического антитела, который можно использовать в контексте настоящего изобретения, включает применение C_{H3} -домена первого иммуноглобулина (Ig) и C_{H3} -домена второго Ig, где C_{H3} -домены первого и второго Ig отличаются друг от друга по меньшей мере одной аминокислотой, и где отличие в по меньшей мере одну аминокислоту ослабляет связывание биспецифического антитела с белком А по сравнению с биспецифическим антителом, в котором отсутствует отличие по аминокислотам. В одном варианте осуществления C_{H3} -домен первого Ig связывает белок А, а C_{H3} -домен второго Ig содержит мутацию, которая ослабляет или устраняет связывание белка А, такую как модификация H95R

(нумерация экзонов согласно IMGT; нумерация H435R согласно EU). Второй C_{H3} может дополнительно содержать модификацию Y96F (согласно IMGT; Y436F согласно EU). Дополнительные модификации, которые могут присутствовать в пределах второго C_{H3}, включают D16E, L18M, N44S, K52N, V57M и V82I (согласно IMGT; D356E, L358M, N384S, K392N, V397M и V422I согласно EU) в случае антител IgG1; N44S, K52N и V82I (IMGT; N384S, K392N и V422I согласно EU) в случае антител IgG2; и Q15R, N44S, K52N, V57M, R69K, E79Q и V82I (согласно IMGT; Q355R, N384S, K392N, V397M, R409K, E419Q и V422I согласно EU) в случае антител IgG4. Варианты формата биспецифических антител, описанные выше, рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения.

[0120] Другие иллюстративные биспецифические форматы, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают без ограничения, например, биспецифические форматы на основе scFv или диател, слитые конструкции IgG-scFv, двойной вариабельный домен (DVD)-Ig, квадрому, «выступы-во-впадины», общую легкую цепь (например, общую легкую цепь со структурой «выступы-во-впадины» и т. п.), CrossMab, CrossFab, (SEED)-антитело, «лейциновую застежку», дуотело, IgG1/IgG2, Fab (DAF)-IgG двойного действия и биспецифические форматы Mab² (для обзора вышеизложенных форматов см., например, Klein *et al.* 2012, mAbs 4:6, 1—11, и цитируемые в нем ссылки). Биспецифические антитела также можно конструировать с применением конъюгации пептид/нуклеиновая кислота, например, где не встречающиеся в природе аминокислоты с ортогональной химической реактивностью используются для получения сайт-специфических конъюгатов антитело-олигонуклеотид, которые затем самостоятельно собираются в мультимерные комплексы с определенными составом, валентностью и геометрической формой. (См., например, Kazane *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* [*Epub: Dec. 4, 2012*]).

[0121] Таким образом, в данном документе рассматриваются биспецифические антитела, содержащие по меньшей мере один антигенсвязывающий домен, который связывается с FGFR2. Способы получения биспецифических антител известны из уровня техники и могут применяться для конструирования раскрытых в данном документе биспецифических антигенсвязывающих молекул.

[0122] Иллюстративные антигенсвязывающие домены, которые могут быть включены в биспецифическую антигенсвязывающую молекулу, связывающую FGFR2, включают один или более антигенсвязывающих доменов, полученных из любой из раскрытых в данном документе последовательностей, связывающихся с FGFR2. Например, настоящее изобретение включает биспецифические антигенсвязывающие молекулы FGFR2 x FGFR2, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий HCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей HCVR, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней. Также в данном документе предусмотрены биспецифические антигенсвязывающие молекулы FGFR2 x FGFR2, содержащие антигенсвязывающий домен D1 или D2, содержащий LCVR, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из любой из аминокислотных последовательностей LCVR, перечисленных в таблице 3, или по сути сходную с ней последовательность, характеризующуюся по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 98% или по меньшей мере 99% идентичностью последовательности с ней.

Биологические характеристики антигенсвязывающих молекул, предусмотренных в данном документе

[0123] В данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FGFR2 человека (например, hFGFR2b.mmh) с высокой аффинностью. Например, настоящее изобретение включает антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FGFR2 человека с K_D , составляющей менее чем приблизительно 25 нМ, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути сходного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FGFR2 человека при 25°C с K_D , составляющей менее

чем приблизительно 25 нМ, менее чем приблизительно 20 нМ, менее чем приблизительно 18 нМ, менее чем приблизительно 15 нМ, менее чем приблизительно 12 нМ, менее чем приблизительно 10 нМ, менее чем приблизительно 9 нМ или менее чем приблизительно 8 нМ, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути сходного анализа.

[0124] Также в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FGFR2 человека (например, hFGFR2b.mmh) с периодом полудиссоциации ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 10 минут, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса при 25°C, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути сходного анализа. В соответствии с определенными вариантами осуществления предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые связывают FGFR2 человека при 25°C с $t_{1/2}$, составляющим более чем приблизительно 12 минут, более чем приблизительно 14 минут, более чем приблизительно 16 минут, более чем приблизительно 18 минут, более чем приблизительно 20 минут, более чем приблизительно 22 минуты, более чем приблизительно 24 минуты или более чем приблизительно 25 минут или больше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, например, с применением формата анализа, определенного в примере 3 в данном документе, или по сути сходного анализа.

[0125] Таким образом, в данном документе предусмотрены выделенные моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с FGFR2, где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты демонстрируют одну или более из следующих характеристик:

- (a) представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела;
- (b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $2,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) селективно связывают hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c и
- (d) содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3),

содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 22 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 28 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

[0126] В данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, обладающие одной или более из следующих характеристик:

- (a) представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела;
- (b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $2,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) характеризуются периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 10 минут, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, и
- (d) селективно связывают hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c.

[0127] В данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, обладающие одной или более из следующих характеристик:

- (a) представляют собой полностью человеческие моноклональные антитела;
- (b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $8,9 \times 10^{-9}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;
- (c) характеризуются периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 25 минут, как измерено посредством поверхностного

плазмонного резонанса, и

(d) селективно связывают hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c.

[0128] В данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, конъюгированные с цитотоксином, обладающие одной или более из следующих характеристик:

(a) обладают селективной цитотоксичностью по отношению к клеткам, экспрессирующим hFGFR2b, по сравнению с клетками, экспрессирующими hFGFR2c;

(b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $4,8 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;

(c) характеризуются периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 7 минут, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, и

(d) индуцируют регрессию FGFR2b-положительных опухолей дозозависимым образом.

[0129] В данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином обладают слабой цитотоксичностью по отношению к клеткам с низким уровнем экспрессии FGFR2b, но с высоким уровнем экспрессии FGFR2c; обладают слабой цитотоксичностью по отношению к клеткам, не экспрессирующим FGFR2, и/или являются цитотоксическими по отношению к FGFR2b-положительным клеткам. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином обладают слабой цитотоксичностью по отношению к клеткам NCI-H716 с низким уровнем экспрессии FGFR2b, но с высоким уровнем экспрессии FGFR2c, т. е. характеризуются значением IC_{50} , составляющим более чем приблизительно 20 нМ, обладают слабой цитотоксичностью по отношению к клеткам IM-9, не экспрессирующим FGFR2, т. е. характеризуются значением IC_{50} , составляющим более чем приблизительно 20 нМ, и/или являются цитотоксическими по отношению к FGFR2b-положительным клеткам MFM-223 или SNU-16, т. е.

характеризуются значением IC50, составляющим менее чем приблизительно 270 пМ, например, менее чем приблизительно 268 пМ, менее чем приблизительно 214 пМ, менее чем приблизительно 206 пМ, менее чем приблизительно 172 пМ, менее чем приблизительно 125 пМ, менее чем приблизительно 63 пМ, менее чем приблизительно 43,4 пМ или менее чем приблизительно 37 пМ, как измерено с применением формата анализа цитотоксичности *in vitro*, определенного в примере 6 в данном документе, или по сути сходного анализа.

[0130] В данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином снижают скорость роста опухоли в случае FGFR2b-положительных опухолей. В данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином вызывают регрессию опухоли в случае FGFR2b-положительных опухолей. Снижение скорости роста опухоли и регрессию опухоли можно установить с применением ксенотрансплантатов опухоли, имплантированных мышам SCID, как описано в примере 7 в данном документе, или по сути сходного анализа.

[0131] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как тубулизин 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 16,2% у мышей, которым вводили 0,1 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как тубулизин 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 72,7% у мышей, которым вводили 0,3 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как тубулизин 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 132,5% у мышей, которым вводили 1,0 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной

инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как тубулизин 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 139% у мышей, которым вводили 3,0 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции.

[0132] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как майтанзиноид 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 63,9% у мышей, которым вводили 1,0 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как майтанзиноид 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 89,2% у мышей, которым вводили 3 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как майтанзиноид 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 102,3% у мышей, которым вводили 10 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как майтанзиноид 1ALP, снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 100,4% у мышей, которым вводили 15 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции.

[0133] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как камптотецин LP1 (8 DAR), снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере

99% у мышей, которым вводили 1,0 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как камптотецин LP1 (8 DAR), снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU на по меньшей мере 131% у мышей, которым вводили 3 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как камптотецин LP1 (8 DAR), снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU на по меньшей мере 131% у мышей, которым вводили 10 мг/кг антитела к FGFR2 в виде однократной подкожной инъекции.

[0134] В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как камптотецин LP2 (4 DAR), снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU-16 на по меньшей мере 72% у мышей, которым вводили 0,3 мг/кг антитела к FGFR2 посредством подкожной инъекции в день 0 и день 7. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как камптотецин LP2 (4 DAR), снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU на по меньшей мере 106% у мышей, которым вводили 1 мг/кг антитела к FGFR2 посредством подкожной инъекции в день 0 и день 7. В соответствии с определенными вариантами осуществления в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые при конъюгировании с цитотоксином, таким как камптотецин LP2 (4 DAR), снижают скорость роста ксенотрансплантата опухоли SNU на по меньшей мере 137% у мышей, которым вводили 3 мг/кг антитела к FGFR2 посредством подкожной инъекции в день 0 и день 7.

[0135] Антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению могут обладать одной или более из вышеупомянутых биологических характеристик или

любой их комбинацией. Приведенный выше перечень биологических характеристик антител не является исчерпывающим. Другие биологические характеристики предусмотренных в данном документе антител будут очевидны специалисту в данной области техники из обзора настоящего изобретения, включая предусмотренные в данном документе практические примеры.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

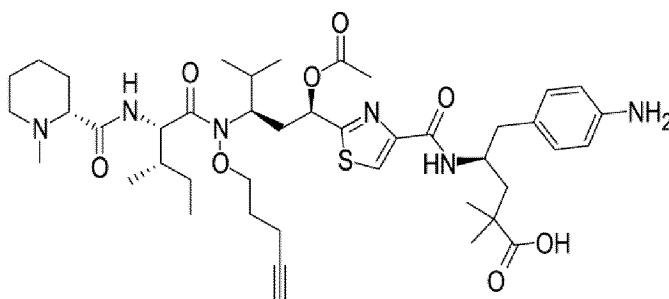
[0136] В данном документе предусмотрены конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), содержащие антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с терапевтическим фрагментом, таким как цитотоксическое средство (т.е. цитотоксин), химиотерапевтическое лекарственное средство или радиоизотоп.

[0137] Цитотоксические средства включают любое средство, которое оказывает негативное воздействие на рост, жизнеспособность или размножение клеток, включая без ограничения средства, взаимодействующие с тубулином, и средства, повреждающие ДНК. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой ингибитор тубулина. В конкретных вариантах осуществления ингибитор тубулина ингибирует полимеризацию тубулина. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическая полезная нагрузка представляет собой ингибитор топоизомеразы I. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, ауристин, гемиастерлин, винбластин, винкристин, пирролобензодиазепин, паклитаксел, доцетаксел, криптофицин, тубулизин или аналог камптотецина. Примеры подходящих цитотоксических средств и химиотерапевтических средств, которые можно конъюгировать с антителами к FGFR2 в соответствии с данным аспектом настоящего изобретения, также включают, например, 1-(2-хлорэтил)-1,2-диметансульфонилгидразид, 1,8-дигидроксибицикло[7.3.1]тридека-4,9-диен-2,6-диин-13-он, 1-дегидротестостерон, 5-фторурацил, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, 9-аминокамптотецин, актиномицин D, амантины, аминоптерин, ангуидин, антрациклин, антрамицин (AMC), блеомицин, бусульфан, масляную кислоту, калихеамицины (например, калихеамицин γ_1), камптотецин, карминомицины, кармустин, цемадотины, цисплатин, колхицин, комбретастатины, циклофосфамид,

цитарабин, цитохалазин В, Dxd или его производное, дактиномицин, даунорубицин, декарбазин, диацетоксипентилдоксорубицин, дибромманнит, дигидроксиантрациндион, дисоразолы, доластатин (например, доластатин 10), доксорубицин, дуокармицин, эхиномицины, элеутеробины, эметин, эпотилоны, эсперамицин, эстрамустины, бромид этидия, этопозид, фторурацилы, гелданамицины, грамицидин D, глюкокортикоиды, иринотеканы, ингибиторы белка кинезина веретена (KSP), лептомицины, лейрозины, лидокаин, ломустин (CCNU), майтанзиноиды, мехлорэтамин, мелфалан, меркатопурины, метоптерины, метотрексат, митрамицин, митомицин, митоксантрон, N8-ацетилспермидин, подофиллотоксины, прокаин, пропранолол, птеридины, пурамицин, пирролобензодиазепины (PBD), ризоксины, стрептозотоцин, таллизомицины, таксол, тенопозид, тетракаин, тиозпахлорамбуцил, томаймицины, топотеканы, тубулизин, винбластин, винкристин, виндезин, винорелбины и производные любого из вышеперечисленных. В соответствии с определенными вариантами осуществления цитотоксическое средство, которое конъюгировано с антителом к FGFR2, представляет собой майтанзиноид, такой как DM1 или DM4, производное томаймицина или производное доластатина. В соответствии с определенными вариантами осуществления цитотоксическое средство, которое конъюгировано с антителом к FGFR2, представляет собой ауристин, такой как MMAE, MMAF или его производные. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой Dxd или его производное. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой AZ13599185 (см., например, Li *et. al.*, 2016 *Cancer Cell* 29, 117—129). Другие цитотоксические средства, известные из уровня техники, рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения, включая, например, белковые токсины, такие как ризин, токсин *C. difficile*, экзотоксин бактерии рода *Pseudomonas*, ризин, дифтерийный токсин, ботулинический токсин, бриодин, сапорин, токсины фитолакки (т. е. фитолаккатоксин и фитолакцигенин) и другие, например, представленные в Sapra *et al.*, *Pharmacol. & Therapeutics*, 2013, 138:452—469. В некоторых вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой тубулизин, майтанзиноид или камптотецин или их аналог.

[0138] В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой тубулизин. Подходящие тубулизины включают описанные в

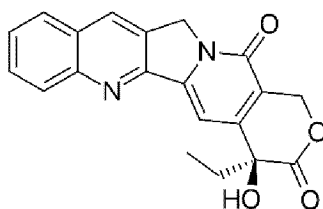
заявке на патент США № 16/724164, поданной 20 декабря 2019 г. В некоторых вариантах осуществления тубулизин представляет собой соединение IVa, IVa', IVb, IVc, IVd, IVe, IVf, IVg, IVh, IVj, IVk, IV-l, IVm, IVn, IVo, IVp, IVq, IVr, IVs, IVt, IVu, IVvA, IVvB, IVw, IVx, IVy, Va, Va', Vb, Vc, Vd, Ve, Vf, Vg, Vh, Vi, Vj, Vk, Via, Vlb, VIc, VIId, VIe, VIf, VIg, VIh, VI, VIi, VII, VIII, IX, X, D-5a или D-5c из заявки на патент США № 16/724164, поданной 20 декабря 2019 г. В определенных вариантах осуществления тубулизин представляет собой соединение Ve в заявке на патент США № 16/724164, поданной 20 декабря 2019 г. В некоторых вариантах осуществления тубулизин характеризуется следующей структурой:



Тубулизин 1А

[0139] Тубулизин 1А можно получить с применением способов, раскрытых в US 16/724164, поданной 20 декабря 2019 г.

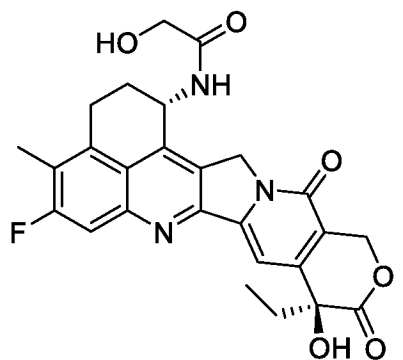
[0140] В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению представляет собой камптотецин. В определенных вариантах осуществления полезные нагрузки по настоящему изобретению представляют собой аналоги и/или производные камптотецина.



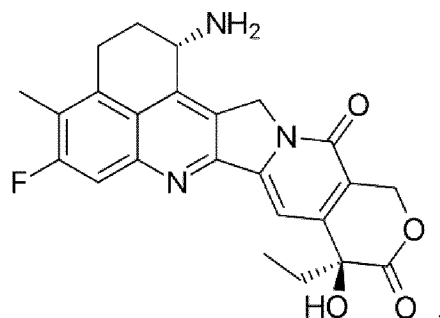
Камптотецин

[0141] В некоторых вариантах осуществления подходящий аналог камптотецина представляет собой топотекан, иринотекан, белотекан или деррукстекан (Dxd).

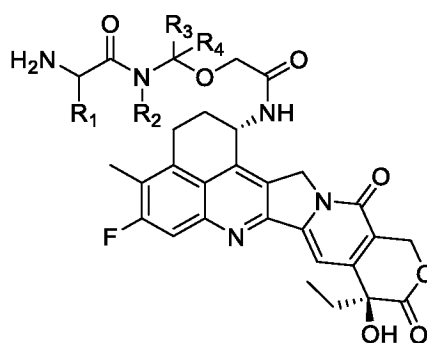
[0142] В одном варианте осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению представляет собой дерукстефан (Dxd):



[0143] В другом варианте осуществления полезная нагрузка представляет собой экзатекан:



[0144] В определенных вариантах осуществления полезная нагрузка по настоящему изобретению представляет собой аналог камптотецина, характеризующийся структурой P-I:

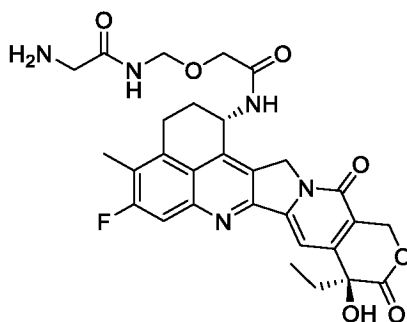


(P-I),

где R_1 , R_2 и R_3 и R_4 независимо представляют собой водород или алкил, например, C_1 - C_{12} алкил, или C_1 - C_8 алкил, или C_1 - C_6 алкил, или C_1 - C_4 алкил, или где R_2 и R_3 вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо,

или его фармацевтически приемлемую соль.

[0145] В одном варианте осуществления R_1 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R_2 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R_2 представляет собой C_1 - C_4 алкил. В одном варианте осуществления R_3 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R_3 представляет собой C_1 - C_4 алкил. В одном варианте осуществления R_4 представляет собой водород. В одном варианте осуществления R_4 представляет собой C_1 - C_4 алкил. В одном варианте осуществления R_1 , R_2 и R_3 и R_4 в каждом случае представляют собой водород. В одном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению представляет собой P-IA:



(P-IA),

или его фармацевтически приемлемую соль. В некоторых вариантах осуществления P-IA подвергают превращению в dxd. В некоторых аспектах P-IA подвергают превращению в dxd *in vivo*. В некоторых аспектах ADC доставляет полезную нагрузку в ткань, экспрессирующую FGFR2b, такую как опухоль, экспрессирующая FGFR2b, и в некоторых аспектах P-IA подвергают превращению в dxd в локальной среде. В некоторых аспектах ADC содержит P-1A, и ADC подвергают превращению в dxd в локальной среде.

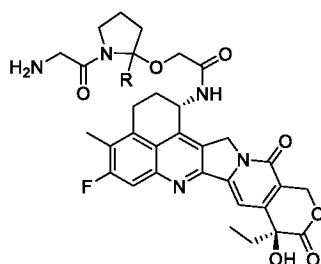
[0146] В одном варианте осуществления R_2 и R_3 вместе образуют 5-членное кольцо. В одном варианте осуществления R_2 и R_3 вместе представляют собой $-(CH_2)_3-$.

[0147] В одном варианте осуществления R_2 и R_3 вместе образуют 6-членное кольцо. В одном варианте осуществления R_2 и R_3 вместе представляют собой $-(CH_2)_4-$.

[0148] В одном варианте осуществления R_1 представляет собой водород, и R_2

и R₃ вместе образуют 5-членное кольцо.

[0149] В одном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению характеризуется структурой согласно формуле (P-II):

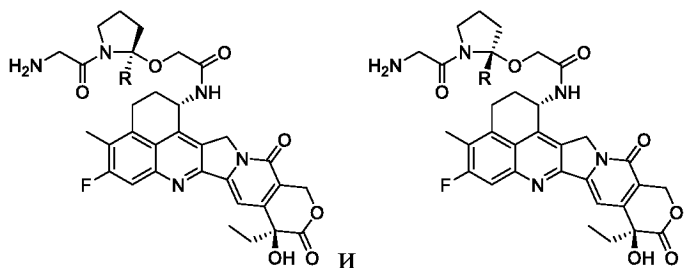


(P-II),

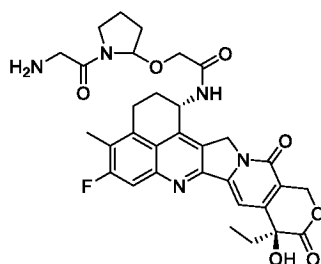
где R представляет собой водород или алкил, например, C₁-C₁₂алкил, или C₁-C₈алкил, или C₁-C₆алкил, или C₁-C₄алкил,

или его фармацевтически приемлемой соли.

[0150] Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что соединение P-II, изображенное выше, также включает все изомерные (например, энантиомерные, диастереомерные и геометрические (или конформационные)) формы структуры. Например, R- и S-конфигурации для каждого асимметричного центра входят в объем настоящего изобретения. В качестве примера два изомера, изображенные ниже, входят в объем настоящего изобретения:

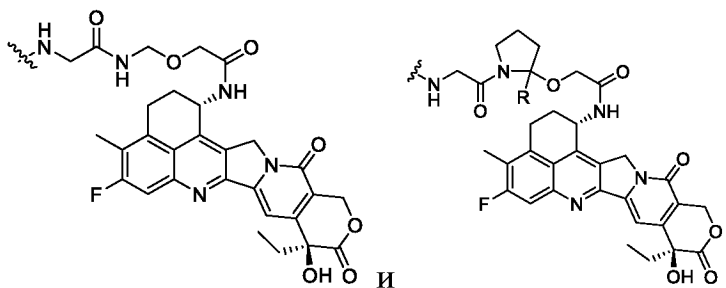


[0151] В одном варианте осуществления соединение по настоящему изобретению представляет собой



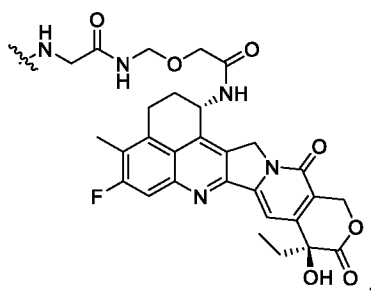
или его фармацевтически приемлемую соль.

[0152] В одном варианте осуществления полезная нагрузка в соответствии с настоящим изобретением конъюгирована с образованием конъюгата белок-лекарственное средство (например, конъюгата антитело к FGFR2-лекарственное средство). В одном варианте осуществления полезная нагрузка ковалентно присоединена к фрагменту М. В одном варианте осуществления полезная нагрузка представляет собой М-Dxd. В одном варианте осуществления М-Dxd характеризуется структурой, выбранной из группы, состоящей из



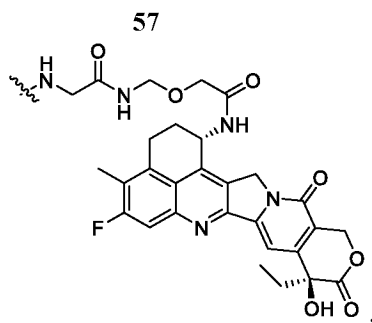
где R представляет собой водород или C₁-C₄алкил, и где ~~~ представляет собой точку присоединения к L2.

[0153] В одном варианте осуществления полезная нагрузка в соответствии с настоящим изобретением представляет собой:



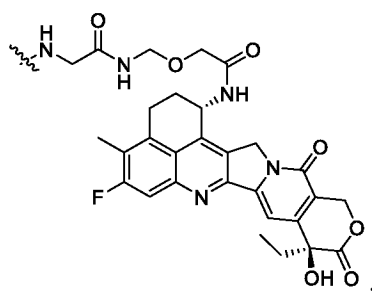
где ~~~ представляет собой точку присоединения к линкеру.

[0154] В данном документе предусмотрено антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные посредством линкера с полезной нагрузкой, характеризующейся следующей структурой:



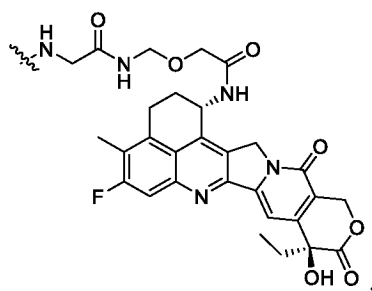
где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, содержащихся в паре аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/28 и 40/44.

[0155] В данном документе предусмотрено антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные посредством линкера с полезной нагрузкой, характеризующейся следующей структурой:



где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит набор аминокислотных последовательностей HCDR1-HCDR2-HCDR3-LCDR1-LCDR2-LCDR3, выбранный из группы, состоящей из SEQ ID NO: 4-6-8-12-14-16, 24-6-26-30-32-34 и 24-6-42-46-32-34.

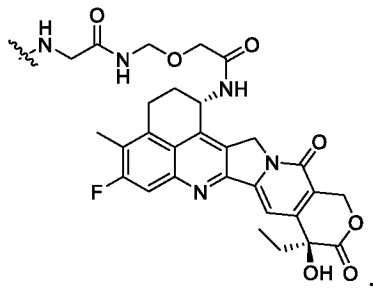
[0156] В данном документе предусмотрено антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные посредством линкера с полезной нагрузкой, характеризующейся следующей структурой:



где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит пару

аминокислотных последовательностей HCVR/LCVR, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 2/10, 22/28 и 40/44.

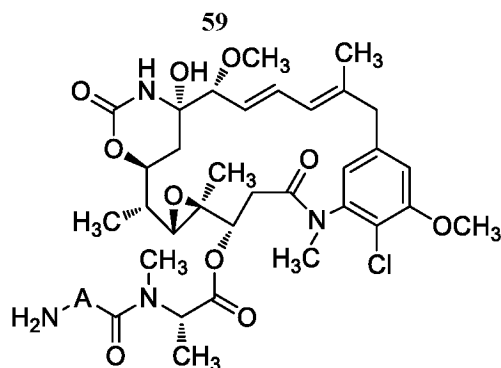
[0157] В данном документе предусмотрено антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные посредством линкера с полезной нагрузкой, характеризующейся следующей структурой:



где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность тяжелой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18, 36, 49, 52, SEQ ID NO: 53 и SEQ ID NO: 54. В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат пару аминокислотных последовательностей тяжелой цепи/легкой цепи, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 18/20, 36/38, 49/51, 52/20, 53/38 и 54/51.

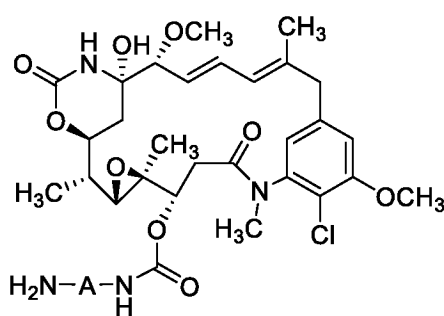
[0158] В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, например, производное майтанзина. Подходящие майтанзиноиды включают DM1, DM4 или их производные, стереоизомеры или изотопологи. Подходящие майтанзиноиды также включают без ограничения майтанзиноиды, раскрытые в WO 2014/145090A1, WO 2015/031396A1, US 2016/0375147A1, US 10570151 (например, соединение 6 в данной заявке) и US 2017/0209591A1, включенных в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой DM1.

[0159] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид характеризуется следующей структурой:



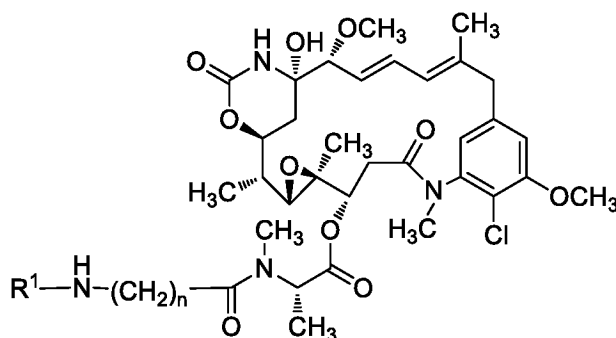
где А представляет собой необязательно замещенный арилен или гетероарилен.

[0160] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид характеризуется следующей структурой:



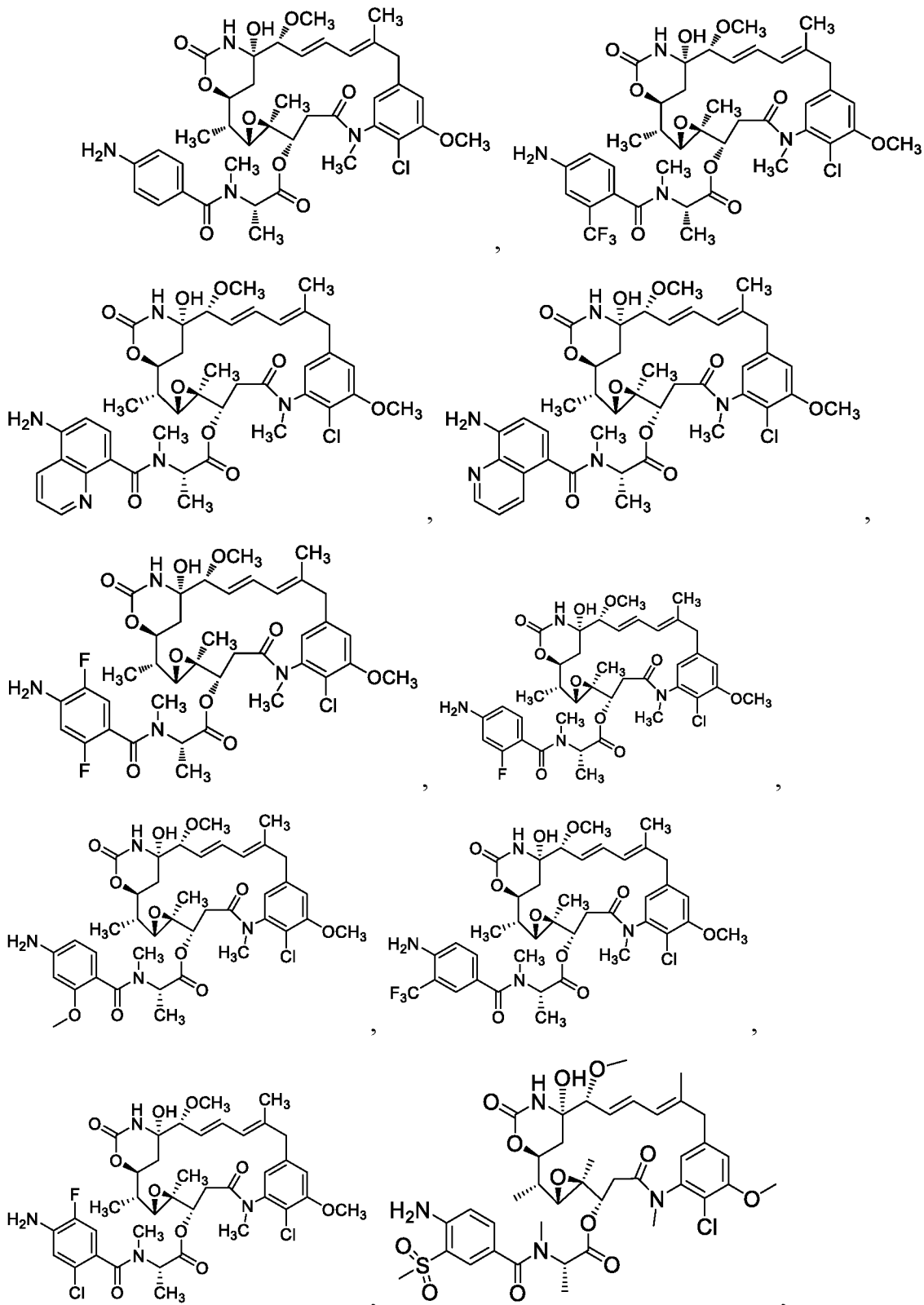
где А представляет собой необязательно замещенный арилен или гетероарилен.

[0161] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид характеризуется следующей структурой:

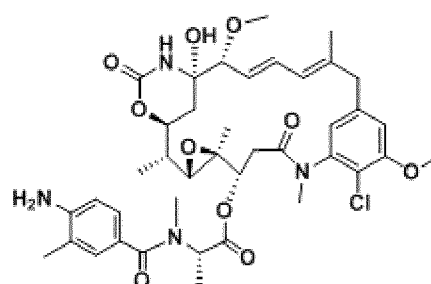
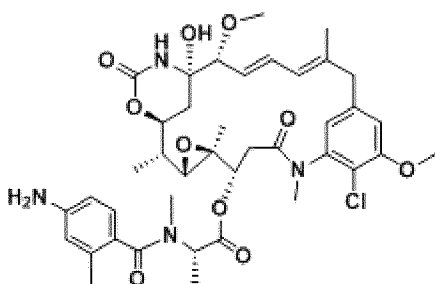
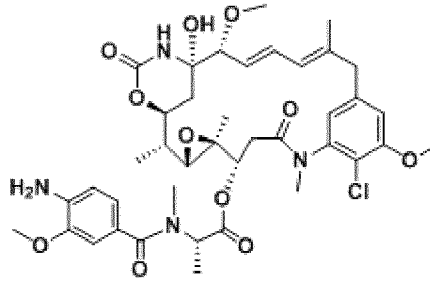
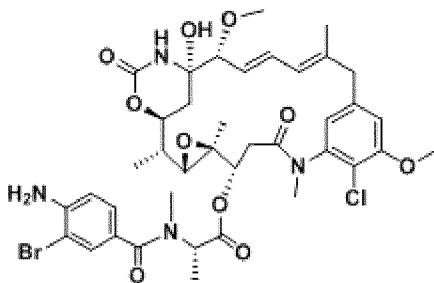
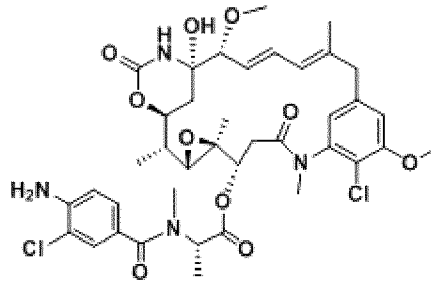
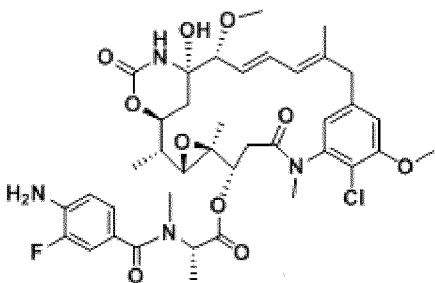
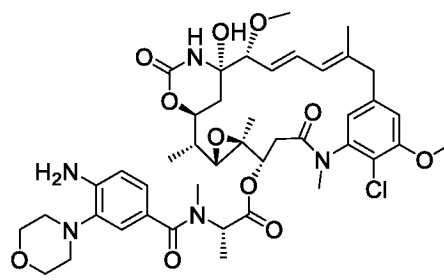
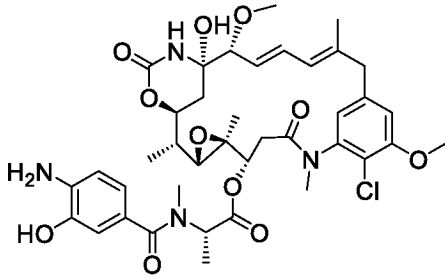
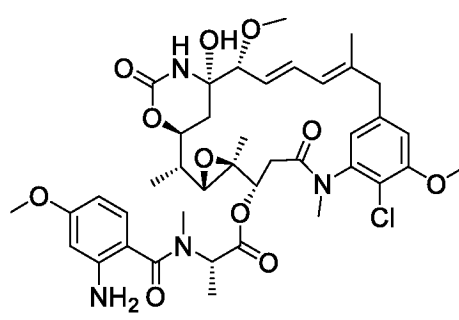
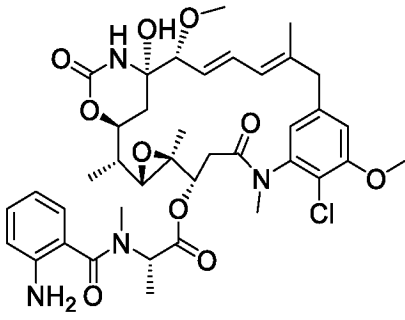


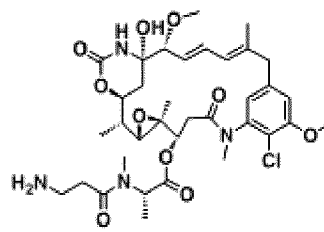
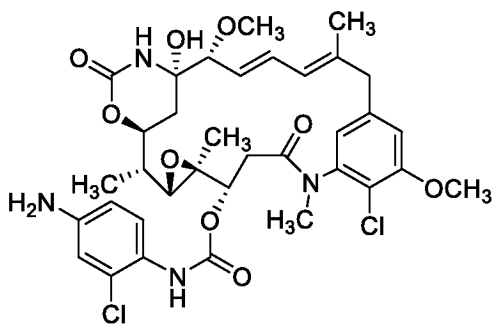
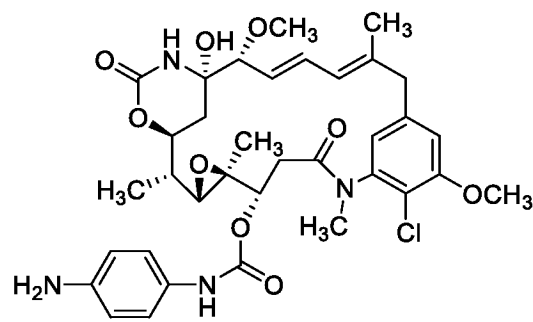
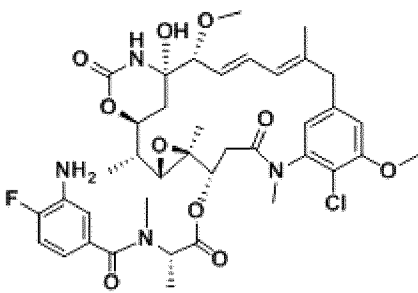
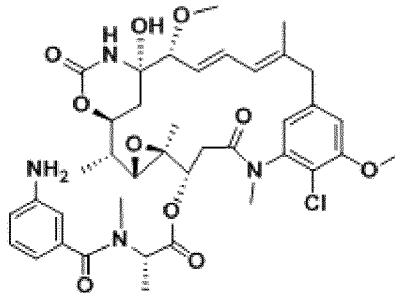
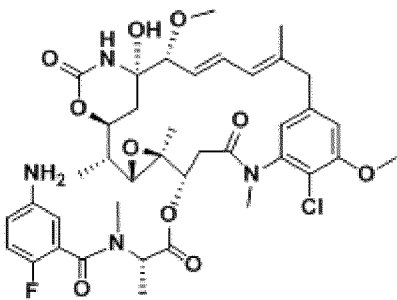
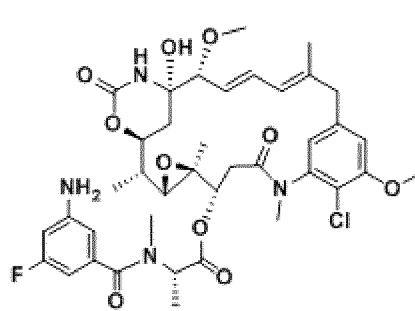
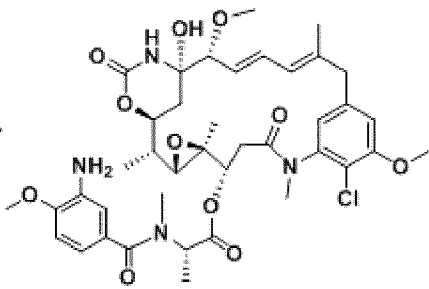
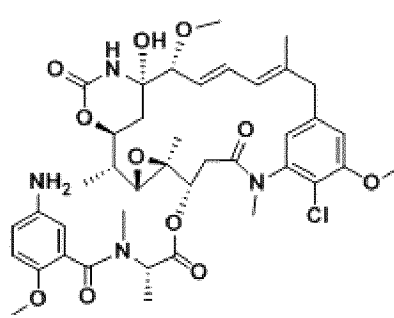
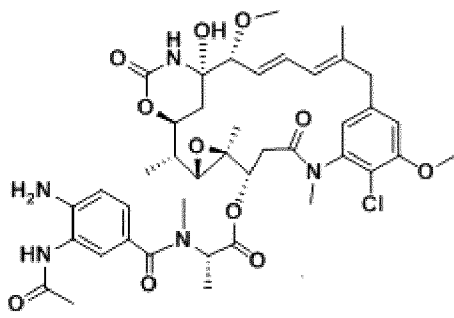
где n представляет собой целое число от 1 до 12, и R¹ представляет собой алкил.

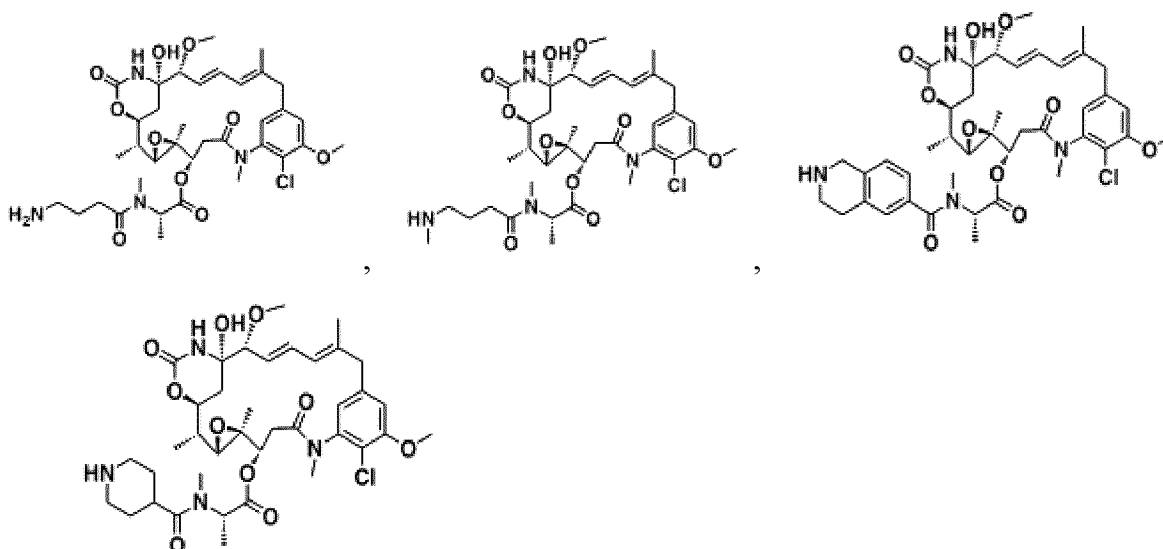
[0162] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой:



61

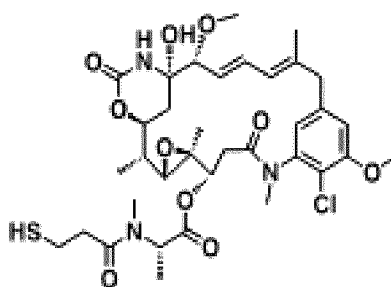




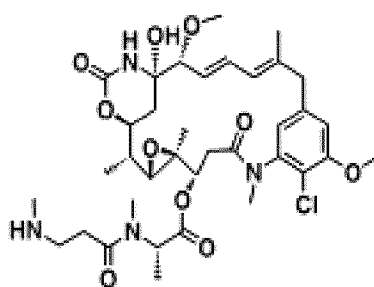


или

[0163] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой:

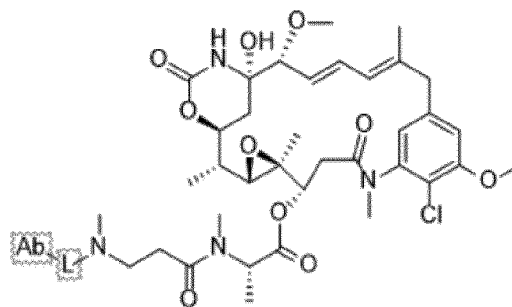


[0164] В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой соединение, характеризующееся формулой майтанзиноида 1А:



Майтанзиноид 1А.

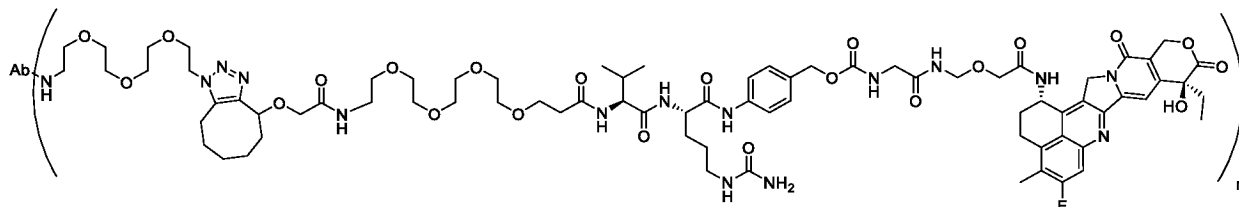
[0165] В данном документе также предусмотрен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с майтанзиноидом 1А, где конъюгат антитело-лекарственное средство характеризуется следующей структурой:



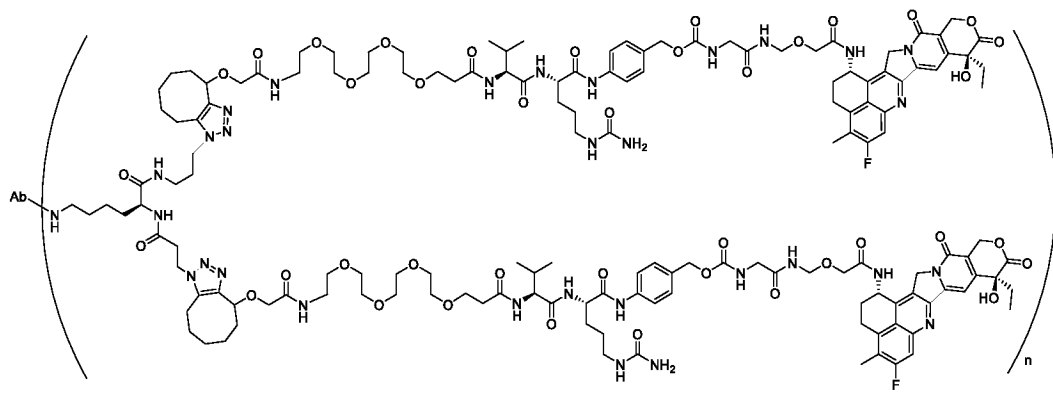
где Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, и L представляет собой линкер. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной

последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

[0167] В данном документе также предусмотрен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с аналогом камптотецина, где конъюгат антитело-лекарственное средство характеризуется следующей структурой:



ИЛИ



где Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, и n равняется 2 или 4. В конкретных вариантах осуществления n равняется 2. В конкретных вариантах осуществления n равняется 4. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах

осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. n представляет собой значение от 2 до 12, например, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 или 12.

[0168] В данном документе также предусмотрены конъюгаты антитело-радионуклид (ARC), содержащие антитела к FGFR2, конъюгированные с одним или более радионуклидами. Иллюстративные радионуклиды, которые можно применять в контексте данного аспекта настоящего изобретения, включают без ограничения, например, ^{225}Ac , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{131}I , ^{186}Re , ^{227}Th , ^{222}Rn , ^{223}Ra , ^{224}Ra и ^{90}Y .

[0169] В определенных вариантах осуществления, предусмотренных в данном документе, предусмотрены ADC, содержащие антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, конъюгированные с цитотоксическим средством (например, любым из цитотоксических средств, раскрытых выше) посредством линкера. Линкеры представляют собой любую группу или фрагмент, которые сшивают, соединяют или связывают антитело или антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, с терапевтическим фрагментом, например, цитотоксическим средством. Подходящие линкеры можно найти, например, в *Antibody-Drug Conjugates and Immunotoxins*; Phillips, G. L., Ed.; Springer Verlag: New York, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Ducry, L., Ed.; Humana Press, 2013; *Antibody-Drug Conjugates*; Wang, J., Shen, W.-C., and Zaro, J. L., Eds.; Springer International Publishing, 2015, содержание каждого из которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В целом, подходящими линкерами связывающих средств для конъюгатов на основе антител, описанных в данном документе, являются линкеры, которые достаточно стабильны для применения

периода полужизни антитела в кровотоке и в то же время способны высвобождать свою полезную нагрузку при связывании антигена и/или опосредованной антигеном интернализации конъюгата. Линкеры могут быть расщепляемыми или нерасщепляемыми. Расщепляемые линкеры включают линкеры, которые расщепляются посредством внутриклеточного метаболизма после интернализации, например, расщепляются посредством гидролиза, восстановления или ферментативной реакции. Нерасщепляемые линкеры включают линкеры, которые высвобождают присоединенную полезную нагрузку посредством лизосомной деградации антитела после интернализации. Подходящие линкеры включают без ограничения кислотонеустойчивые линкеры, неустойчивые к гидролизу линкеры, ферментативно расщепляемые линкеры, неустойчивые к восстановлению линкеры, саморасщепляющиеся линкеры и нерасщепляемые линкеры. Подходящие линкеры также включают без ограничения линкеры, которые представляют собой пептиды, глюкурониды, тиоэферы сукцинимиды, звенья полиэтиленгликоля (PEG), гидразоны, звенья малкапроила, дипептидные звенья, звенья валин-цитруллин и звенья парааминобензила (PAB), или содержат их. В некоторых аспектах линкер содержит одну или более PEG-групп.

[0170] Любую линкерную молекулу или линкерную технологию, известную из уровня техники, можно использовать для получения или конструирования ADC по настоящему изобретению. В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой расщепляемый линкер, например, линкер, расщепляемый катепсином В. В соответствии с другими вариантами осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер. Иллюстративные линкеры, которые можно использовать в контексте настоящего изобретения, включают линкеры, которые содержат, например, MC (6-малеимидокапроил), MP (малеимидопропаноил), val-cit (валин-цитруллин), val-ala (валин-аланин), дипептидный сайт в расщепляемом протеазой линкере, ala-phe (аланин-фенилаланин), дипептидный сайт в расщепляемом протеазой линкере, PAB (п-аминобензилоксикарбонил), SPP (N-сукцинимидил-4-(2-пиридилтио)пентаноат), SMCC (N-сукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат), SIAB (N-сукцинимидил-(4-йодацетил)аминобензоат) и их варианты и комбинации, или состоят из них. Дополнительные примеры линкеров, которые можно использовать в контексте

настоящего изобретения, предусмотрены, например, в US 7754681 и в *Discy, Bioconjugate Chem.*, 2010, 21:5—13, и ссылках, цитируемых в них, содержание которых включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

[0171] В определенных вариантах осуществления линкеры являются стабильными в физиологических условиях. В определенных вариантах осуществления линкеры являются расщепляемыми, например, способными высвободить по меньшей мере часть полезной нагрузки в присутствии фермента или при определенном диапазоне или значении pH. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый ферментом фрагмент. Иллюстративные расщепляемые ферментом фрагменты включают без ограничения пептидные связи, сложноэфирные связи, гидразоны и дисульфидные связи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит расщепляемый катепсином линкер.

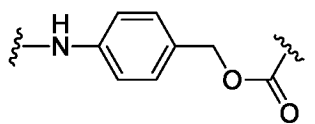
[0172] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит нерасщепляемый фрагмент.

[0173] Подходящие линкеры также включают без ограничения линкеры, которые химически связаны с двумя остатками цистеина одного связывающего средства, например, антитела. Такие линкеры могут служить для имитации дисульфидных связей антитела, которые разрушаются в результате процесса конъюгации.

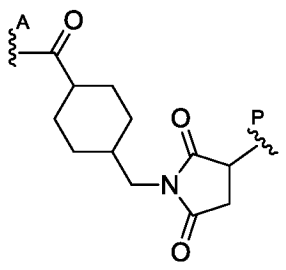
[0174] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит одну или более аминокислот. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит две аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит три аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит четыре аминокислоты. Подходящие аминокислоты включают природные, неприродные, стандартные, нестандартные, протеиногенные, непротеиногенные и L- или D-аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аланин, валин, глицин, лейцин, изолейцин, метионин, триптофан, фенилаланин, пролин, серин, треонин, цистеин, тирозин, аспарагин, глутамин, аспарагиновую кислоту, глутаминовую кислоту, лизин, аргинин, гистидин или цитруллин, их производное или их комбинацию. В определенных вариантах осуществления одна или более боковых

цепей аминокислот связаны с группой боковой цепи, описанной ниже. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит лизин, валин и цитруллин. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит лизин, валин и аланин. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит валин и аланин. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит дипептид, трипептид или тетрапептид. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит пептид, где пептид представляет собой валин-цитруллин (val-cit или VC), глутаминовая кислота-валин-цитруллин (EVC), глицин-глицин-фенилаланин (GGF) или глицин-глицин-фенилаланин-глицин (GGFG).

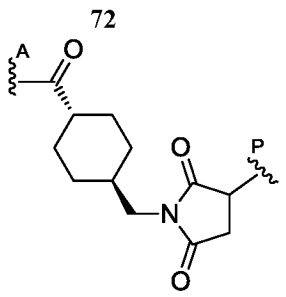
[0175] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит саморасщепляющуюся группу. Саморасщепляющаяся группа может представлять собой любую такую группу, известную специалистам в данной области техники. В конкретных вариантах осуществления саморасщепляющаяся группа представляет собой *n*-аминобензил (PAB) или его производное. Применимые производные включают *n*-аминобензилоксикарбонил (PABC). В некоторых вариантах осуществления линкер содержит фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



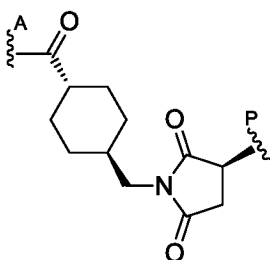
[0176] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



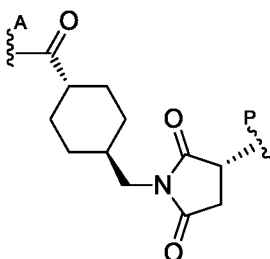
где ξ^A представляет собой связь с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством остатка лизина), и ξ^P представляет собой связь с цитотоксическим средством (например, DM1). В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



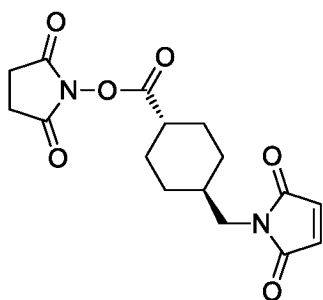
где ξ^A представляет собой связь с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством остатка лизина), и ξ^P представляет собой связь с цитотоксическим средством (например, DM1). В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой:



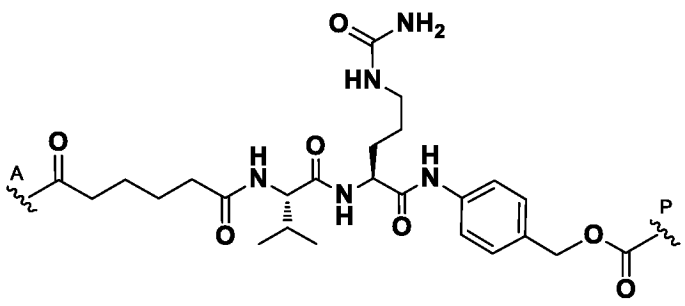
[0177] В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой:



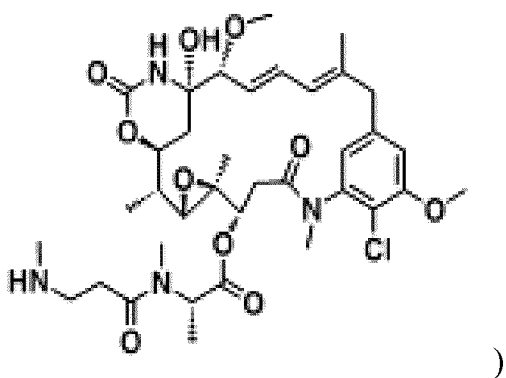
[0178] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой производное малеимидилметил-4-транс-циклогексанкарбокисукцината:



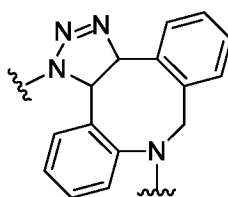
[0179] В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой:



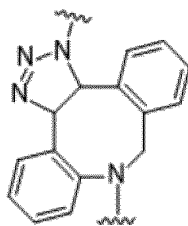
где ξ^A представляет собой связь с антителом или антигенсвязывающим белком (например, посредством остатка лизина), и ξ^P представляет собой связь с цитотоксическим средством (например, соединением, характеризующимся следующей формулой:



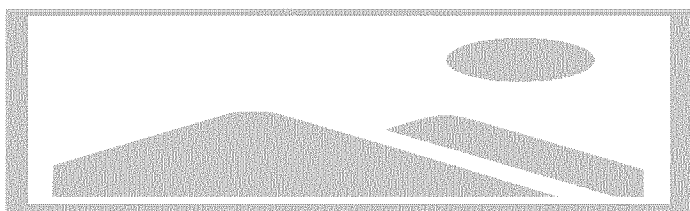
[0180] Подходящие линкеры также включают без ограничения линкеры, которые содержат один или более циклических фрагментов. В некоторых вариантах осуществления циклический фрагмент получают в результате реакции циклоприсоединения. В определенных вариантах осуществления циклический фрагмент получают в результате реакции 1-3-циклоприсоединения между азидом и алкином, например, циклоалкином. В некоторых вариантах осуществления циклический фрагмент представляет собой



или его региоизомер циклоприсоединения:




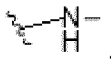
[0181] Используемые в данном документе термины «региоизомер», «региоизомеры» или «смесь региоизомеров» относятся к продукту(продуктам) реакций 1,3-циклоприсоединения или алкин-азидного циклоприсоединения, промотируемого напряжением (SPAAC), иначе известных как клик-реакции, который(которые) получают из подходящих азидов (например, антител, дериватизированных с помощью $-N_3$ или $-PEG-N_3$), обработанных подходящими алкинами. В определенных вариантах осуществления, например, региоизомеры и смеси региоизомеров характеризуются продуктами клик-реакции, показанными ниже:



[0182] В определенных вариантах осуществления более одного подходящего азиды и более одного подходящего алкина можно использовать в рамках схемы синтеза на пути к продукту, где каждая пара азид-алкин может участвовать в одной или нескольких независимых клик-реакциях с образованием смеси региоизомерных продуктов клик-реакции. Например, специалисту в данной области техники будет понятно, что первый подходящий азид может независимо вступать в реакцию с первым подходящим алкином, и второй подходящий азид может независимо вступать в реакцию со вторым подходящим алкином на пути к продукту, что приводит к образованию четырех возможных региоизомеров клик-реакции или смеси четырех возможных региоизомеров клик-реакции.

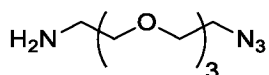
[0183] В определенных вариантах осуществления такие реакции циклоприсоединения облегчают конъюгацию антитела, функционализированного одной или более азидогруппами, с полезной нагрузкой, содержащей линкерный фрагмент, содержащий алкин. В некоторых вариантах осуществления описанные в

данном документе антитела к FGFR2 функционализованы одной или более азидогруппами. Если антитела специфически функционализованы азидогруппами при определенных аминокислотных остатках, например, Q295, то такие антитела можно сайт-специфически конъюгировать с полезными нагрузками, содержащими линкерные фрагменты, содержащие алкин, который способен вступать в реакцию циклоприсоединения с указанными азидогруппами. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 функционализовано по Q295 путем реакции указанного антитела с соединением на основе первичного амина, содержащим азидогруппу, и транsgлутаминазой. Антитела, которые конъюгируют посредством остатков глутамина, связывают посредством фрагмента $-\text{CONH}-$, например, который образуется в результате реакции остатка глутамина с соединением на основе первичного амина. Связь, соединяющая линкер-полезную нагрузку с таким конъюгированным остатком глутамина, изображена в данном документе в некоторых

вариантах осуществления как  или , при этом обе связи представляют собой полученный фрагмент $-\text{C}(\text{O})\text{NH}-$, который связывает антитело с линкер-полезными нагрузками, описанными в данном документе. В некоторых вариантах осуществления соединение на основе первичного амина, содержащее азидогруппу, содержит PEG-группу. В определенных вариантах осуществления указанное соединение на основе первичного амина представляет собой:



где n равняется 1—12. В определенных вариантах осуществления указанное соединение на основе первичного амина представляет собой:



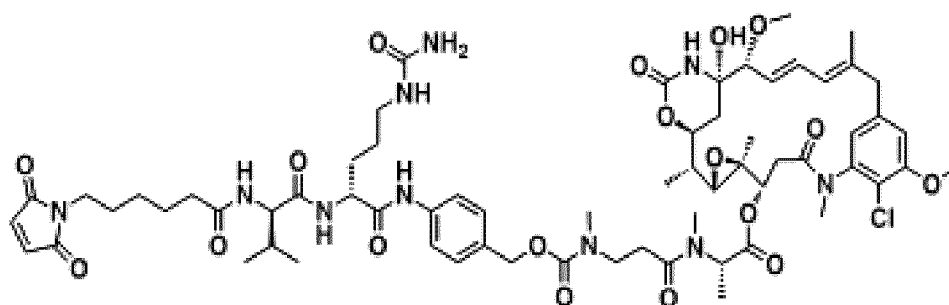
[0184] В некоторых вариантах осуществления линкер содержит один или более спейсеров. Подходящие спейсеры включают фрагменты, которые связывают, например, ковалентно или посредством ионного взаимодействия, две части линкера, часть линкера с полезной нагрузкой или часть линкера с антителом. В определенных

вариантах осуществления спейсер представляет собой PEG-группу.

[0185] Настоящее изобретение включает ADC, в которых линкер соединяет антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент с лекарственным средством или цитотоксином посредством присоединения к конкретной аминокислоте в антителе или антигенсвязывающей молекуле. Иллюстративные присоединения аминокислот, которые можно использовать в контексте данного аспекта, включают, например, лизин (см., например, US 5208020; US 2010/0129314; Hollander *et al.*, *Bioconjugate Chem.*, 2008, 19:358—361; WO 2005/089808; US 5714586; US 2013/0101546 и US 2012/0585592), цистеин (см., например, US 2007/0258987; WO 2013/055993; WO 2013/055990; WO 2013/053873; WO 2013/053872; WO 2011/130598; US 2013/0101546 и US 7750116), селеноцистеин (см., например, WO 2008/122039 и Hofer *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2008, 105:12451—12456), формилглицин (см., например, Carrico *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2007, 3:321—322; Agarwal *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 2013, 110:46—51, и Rabuka *et al.*, *Nat. Protocols*, 2012, 10:1052—1067), неприродные аминокислоты (см., например, WO 2013/068874 и WO 2012/166559) и кислые аминокислоты (см., например, WO 2012/05982). Линкеры также могут быть конъюгированы с антигенсвязывающим белком посредством присоединения к углеводам (см., например, US 2008/0305497, WO 2014/065661 и Ryan *et al.*, *Food & Agriculture Immunol.*, 2001, 13:127—130) и посредством дисульфидных линкеров (см., например, WO 2013/085925, WO 2010/010324, WO 2011/018611 и Shaunak *et al.*, *Nat. Chem. Biol.*, 2006, 2:312—313). Методики сайт-специфической конъюгации также можно использовать для непосредственной конъюгации с конкретными остатками антитела или антигенсвязывающего белка (см., например, Schumacher *et al.* *J Clin Immunol* (2016) 36(Suppl 1): 100). Методики сайт-специфической конъюгации включают без ограничения конъюгацию с глутамином с помощью трансглутаминазы (см., например, Schibli, *Angew Chemie Inter Ed.* 2010, 49, 9995).

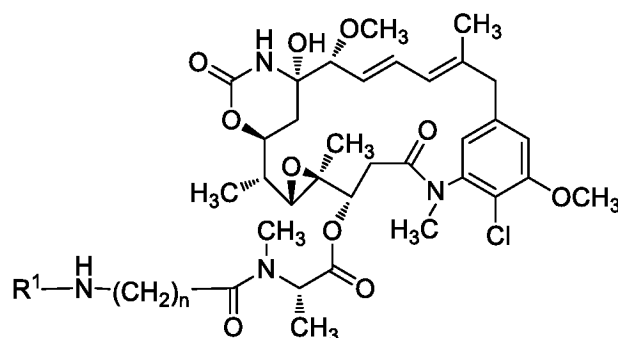
[0186] В соответствии с определенными вариантами осуществления настоящее изобретение предусматривает ADC, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанный в данном документе, конъюгируют с композицией линкер-лекарственное средство, представленной в международной патентной публикации WO2014/145090, (например, соединение «7», раскрытое в ней), раскрытие которой настоящим включено в данный документ посредством

ССЫЛКИ ВО ВСЕЙ СВОЕЙ ПОЛНОТЕ:

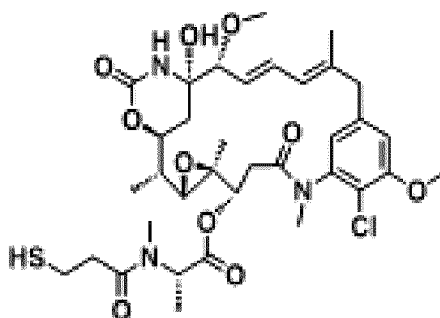


7

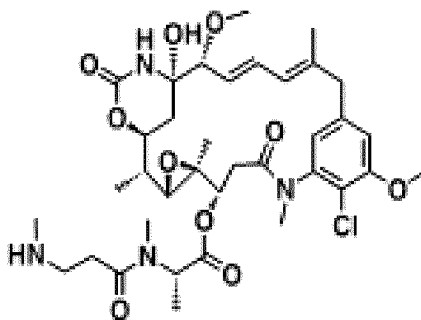
[0187] В данном документе также предусмотрены конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие раскрытые в данном документе антитела к FGFR2, где указанное антитело конъюгировано с цитотоксическим средством. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой соединение, характеризующееся следующей формулой:



где n представляет собой целое число от 1 до 12, и R^1 представляет собой алкил. В определенных вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой



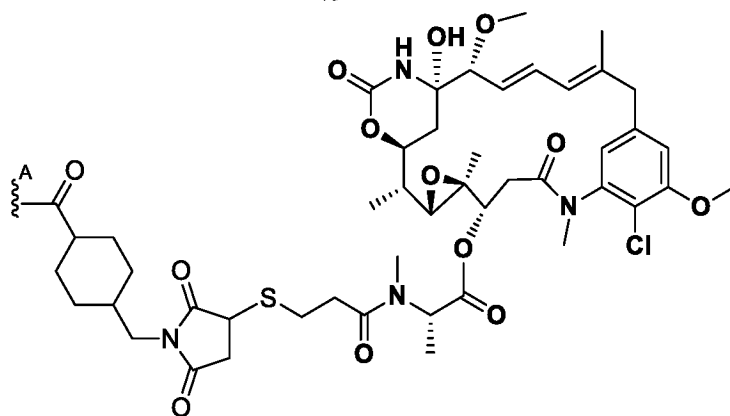
В некоторых вариантах осуществления майтанзиноид представляет собой майтанзиноид 1A:



Майтанзиноид 1А.

В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и майтанзиноид ковалентно присоединен к антителу посредством нерасщепляемого линкера. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и майтанзиноид ковалентно присоединен к антителу к FGFR2 или его антигенсвязывающему фрагменту посредством расщепляемого линкера.

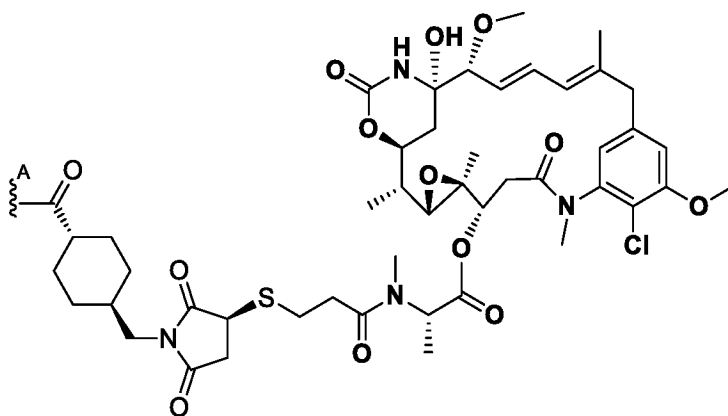
[0188] Иллюстративным расщепляемым линкером является линкер, расщепляемый катепсином В. В определенных вариантах осуществления цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид, и майтанзиноид ковалентно присоединен к антителу к FGFR2 или его антигенсвязывающему фрагменту посредством линкера, расщепляемого катепсином В. В одном варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с майтанзиноидом посредством расщепляемого линкера, где линкер содержит дипептид. В другом варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с майтанзиноидом посредством расщепляемого линкера, где линкер содержит дипептид валин-цитруллин. В другом варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с майтанзиноидом посредством расщепляемого линкера, где линкер содержит дипептид валин-цитруллин и PAB-группу. В одном варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



где $\overset{A}{\sim}$ представляет собой связь с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

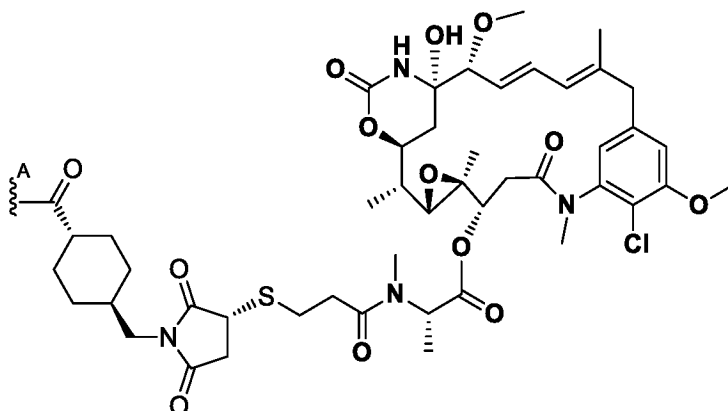
[0189] В одном варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



где ξ^A представляет собой связь с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах

осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

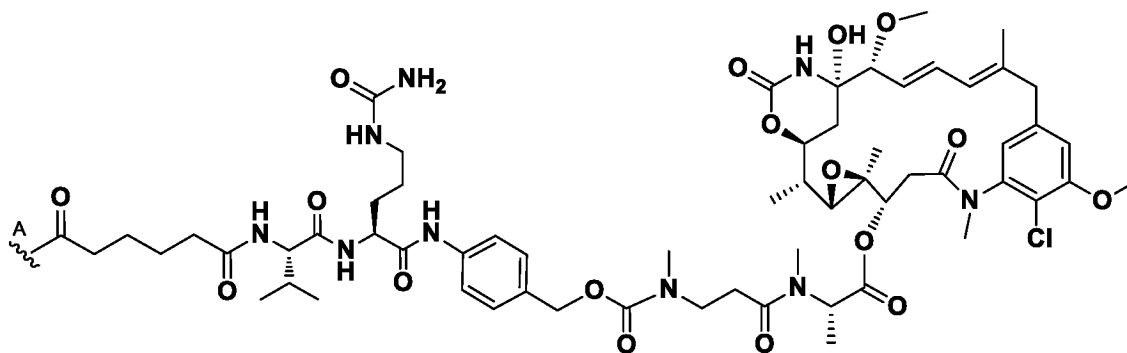
[0190] В одном варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



где ξ^A представляет собой связь с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную

последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

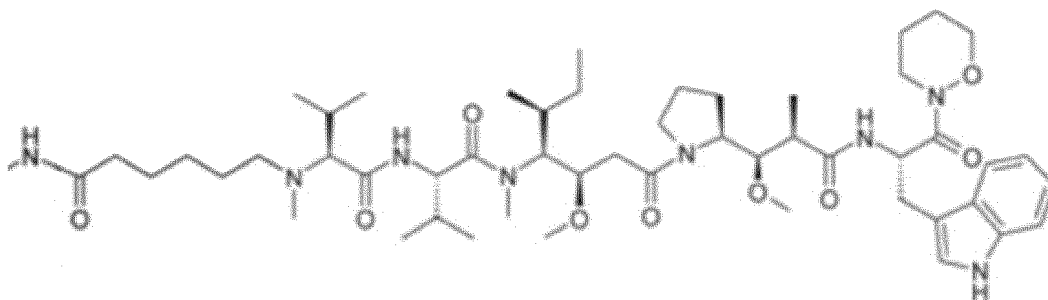
[0191] В одном варианте осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



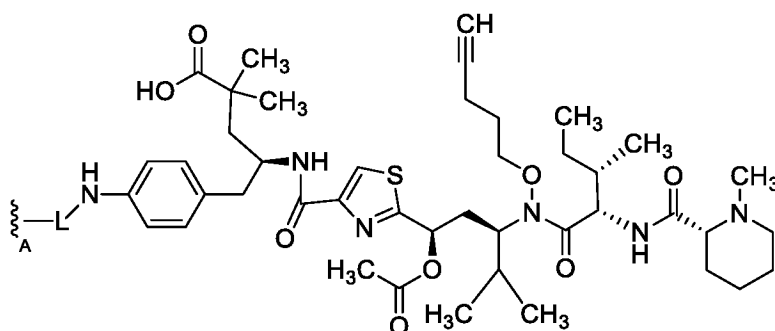
где ξ^A представляет собой связь с антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную

последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

[0192] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с BAY1187982; см. Sommer et al., 2016, *Cancer Res*, 76 (21), 6631—6639, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0180. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с



[0193] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:

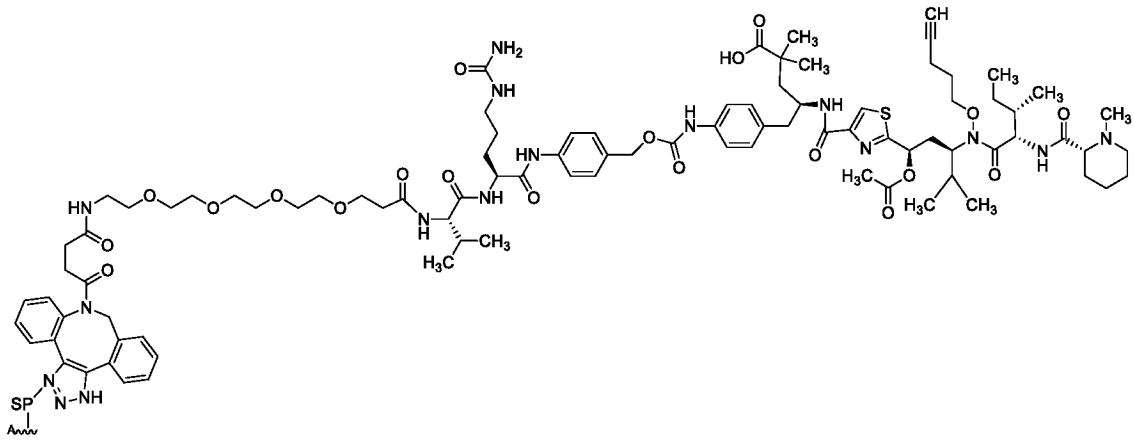


где L представляет собой линкер, и ξ^A представляет собой связь с антителом.

В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную

последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

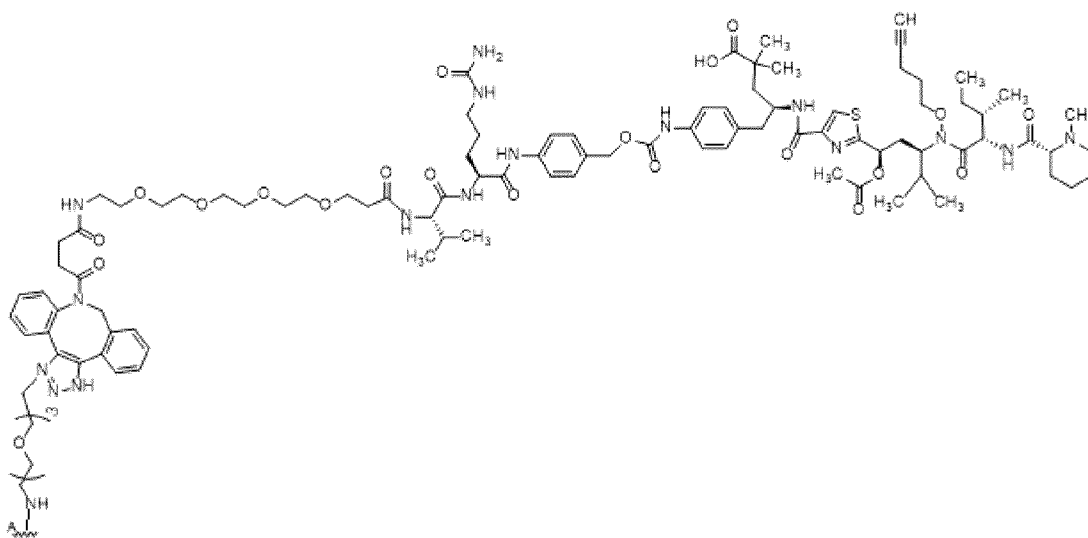
[0194] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



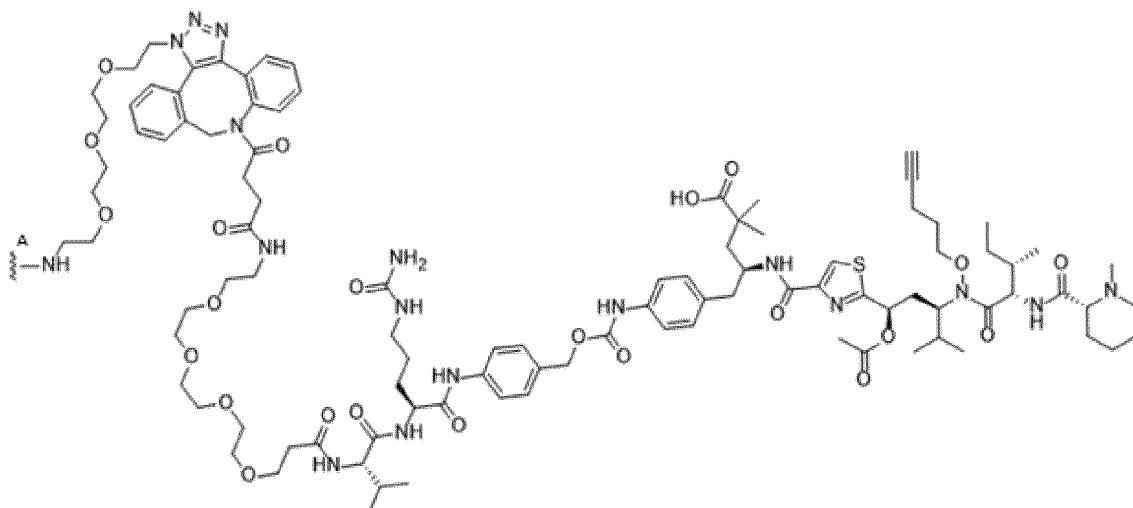
или его региоизомером циклоприсоединения, где SP представляет собой спейсер, и ξ^A представляет собой связь с антителом. В некоторых вариантах осуществления ξ^A представляет собой связь с остатком глутамина антитела. В конкретных вариантах осуществления остаток глутамина представляет собой Q295. В некоторых вариантах осуществления антитело конъюгировано по Q295 и Q297. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной

последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

[0195] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



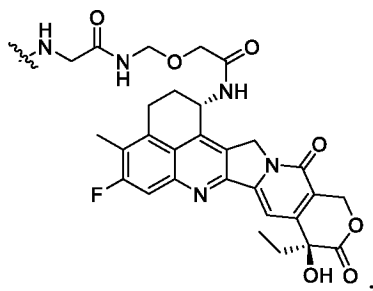
или его региоизомером циклоприсоединения:



где ξ^A представляет собой связь с остатком глутамина антитела. В определенных вариантах осуществления глутамин представляет собой глутамин Q295 тяжелой цепи. В определенных вариантах осуществления антитело к FGFR2 содержит тяжелую цепь, содержащую Q295 и Q297, где указанный Q297 получен в результате мутации N297Q. В некоторых аспектах антитело к FGFR2 содержит тяжелую цепь (HC), выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 52, 53 и 54. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его

антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

[0196] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы посредством линкера с:



где \sim представляет собой точку присоединения к линкеру. В некоторых вариантах осуществления линкер присоединен к одному или более остаткам глутамина антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах

осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

[0197] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где:

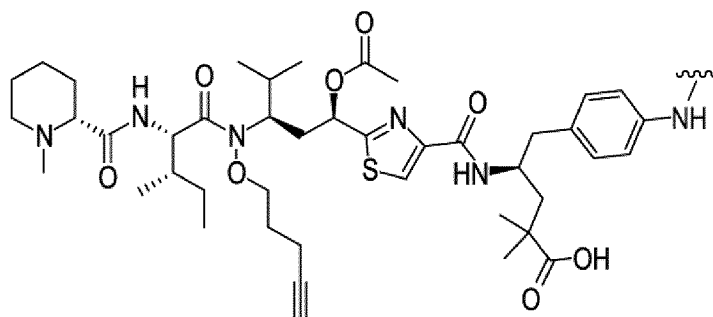
Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе;

L представляет собой линкер;

Рау представляет собой цитотоксическое средство, и

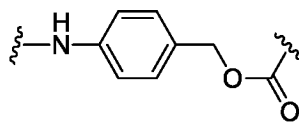
n представляет собой целое число от 1 до 12.

[0198] В некоторых вариантах осуществления n равняется 2. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4. В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой:



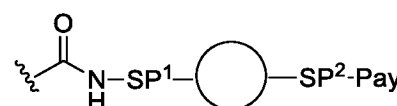
(Тубулизин 1a).

[0199] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления L содержит пептид. В некоторых вариантах осуществления L содержит val-cit. В некоторых вариантах



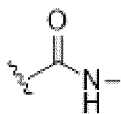
осуществления L содержит осуществлению L содержит PEG-группу.

[0200] В некоторых вариантах осуществления L содержит циклический фрагмент. В определенных вариантах осуществления циклический фрагмент представляет собой продукт 1,3-циклоприсоединения между азидом и циклоалкином. В некоторых вариантах осуществления -L-Рау представляет собой

, где каждый из SP¹ и SP² независимо представляет собой спейсер,

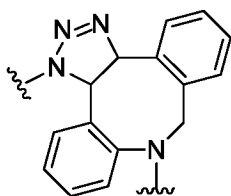


представляет собой циклический фрагмент, и



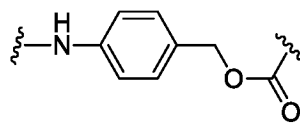
представляет собой остаток глутамина антитела. В некоторых

вариантах осуществления глутамин представляет собой глутамин Q295. В некоторых вариантах осуществления n равняется 2, где два L-Рау конъюгированы с Q295. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4, где два L-Рау конъюгированы с Q295, и два L-Рау конъюгированы с Q297. В некоторых вариантах осуществления циклический фрагмент представляет собой продукт реакции циклоприсоединения. В определенных вариантах осуществления циклический фрагмент представляет собой продукт реакции циклоприсоединения между азидом и циклоалкином. В определенных вариантах осуществления циклический фрагмент представляет собой



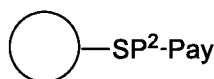
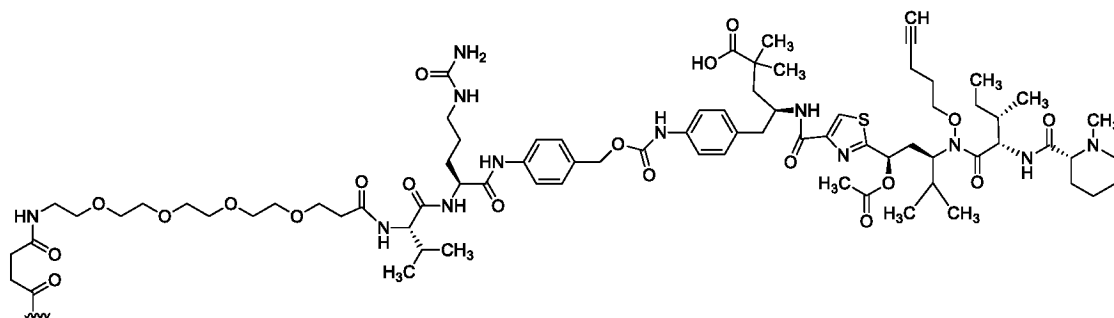
. В определенных вариантах осуществления SP^1 содержит фрагмент

PEG. В некоторых вариантах осуществления PEG содержит 1—12 звеньев этиленгликоля. В определенных вариантах осуществления SP^2 содержит дипептид. В определенных вариантах осуществления SP^2 содержит val-cit. В определенных

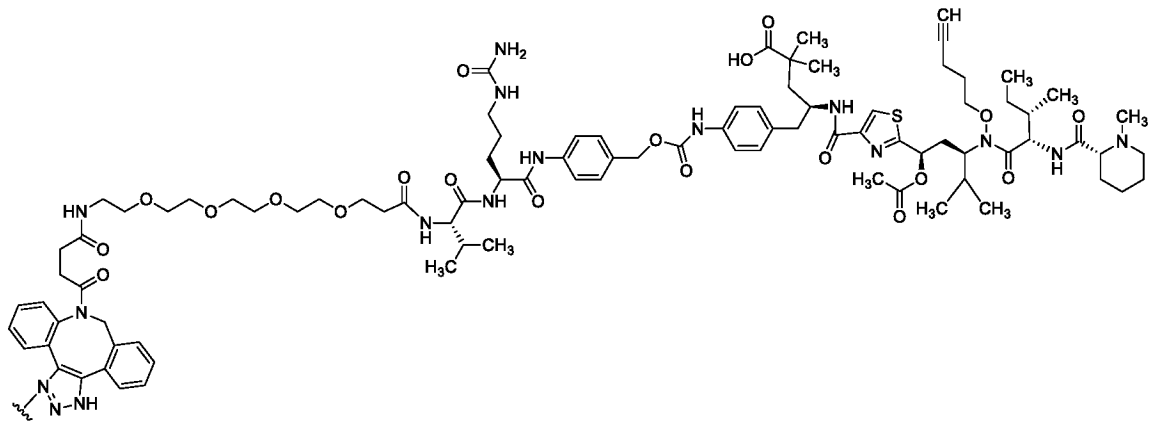


вариантах осуществления SP^2 содержит

вариантах осуществления SP^2 содержит фрагмент PEG. В некоторых вариантах осуществления SP^2 -Рау представляет собой:

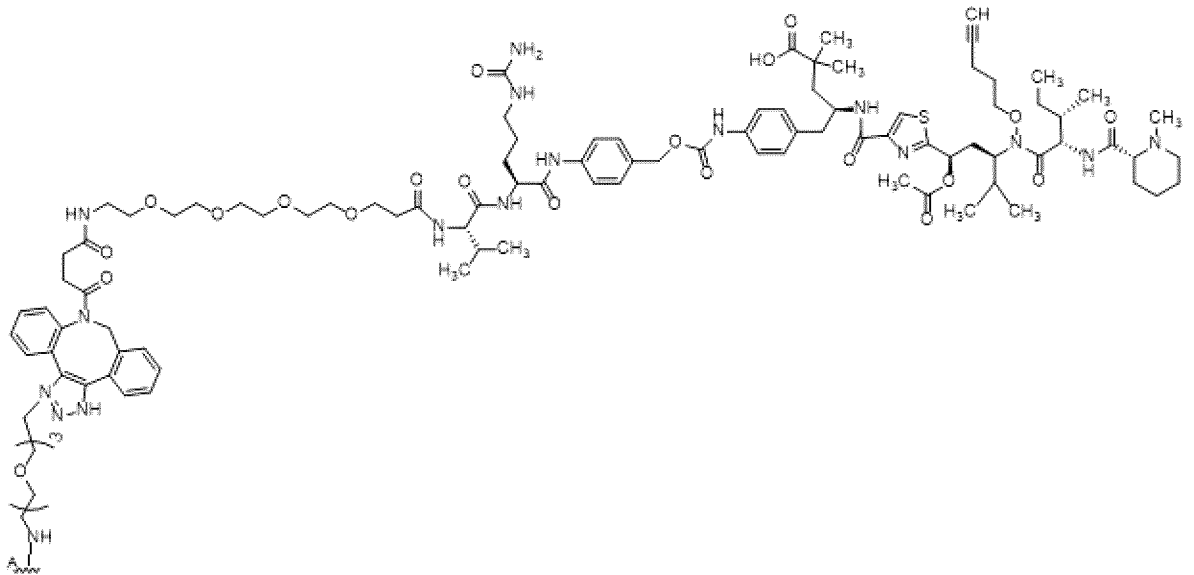
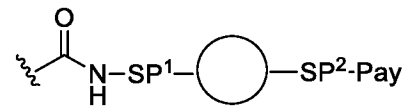


В определенных вариантах осуществления - SP^2 -Рау представляет собой

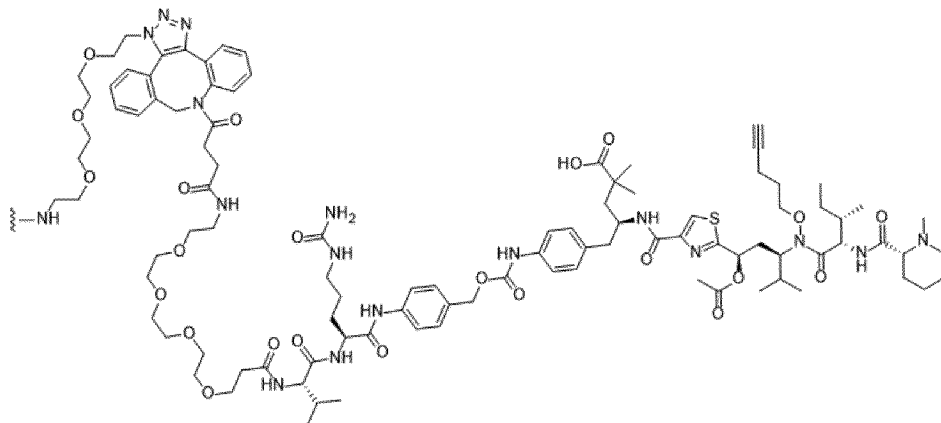


или его региоизомер циклоприсоединения.

[0201] В определенных вариантах осуществления представляет собой



или его региоизомер:



где ξ^A представляет собой связь с остатком глутамина антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную

последовательность Lcdr2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность Lcdr3 под SEQ ID NO: 34.

[0202] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает соединение, характеризующееся структурой согласно формуле (A):

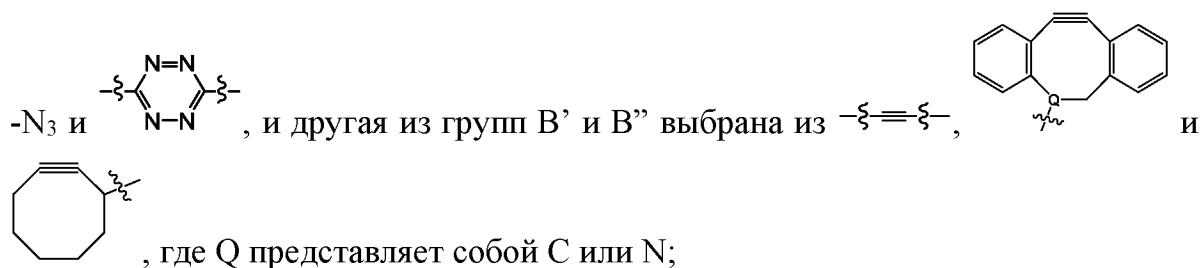
BA-(Gln-NH-L1-B-(-L2-(-M-Dxd)_m)_k)_n (A), где:

BA представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент;

Gln представляет собой остаток глутамина;

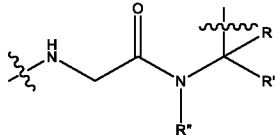
L1 отсутствует или представляет собой первый линкер;

B представляет собой звено с разветвлением, содержащее по меньшей мере один аддукт группы B' и группы B'', где одна из групп B' и B'' выбрана из

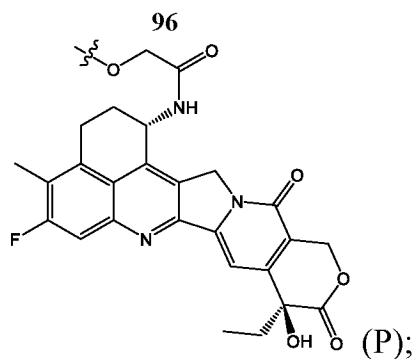


L2 представляет собой второй линкер, ковалентно присоединенный к звену B с разветвлением посредством по меньшей мере одной группы B'';

M отсутствует или представляет собой фрагмент, характеризующийся

структурой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C₁-C₄алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо;

Dxd представляет собой противоопухолевое средство, характеризующееся структурой согласно формуле (P):

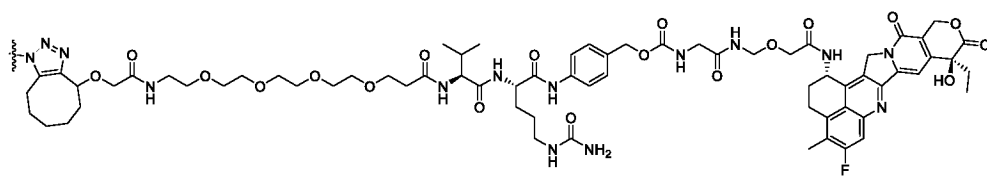


k представляет собой целое число от 1 до 12;

m представляет собой целое число от 1 до 30, и

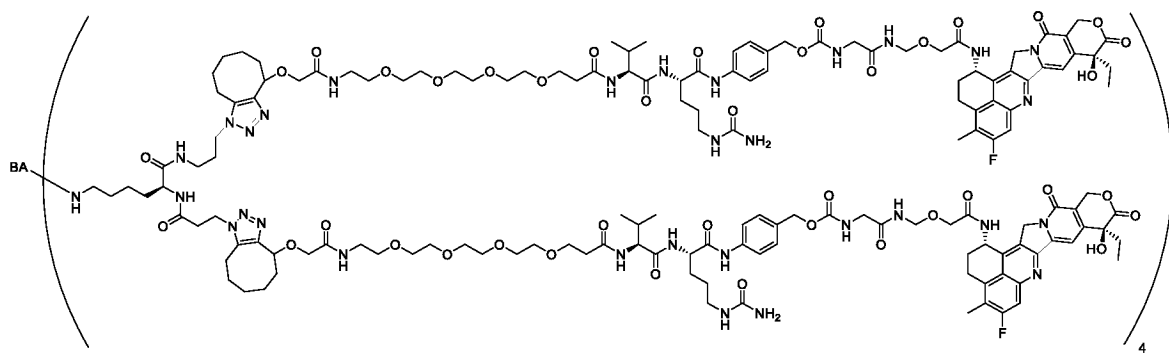
n представляет собой целое число от 1 до 30.

[0203] В одном варианте осуществления конъюгат антитело к FGFR2-лекарственное средство в соответствии с настоящим изобретением содержит антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент и линкер-полезную нагрузку, где линкер-полезная нагрузка включает структуру:



или ее фармацевтически приемлемую соль, где \sim представляет собой точку присоединения к антителу, непосредственно или посредством второго линкера.

[0204] В одном варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением характеризуется следующей структурой:

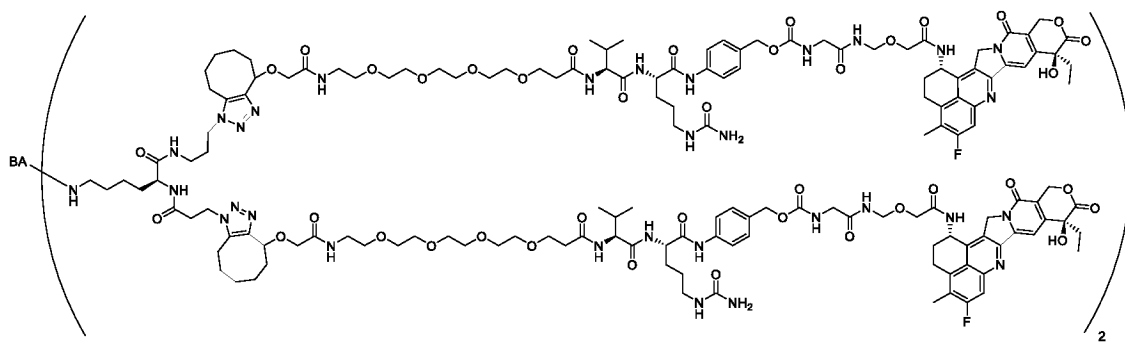


где BA представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0205] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его

антигенсвязывающий фрагмент, т. е. ВА, содержит CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

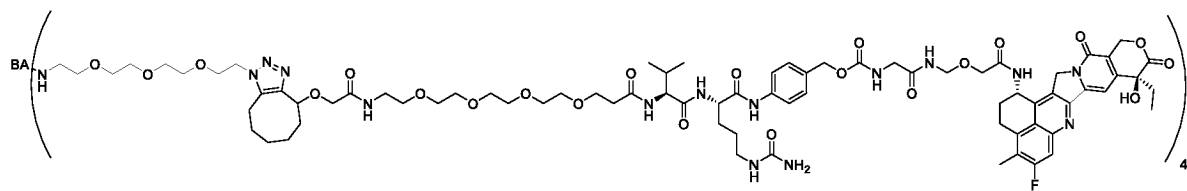
[0206] В одном варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением характеризуется следующей структурой:



2

где ВА представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0207] В одном варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением характеризуется следующей структурой:



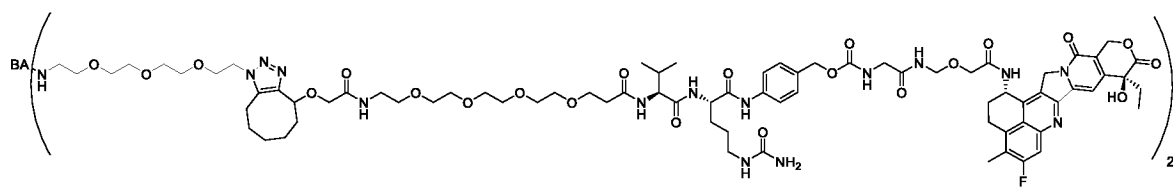
4

где ВА представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

[0208] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, т. е. ВА, содержит CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 4; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 8; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 12; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 14 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 16. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24;

аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 26; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 30; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат аминокислотную последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 24; аминокислотную последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 6; аминокислотную последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 42; аминокислотную последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 46; аминокислотную последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 32 и аминокислотную последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 34.

[0209] В одном варианте осуществления соединение в соответствии с настоящим изобретением характеризуется следующей структурой:



где BA представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент).

Линкер L1

[0210] В определенных вариантах осуществления линкер L1 отсутствует.

[0211] В определенных вариантах осуществления линкер L1 присутствует и ковалентно присоединен к амину остатка глутамина антитела к FGFR2.

[0212] В определенных вариантах осуществления линкер L1 содержит алкил (например, C_{1–20}алкил, или C_{1–12}алкил, или C_{1–6}алкил), -NH-, -C(O)-, -(CH₂)_u-NH-C(O)-, -(CH₂)_u-C(O)-NH-, -(CH₂-CH₂-O)_v-, -(CH₂)_u-(O-CH₂-CH₂)_v-C(O)-NH-, пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот, или их комбинации, каждое из которых

может быть необязательно замещено одним или несколькими из -S-, -S(O₂)-, -C(O)-, -C(O₂)- или -CO₂H, где подстрочные индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8.

[0213] В определенных вариантах осуществления свободный (неконъюгированный) линкер L1 содержит первичный амин для присоединения к остатку глутамина посредством реакции трансклутаминирования.

[0214] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит одно или более звеньев полиэтиленгликоля (PEG). В одном варианте осуществления L1 содержит 2, или 3, или 4, или 5, или 6, или 7, или 8, или 9, или 10 звеньев PEG.

[0215] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит дисульфидную (-S-S-) связь.

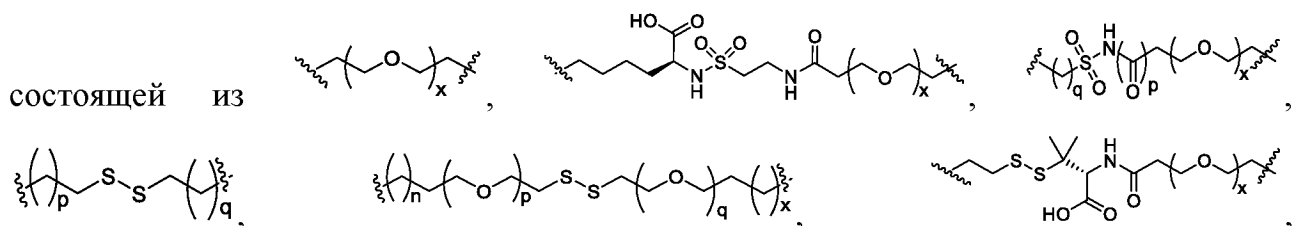
[0216] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит фрагмент -S(O₂)-.

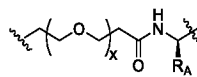
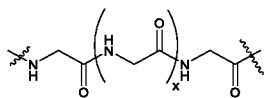
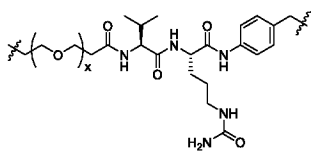
[0217] В одном варианте осуществления один или несколько атомов углерода в линкере L1 замещены -CO₂H.

[0218] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот, или пептидное звено, содержащее 2 аминокислоты, пептидное звено, содержащее 3 аминокислоты, или пептидное звено, содержащее 4 аминокислоты.

[0219] В одном варианте осуществления линкер L1 содержит пептидное звено, содержащее 2 аминокислоты, выбранные из глицина, валина, фенилаланина, пролина, глутаминовой кислоты и цитруллина и их комбинаций. В одном конкретном варианте осуществления линкер L1 содержит звено валин-цитруллин.

[0220] В одном варианте осуществления линкер L1 выбран из группы,





и , где R_A представляет собой группу, предусматривающую алкин, азид, тетразин, транс-циклооктен, малеимид, амин, кетон, альдегид, карбоновую кислоту, сложный эфир, тиол, сульфоновую кислоту, тозилат, галогенид, силан, цианогруппу, углеводную группу, биотиновую группу, липидный остаток, и где подстрочные индексы x , p , r и q независимо представляют собой целое число от 0 до 12, и их комбинации.

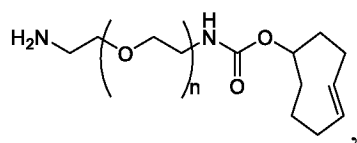
Звено В с разветвлением

[0221] В одном аспекте звено В с разветвлением содержит по меньшей мере один аддукт группы B' . В определенных вариантах осуществления В содержит один аддукт группы B' . В определенных вариантах осуществления В содержит два аддукта группы B' . В определенных вариантах осуществления В содержит три аддукта группы B' .

[0222] В определенных вариантах осуществления В содержит по меньшей мере четыре аддукта группы B' . В определенных вариантах осуществления В содержит четыре аддукта группы B' . В определенных вариантах осуществления В содержит пять аддуктов группы B' . В определенных вариантах осуществления В содержит шесть аддуктов группы B' .

[0223] Как правило, аддукт группы B' в соответствии с настоящим изобретением охватывает любой фрагмент, содержащий продукт реакции присоединения группы B' , независимо от стадий синтеза, предпринятых для получения фрагмента.

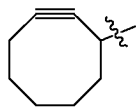
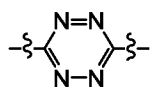
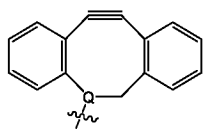
[0224] В некоторых вариантах осуществления аддукт группы B' может представлять собой продукт замещенного малеимида и, например, тиола или замещенного транс-циклооктена, например:



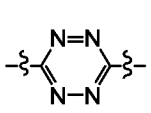
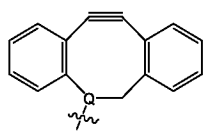
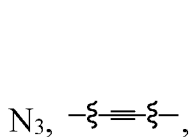
где n представляет собой целое число от 0 до 12 и, например, тетразина.

[0225] В некоторых вариантах осуществления аддукт группы В' может представлять собой продукт реакции 1,3-циклоприсоединения между азидом и алкиновым фрагментом. Без ограничения теории, азид-алкиновое циклоприсоединение представляет собой 1,3-диполярное циклоприсоединение между азидом и концевым или внутренним алкином с получением 1,2,3-триазола.

[0226] Более конкретно, аддукт группы В', выбранный из $-N_3$, $-\xi \equiv \xi-$,

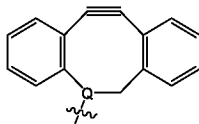
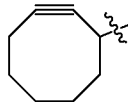


и $-\xi \equiv \xi-$, где Q представляет собой C или N, может охватывать аддукт 1,3-циклоприсоединения группы В' и группы В'', выбранный из -

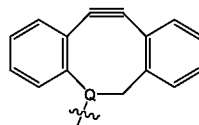


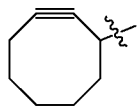
N_3 , $-\xi \equiv \xi-$, где Q представляет собой C или N, где группа В'' комплементарна группе В' с образованием аддукта 1,3-циклоприсоединения.

[0227] В качестве неограничивающего примера группа В' может представлять собой азид ($-N_3$), и группа В'' может представлять собой алкин-

содержащую группу, например, $-\xi \equiv \xi-$,  или .

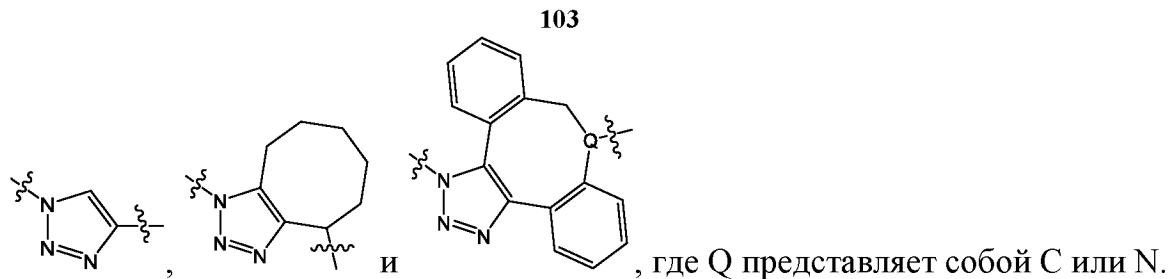
[0228] В качестве другого неограничивающего примера группа В' может

представлять собой алкин-содержащую группу, например, $-\xi \equiv \xi-$,  или



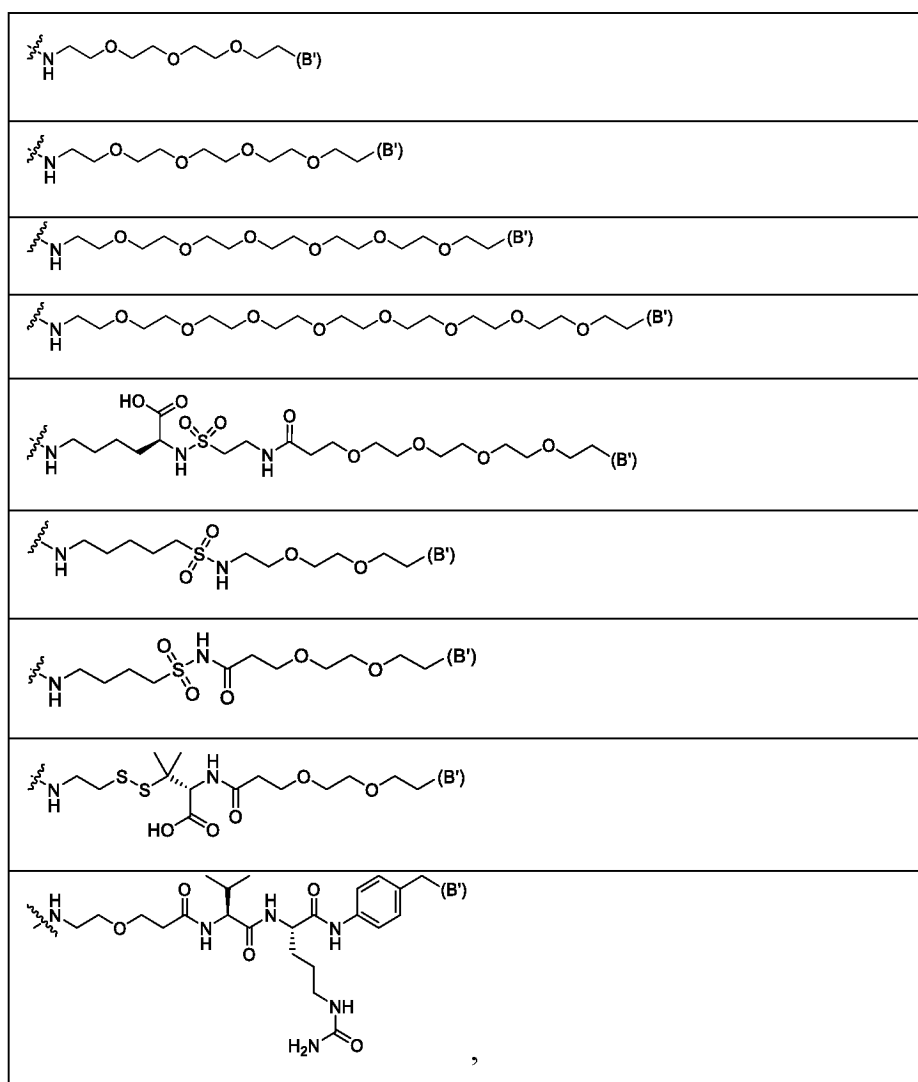
, и группа В'' может представлять собой азид.

[0229] В одном варианте осуществления аддукт группы В' и группы В'' предусматривает триазольный фрагмент. В одном конкретном варианте осуществления аддукт группы В' и группы В'' характеризуется структурой, выбранной из группы, состоящей из:



[0230] Как указано выше, в одном варианте осуществления В содержит один аддукт группы В'.

[0231] В конкретных вариантах осуществления L1-B выбран из группы, состоящей из:



где представляет собой аминогруппу, представляющую собой точку присоединения к остатку глутамина антитела к FGFR2, и (B') представляет собой аддукт группы В'.

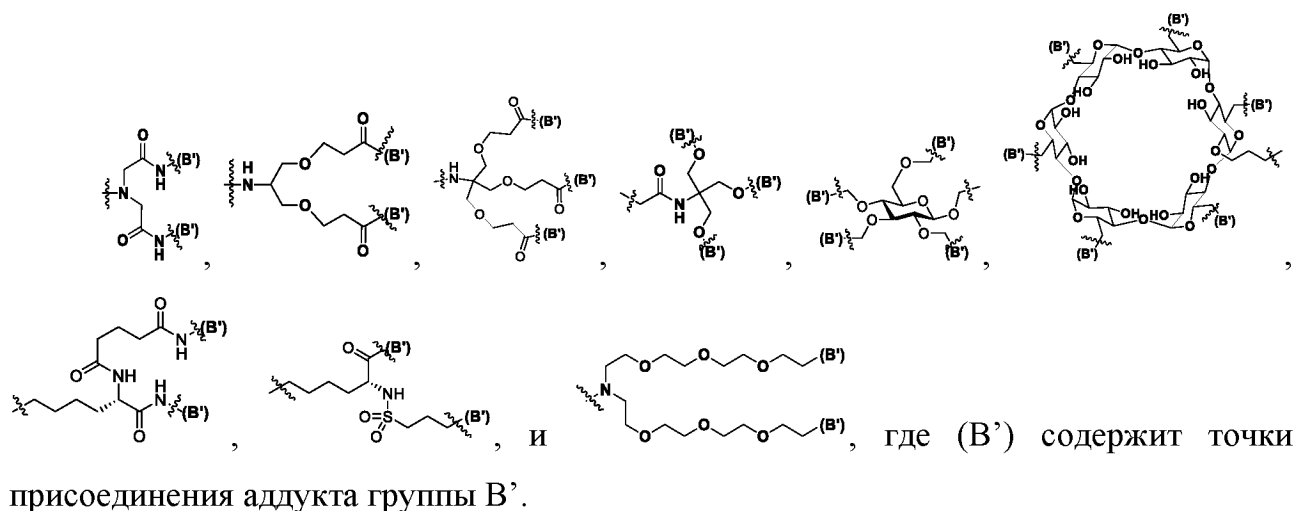
[0232] В одном варианте осуществления группа В' представляет собой азид

(-N₃), и аддукт группы В' предусматривает триазол.

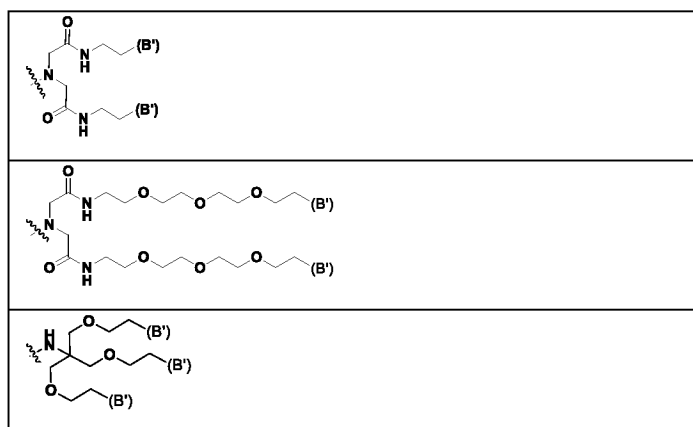
[0233] Согласно одному варианту осуществления настоящего изобретения линкеры L1-B могут представлять собой азидаминовые линкеры (AL), которые содержат аминогруппу, которая непосредственно присоединяется к антителу, PEG-содержащую базовую структуру и азидную функциональную группу В' (n = 1).

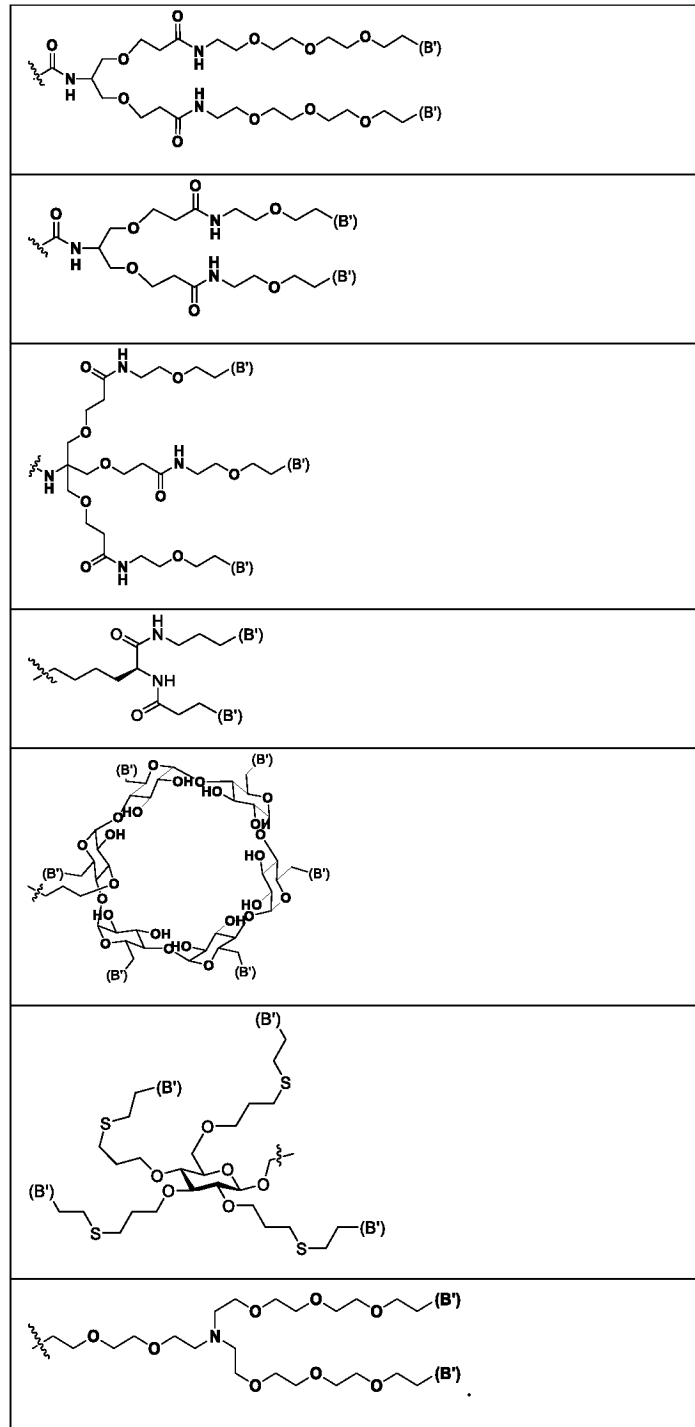
[0234] Структуры основных компонентов неограничивающих иллюстративных азидаминовых линкеров перечислены на **фигуре 8**. Конкретные структуры, синтезированные в качестве примеров, представлены в **таблице 1**.

[0235] В одном варианте осуществления В содержит по меньшей мере два аддукта группы В'. В конкретных вариантах осуществления В содержит:

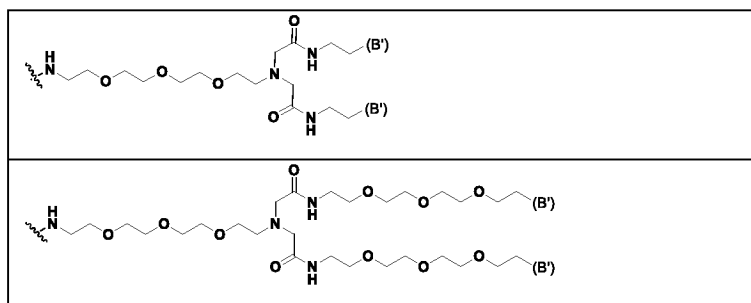


[0236] В конкретных вариантах осуществления В выбран из группы, состоящей из:

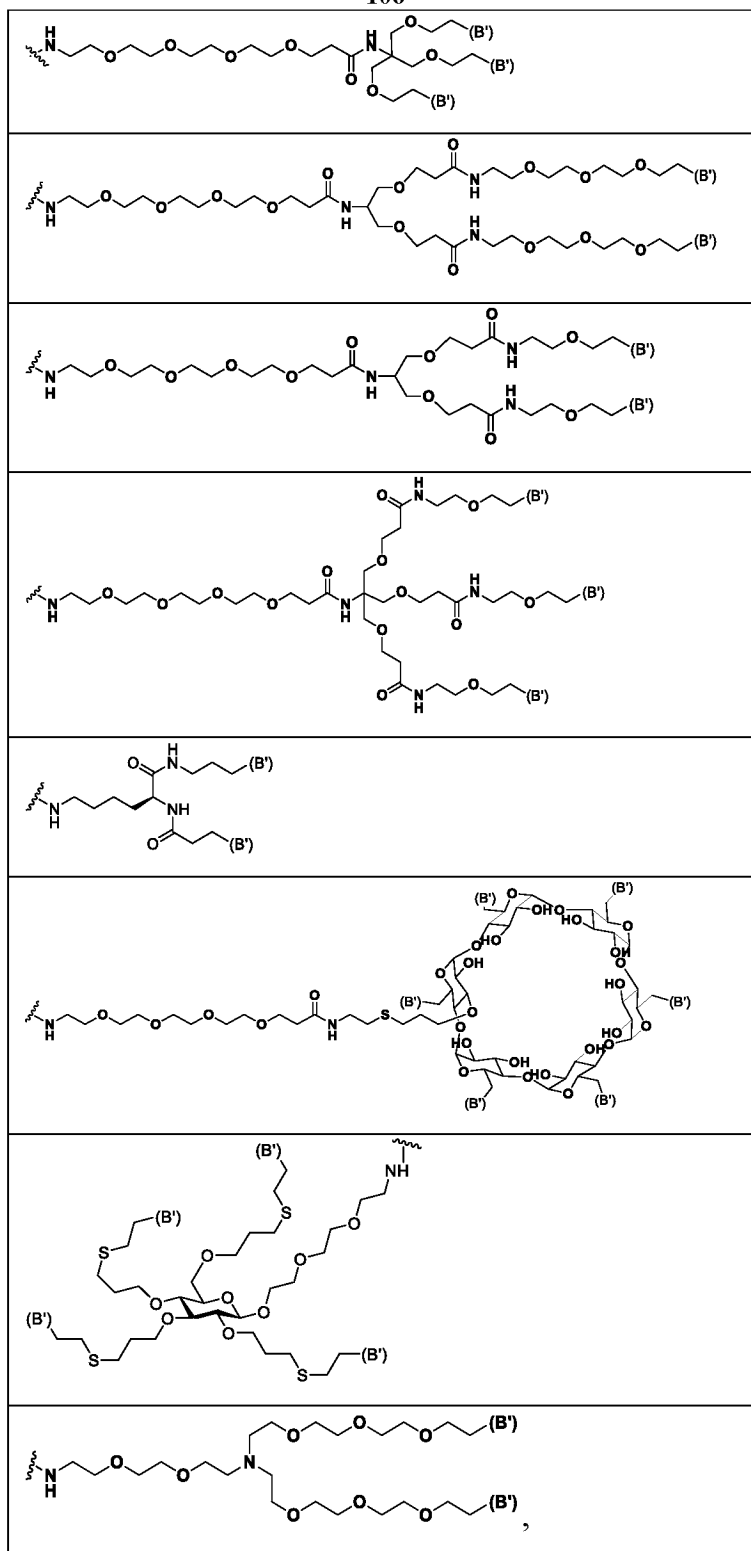





[0237] В конкретных вариантах осуществления L1-B выбран из группы, состоящей из:



106



где  представляет собой аминогруппу, представляющую собой точку присоединения к остатку глутамина антитела к FGFR2.

[0238] Согласно другому варианту осуществления настоящего изобретения линкеры L1-B могут представлять собой азидаминовые линкеры с разветвленным алкилом (BL), содержащие аминогруппу, которая непосредственно

присоединяется к антителу к FGFR2, PEG-содержащую базовую структуру с разветвленным алкилом и 2—6 азидных функциональных групп В' (n = 2—6).

[0239] Структуры основных компонентов иллюстративных неограничивающих азидаминовых линкеров с разветвленным алкилом перечислены на **фигуре 9**. Конкретные структуры, синтезированные в качестве примеров, представлены в **таблице 2**.

Линкер L2

[0240] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения L2 характеризуется структурой согласно формуле (L2):



(L2),

где:

B'' представляет собой группу, способную ковалентно присоединяться к группе B';

SP1 отсутствует или представляет собой первое спейсерное звено;

B2 отсутствует или представляет собой звено с разветвлением;

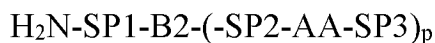
SP2 отсутствует или представляет собой второе спейсерное звено;

AA отсутствует или представляет собой пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третье спейсерное звено, и

p представляет собой целое число от 1 до 12.

[0241] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения L2 характеризуется структурой согласно формуле (L2'):


$$(\text{L2}'),$$

где:

SP1 отсутствует или представляет собой первое спейсерное звено;

B2 отсутствует или представляет собой звено с разветвлением;

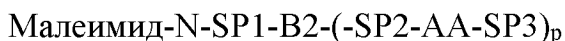
SP2 отсутствует или представляет собой второе спейсерное звено;

AA отсутствует или представляет собой пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третье спейсерное звено, и

p представляет собой целое число от 1 до 12.

[0242] В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения L2 характеризуется структурой согласно формуле (L2''):


$$(\text{L2}''),$$

где:

SP1 отсутствует или представляет собой первое спейсерное звено;

B2 отсутствует или представляет собой звено с разветвлением;

SP2 отсутствует или представляет собой второе спейсерное звено;

AA отсутствует или представляет собой пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует или представляет собой третье спейсерное звено, и

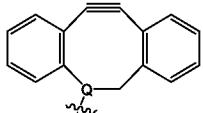
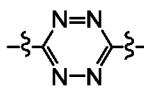
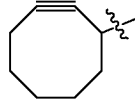
p представляет собой целое число от 1 до 12.

[0243] В определенных вариантах осуществления, где линкер L2 характеризуется структурой в соответствии с L2' или L2'', линкер L2 может быть

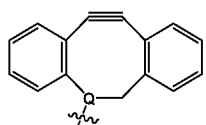
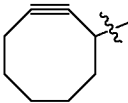
непосредственно ковалентно присоединен к антителу к FGFR2, например, путем лигирования с глутамином, опосредованного трансглутаминазой (линкер L2'), или лигирования с цистеином (линкер L2'').

[0244] В определенных вариантах осуществления линкер L2 содержит группу B'', способную ковалентно присоединяться к группе B', как описано выше.

[0245] В определенных вариантах осуществления группа B'' выбрана

из $-N_3$, $-\xi \equiv \xi -$, ;  и , где Q представляет собой C или N.

[0246] В качестве неограничивающего примера группа B'' может

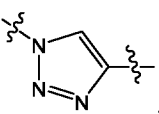
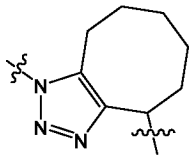
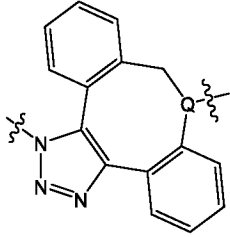
представлять собой алкин-содержащую группу, например, $-\xi \equiv \xi -$,  или .

[0247] В качестве другого неограничивающего примера группа B''

может представлять собой азид.

[0248] В одном варианте осуществления аддукт группы B' и группы

B'' предусматривает триазольный фрагмент. В одном конкретном варианте осуществления аддукт группы B' и группы B'' характеризуется структурой, выбранной из группы, состоящей из:

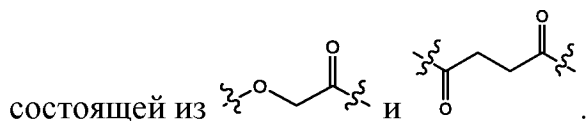
,  и , где Q представляет собой

C или N.

[0249] В одном варианте осуществления первый спейсер SP1

отсутствует.

[0250] В другом варианте осуществления SP1 выбран из группы,



[0251] В одном варианте осуществления второй спейсер SP2 отсутствует.

[0252] В другом варианте осуществления SP2 выбран из группы, состоящей из алкила (например, C_{1–20}алкила, или C_{1–12}алкила, или C_{1–10}алкила, или C_{1–8}алкила, или C_{1–6}алкила), -(CH₂-CH₂-O)_v-, -NH-, -C(O)-, -NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-, -NH-(CH₂)_u-C(O)-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-C(O)-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-, -NH-(CH₂-CH₂-O)_v-(CH₂)_u-C(O)-, -(CH₂)_u-NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-NH-C(O)-, -NH-(CH₂)_u-C(O)-NH- или их комбинаций; где подстрочные индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8.

[0253] В определенных вариантах осуществления AA представляет собой пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот, выбранных из глицина, валина, фенилаланина, пролина, глутаминовой кислоты, лизина, фенилаланина и цитруллина и их комбинаций.

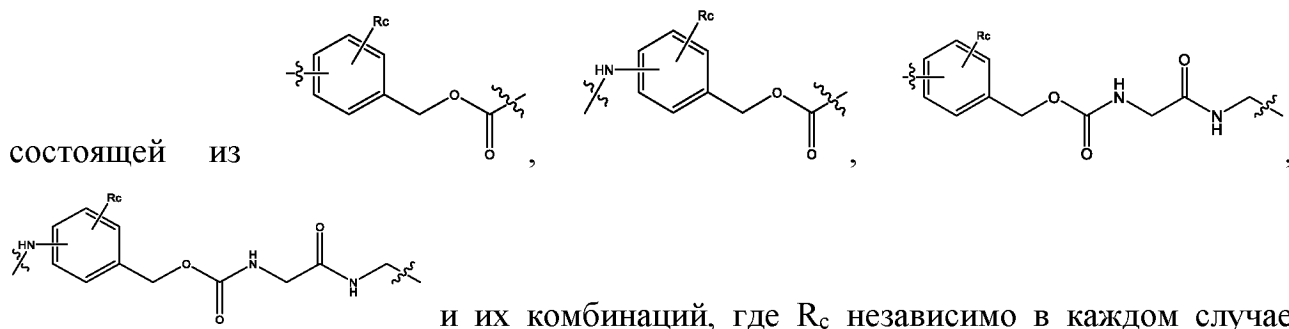
[0254] В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидное звено, содержащее 2 аминокислоты. В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидное звено, содержащее 3 аминокислоты. В одном варианте осуществления AA представляет собой пептидное звено, содержащее 4 аминокислоты.

[0255] В одном конкретном варианте осуществления AA представляет собой валин-цитруллин, валин-аланин или фенилаланин-лизин.

[0256] В другом конкретном варианте осуществления AA выбран из группы, состоящей из глицин-глицин-глицина (GGG), глицин-глицин-глицин-глицина (GGGG), глицин-глицин-фенилаланина (GGF) и глицин-глицин-фенилаланин-глицина (GGFG) и глутаминовая кислота-валин-цитруллина (EVC).

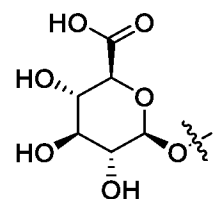
[0257] В одном варианте осуществления третий спейсер SP3 отсутствует.

[0258] В другом варианте осуществления SP3 выбран из группы,



отсутствует или представляет собой группу, выбранную из

и



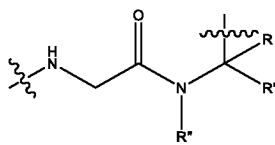
[0259] В одном варианте осуществления спейсер SP3 ковалентно присоединен к аналогу камптотецина, например, Dxd или M-Dxd.

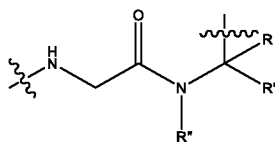
[0260] В одном варианте осуществления линкер L2 содержит от приблизительно 1 до приблизительно 12, или от приблизительно 1 до приблизительно 10, или от приблизительно 1 до приблизительно 8, или от приблизительно 1 до приблизительно 6, или от приблизительно 1 до приблизительно 4, или от приблизительно 1 до приблизительно 2 фрагментов (SP2-AA-SP3), и линкер-полезная нагрузка L2-Dxd содержит от приблизительно 1 до приблизительно 12, или от приблизительно 1 до приблизительно 10, или от приблизительно 1 до приблизительно 8, или от приблизительно 1 до приблизительно 6, или от приблизительно 1 до приблизительно 4, или от приблизительно 1 до приблизительно 2 молекул полезной нагрузки Dxd.

Фрагмент М

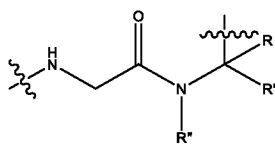
[0261] В определенных вариантах осуществления фрагмент М отсутствует.

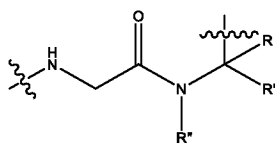
[0262] В определенных вариантах осуществления М присутствует и



характеризуется структурой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или алкил, или где R' и R'' вместе образуют кольцо, например, от 3-членного до 8-членного кольца.

[0263] В определенных вариантах осуществления М присутствует и



характеризуется структурой , где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C₁-C₄алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо.

[0264] В одном варианте осуществления R представляет собой водород.

[0265] В одном варианте осуществления R' представляет собой водород. В одном варианте осуществления R' представляет собой C₁-C₄алкил.

[0266] В одном варианте осуществления R'' представляет собой водород. В одном варианте осуществления R'' представляет собой C₁-C₄алкил.

[0267] В одном варианте осуществления R' и R'' вместе образуют 5-членное кольцо. В одном варианте осуществления R' и R'' вместе представляют собой -(CH₂)₃-.

[0268] В одном варианте осуществления R' и R'' вместе образуют 6-членное кольцо. В одном варианте осуществления R' и R'' вместе представляют собой -(CH₂)₄-.

[0269] В одном варианте осуществления R, R' и R'' в каждом случае

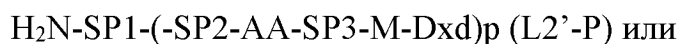
представляют собой атомы водорода, т. е. М представляет собой 

[0270] В другом варианте осуществления R представляет собой водород, и R' и R'' вместе образуют 5-членное кольцо, например, R' и R'' вместе

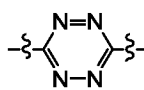
представляют собой $-(CH_2)_3-$, и М представляет собой 

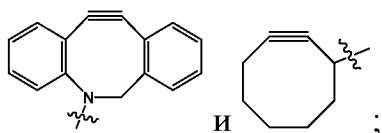
Линкер-полезные нагрузки (L2-P)

[0271] В другом аспекте настоящее изобретение предусматривает соединение согласно формуле (L2-P), (L2'-P) или (L2''-P):

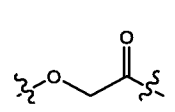
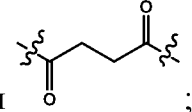


где:

B'' выбран из группы, состоящей из $-N_3$, , $-\xi \equiv H$, $-\xi \equiv \xi-$,



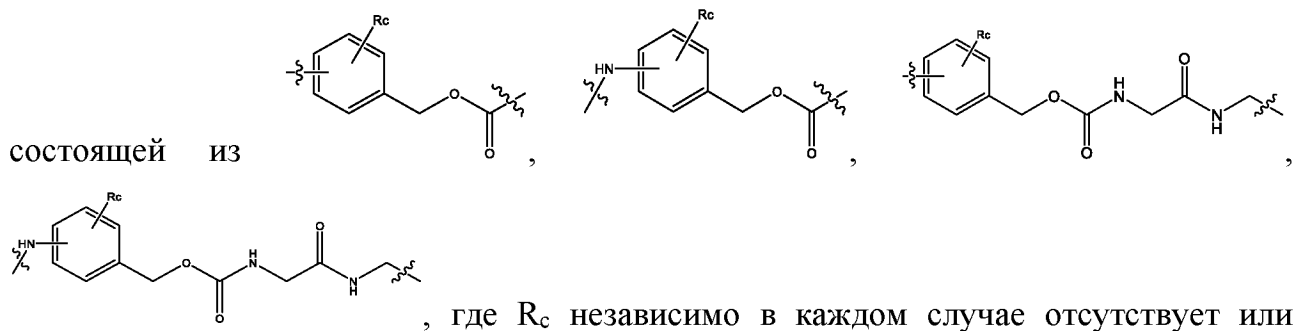
SP1 отсутствует, или первое спейсерное звено выбрано из группы,

состоящей из  и  ;

SP2 отсутствует, или второе спейсерное звено выбрано из группы, состоящей из C_{1-6} алкила, $-(CH_2-CH_2-O)_v-$, $-NH-$, $-C(O)-$, $-NH-C(O)-$, $-NH-(CH_2)_u-$, $-NH-(CH_2)_u-C(O)-$, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-$, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-C(O)-$, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-$, $-NH-(CH_2-CH_2-O)_v-(CH_2)_u-C(O)-$, $-(CH_2)_u-NH-C(O)-$, $-NH-(CH_2)_u-NH-C(O)-$, $-NH-(CH_2)_u-C(O)-NH-$ или их комбинаций; где подстрочные индексы u и v независимо представляют собой целое число от 1 до 8;

AA отсутствует или представляет собой пептидное звено, содержащее от 2 до 4 аминокислот;

SP3 отсутствует, или третье спейсерное звено выбрано из группы,



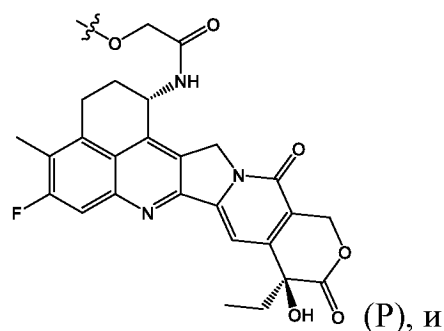
представляет собой группу, выбранную из

и

M отсутствует или представляет собой

, где R, R' и R'' в каждом случае независимо представляют собой водород или C₁-C₄алкил, или где R' и R'' вместе образуют 5-членное или 6-членное кольцо, и

Dxd представляет собой противоопухолевое средство, характеризующееся структурой согласно формуле (P):

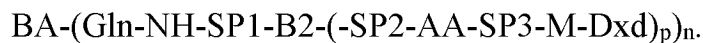


r представляет собой целое число от 1 до 12.

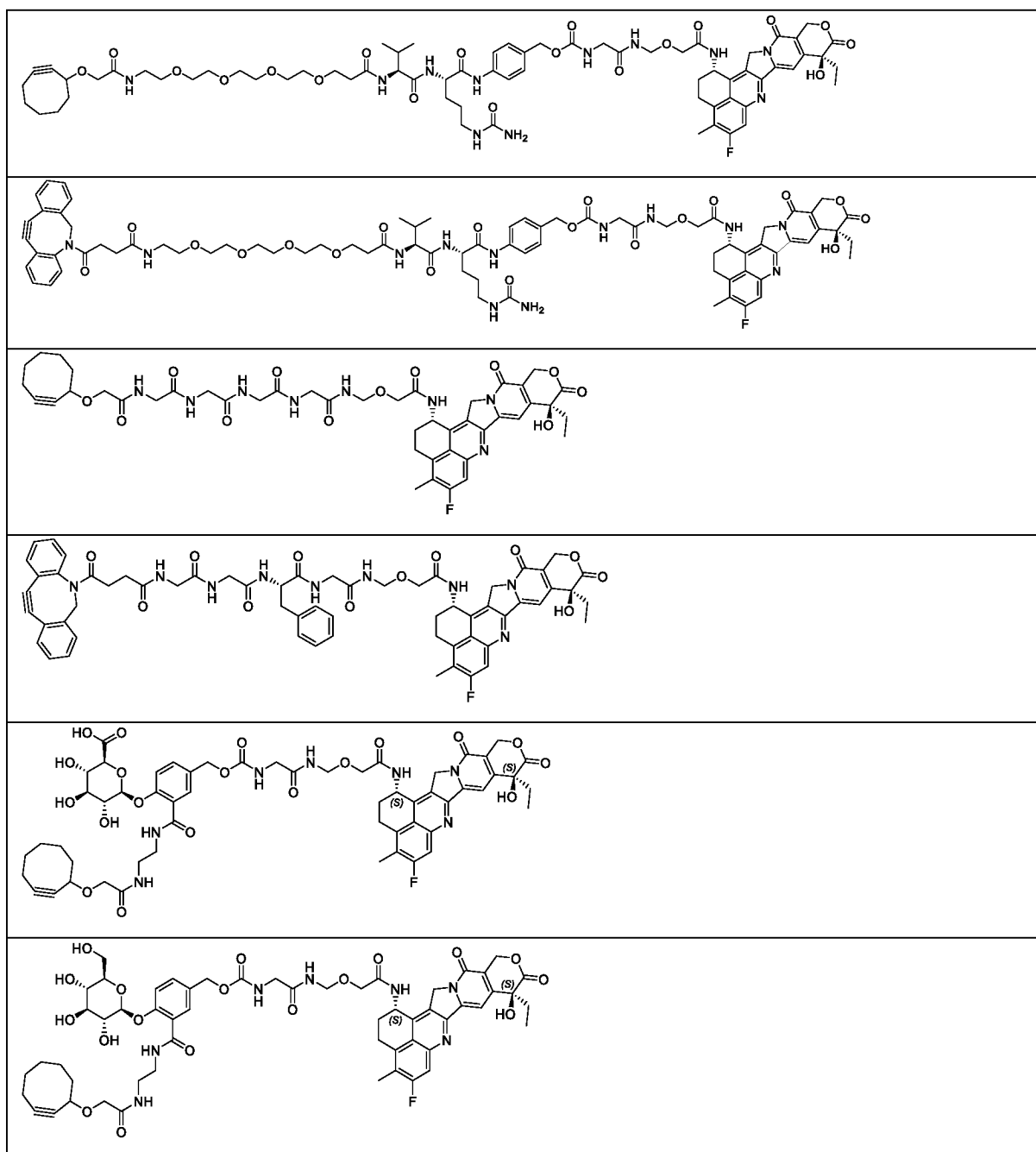
[0272] В определенных вариантах осуществления, где L2-P характеризуется структурой в соответствии с L2'-P или L2''-P, линкер-полезная нагрузка может быть непосредственно ковалентно присоединен к антителу к FGFR2, например, путем лигирования с глутамином, опосредованного трансглутаминазой

(L2'-P), или лигирования с цистеином (L2''-P).

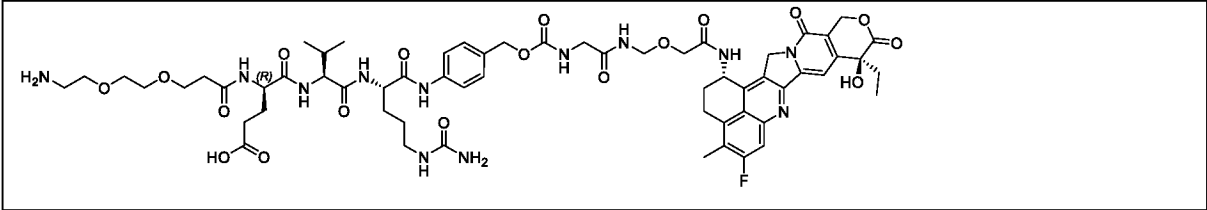
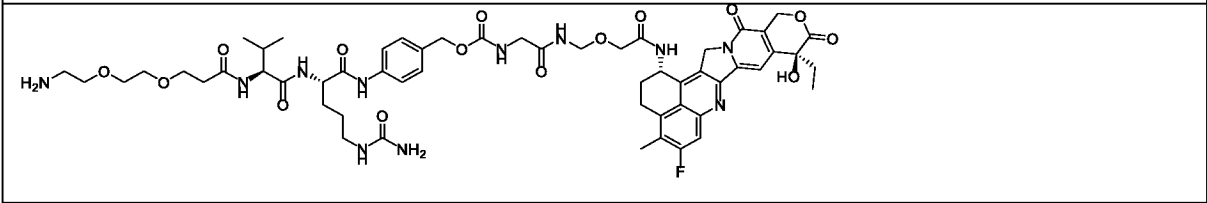
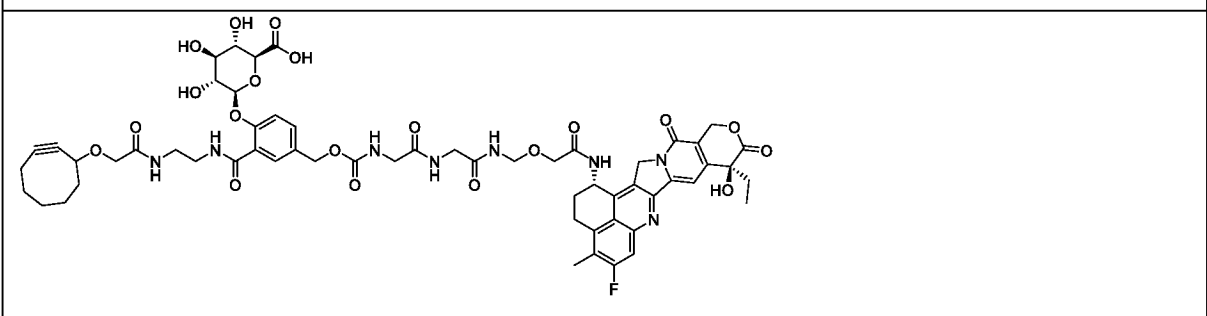
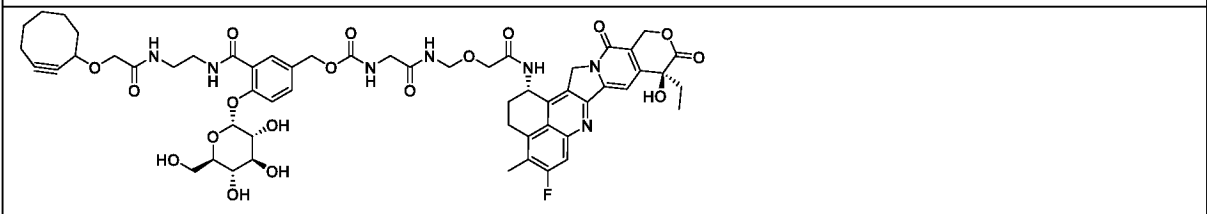
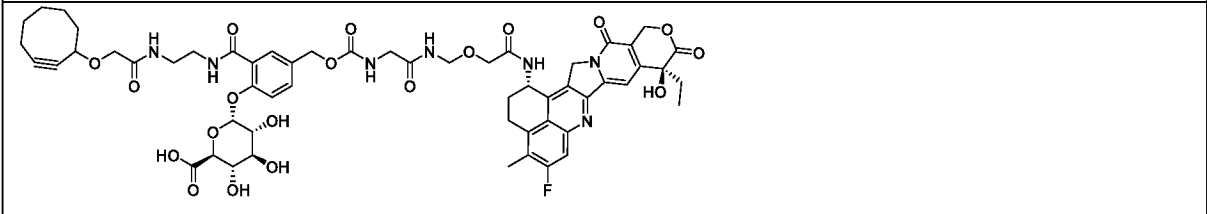
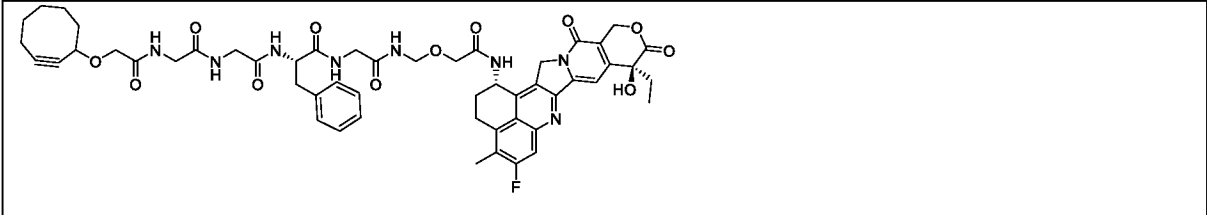
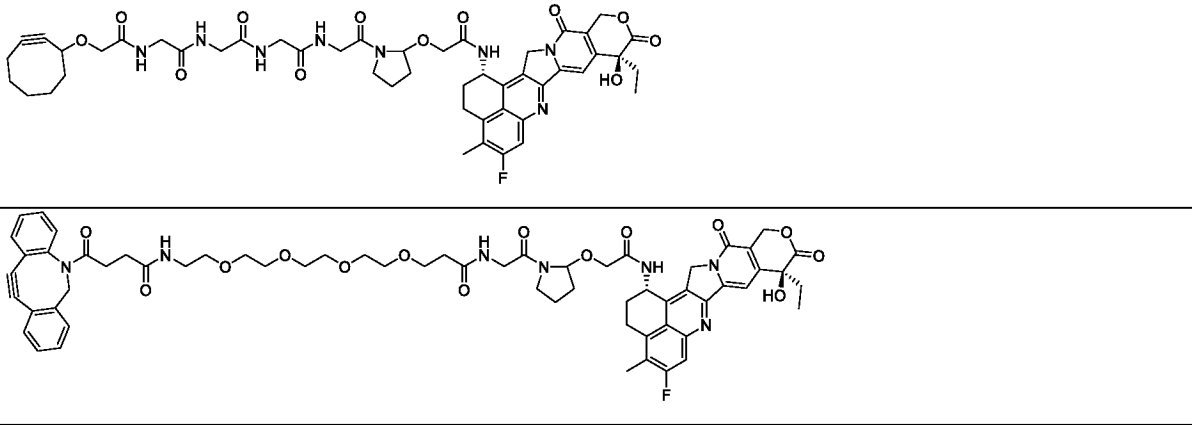
[0273] В одном варианте осуществления продукт прямого присоединения L2'-P к антителу к FGFR2 (BA) может характеризоваться следующей структурой:

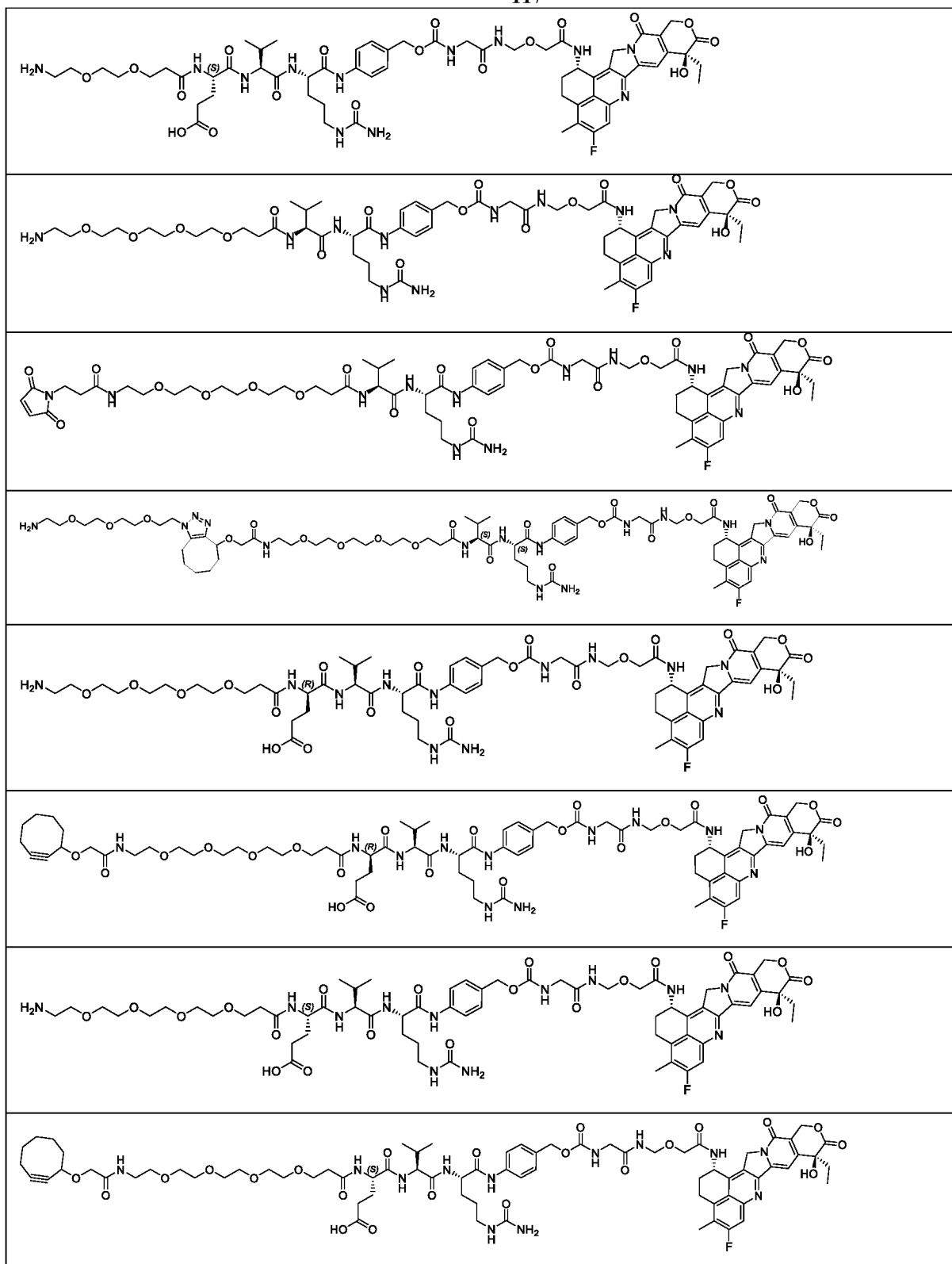


[0274] В определенных вариантах осуществления линкер-полезная нагрузка L2-P, L2'-P или L2''-P согласно настоящему изобретению характеризуется структурой, выбранной из группы, состоящей из:



116





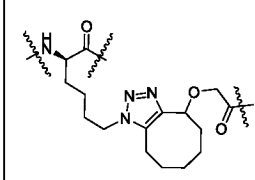
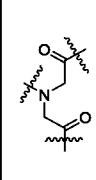
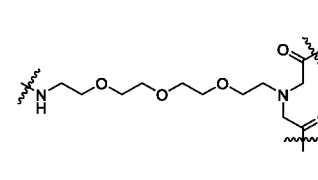
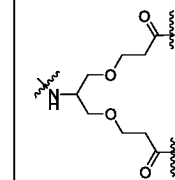
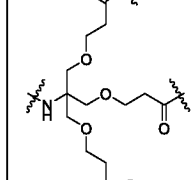
или их фармацевтически приемлемой соли.

Разветвленный линкер-2-полезные нагрузки (BL2P)

[0275] В другом аспекте в настоящем изобретении предусмотрен L2-P, который содержит одно или более звеньев с разветвлением. Иллюстративные звенья B1-B5 с разветвлением согласно настоящему изобретению изображены в таблице 1

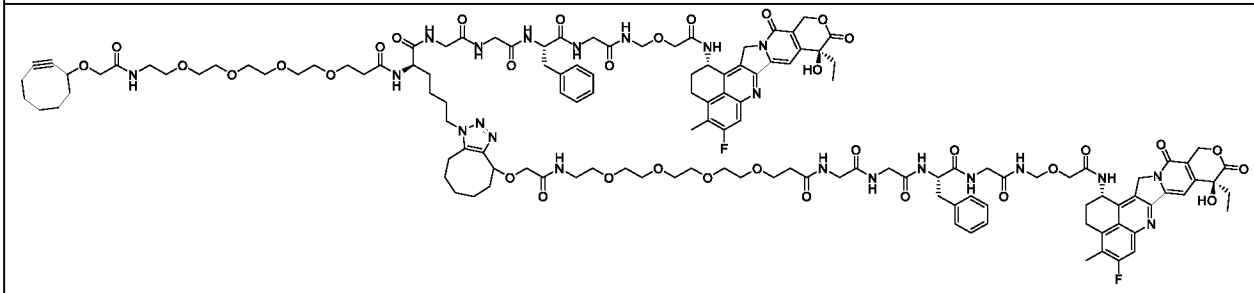
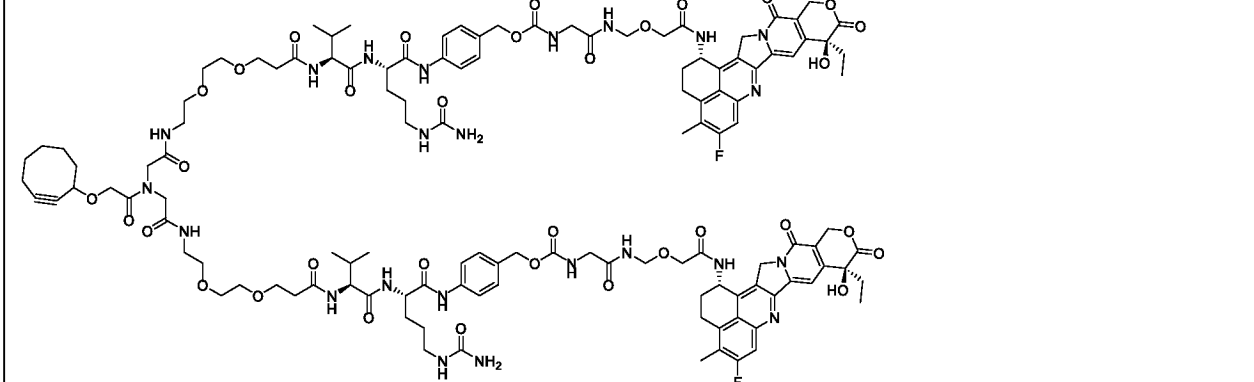
ниже.

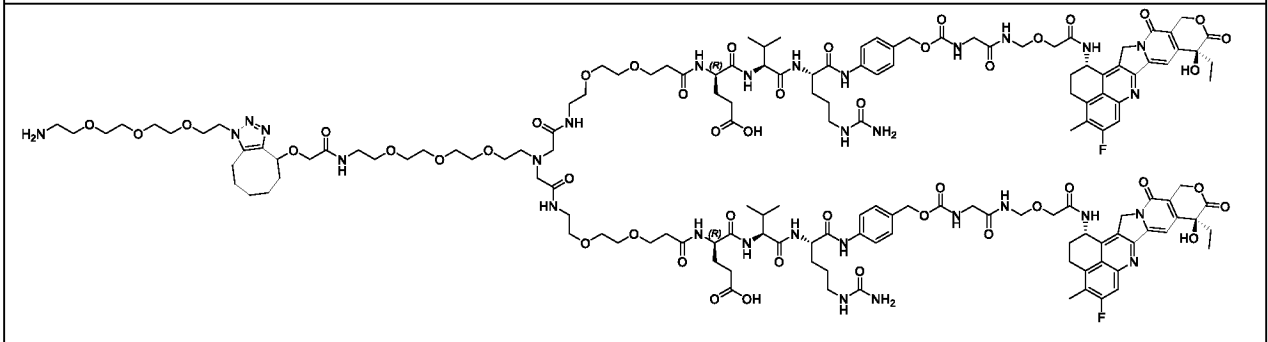
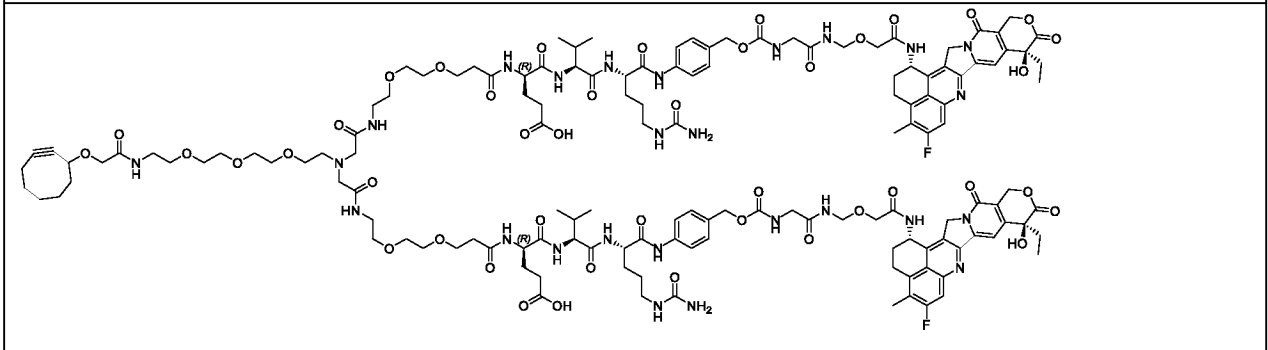
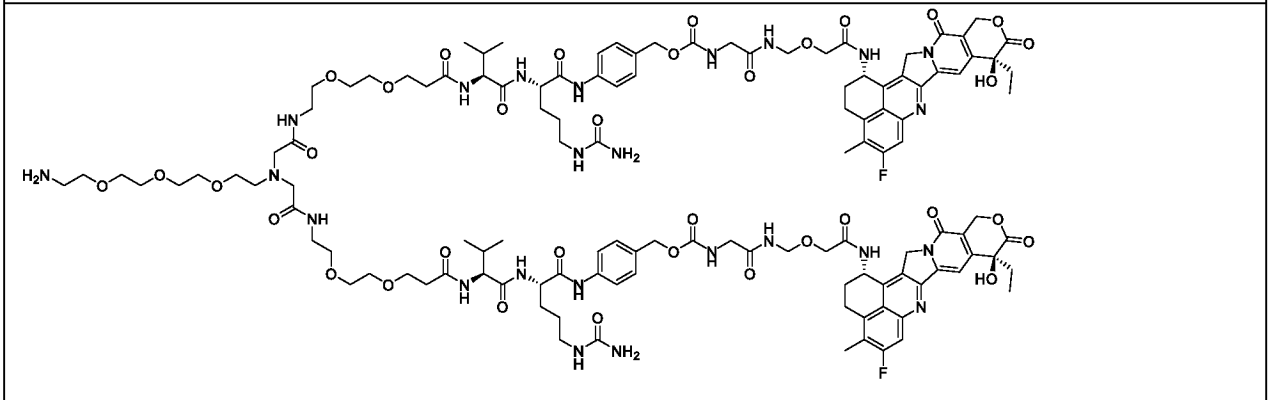
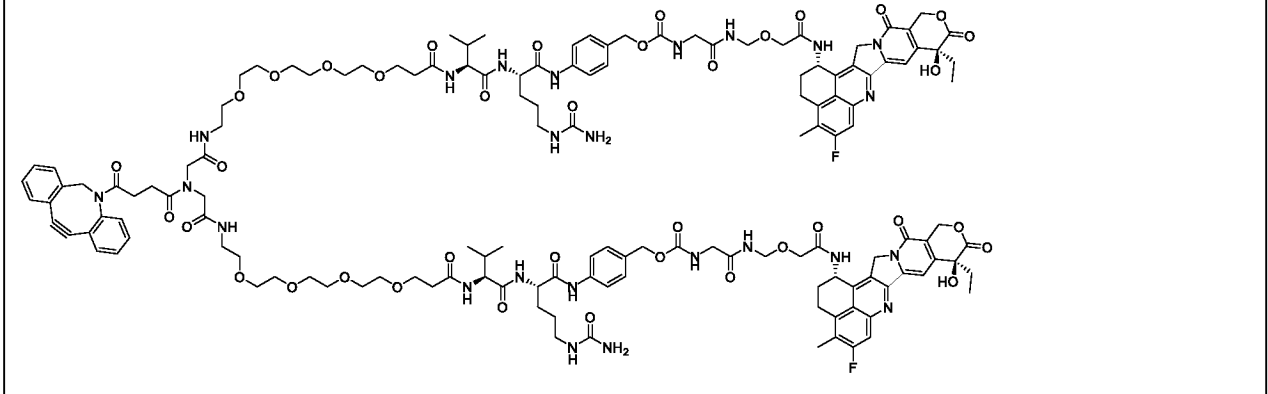
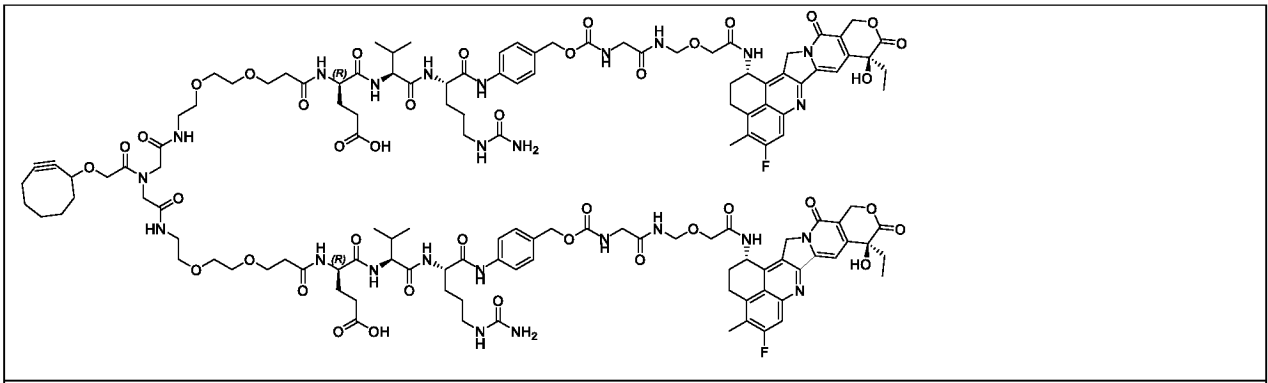
Таблица 1. Структуры звеньев В1-В5 с разветвлением

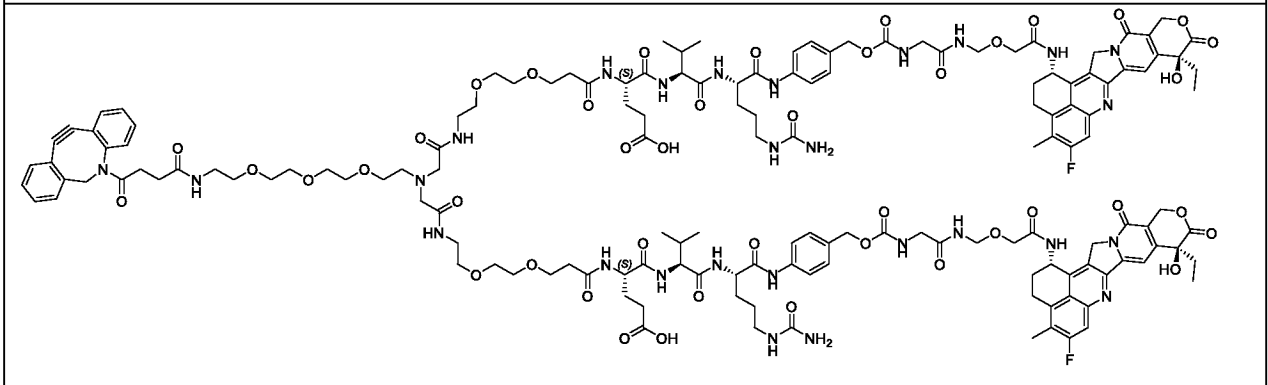
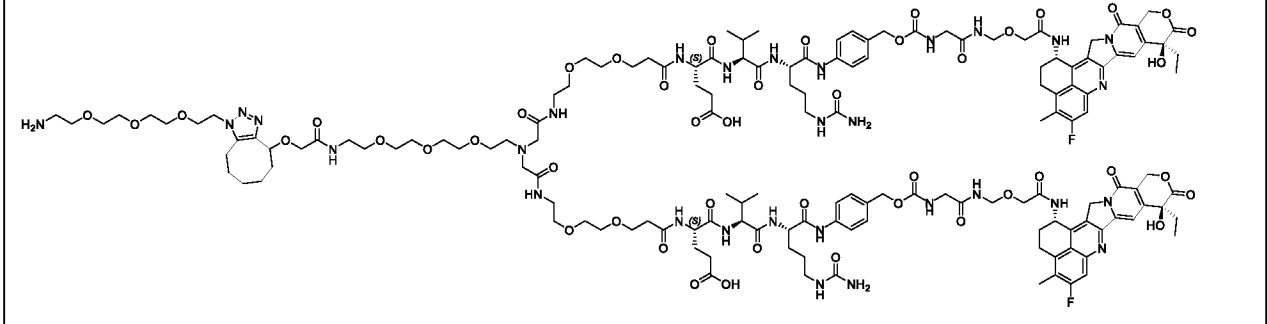
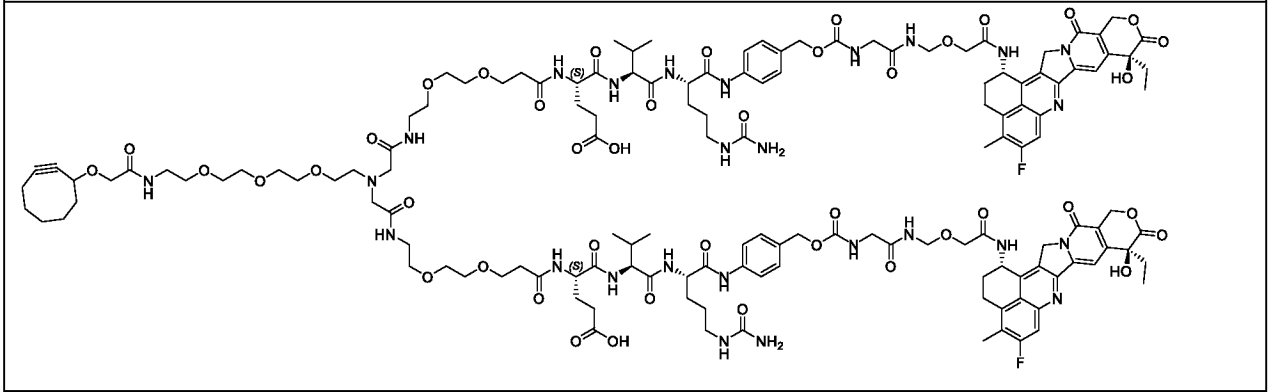
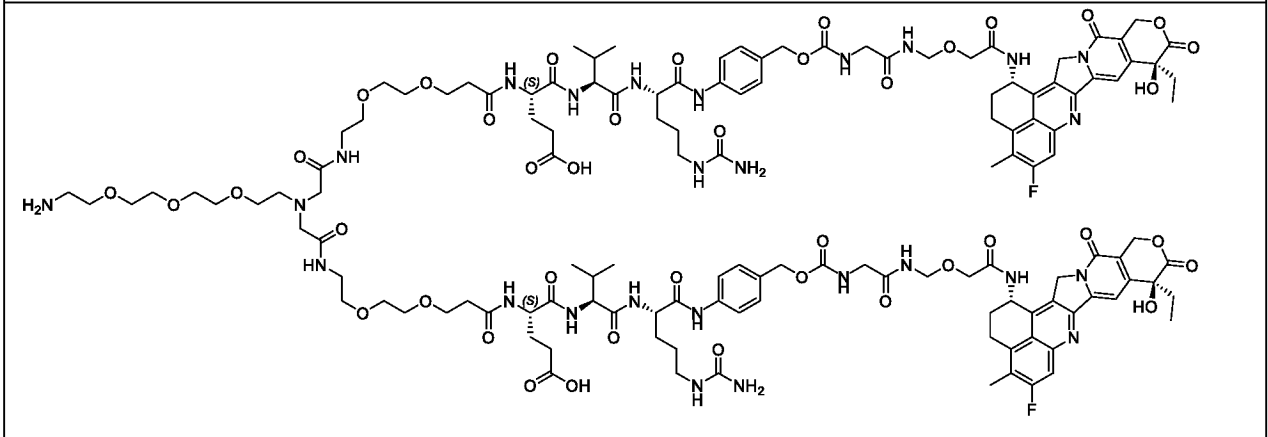
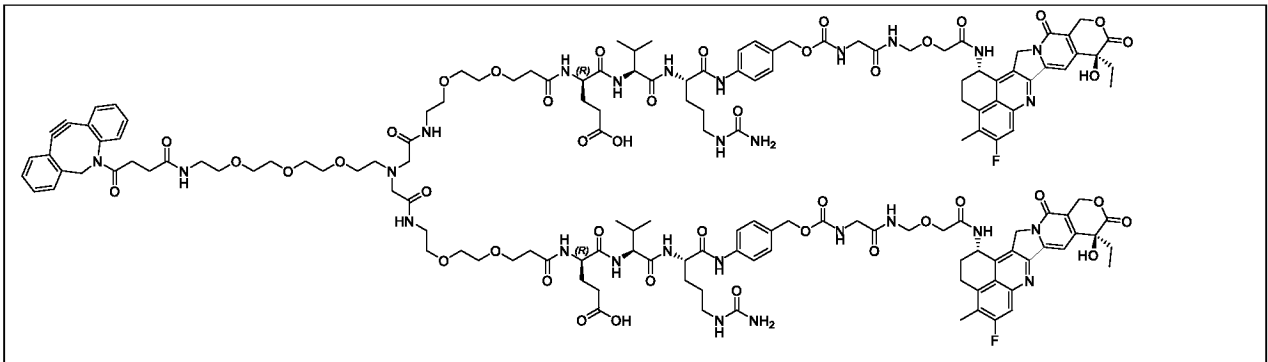
Разветвление В	B1	B2	B3	B4	B5
Структура					

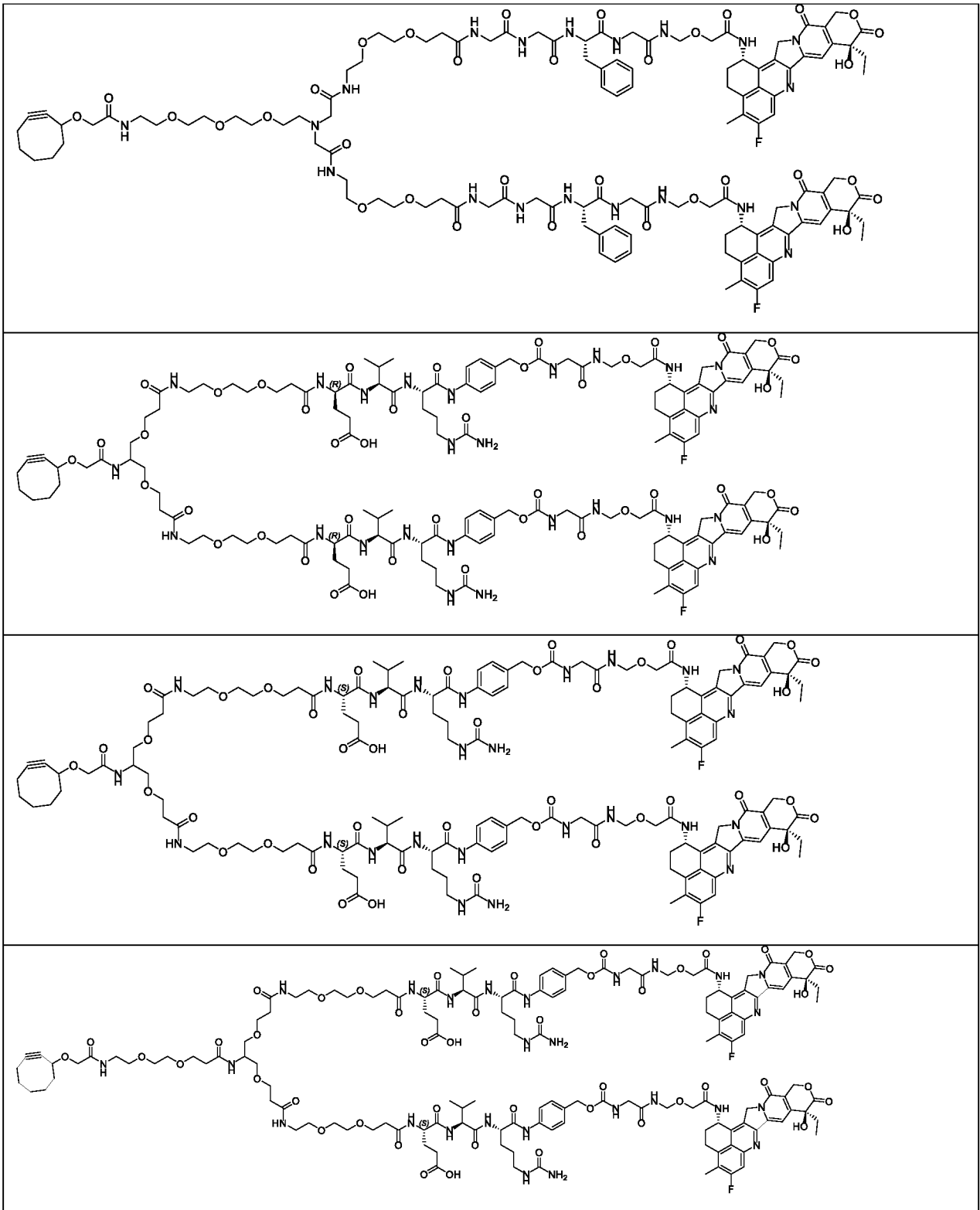
[0276] В таблице 2 ниже представлены структуры иллюстративных соединений разветвленный линкер-2-полезные нагрузки (**BL2P**) согласно настоящему изобретению.

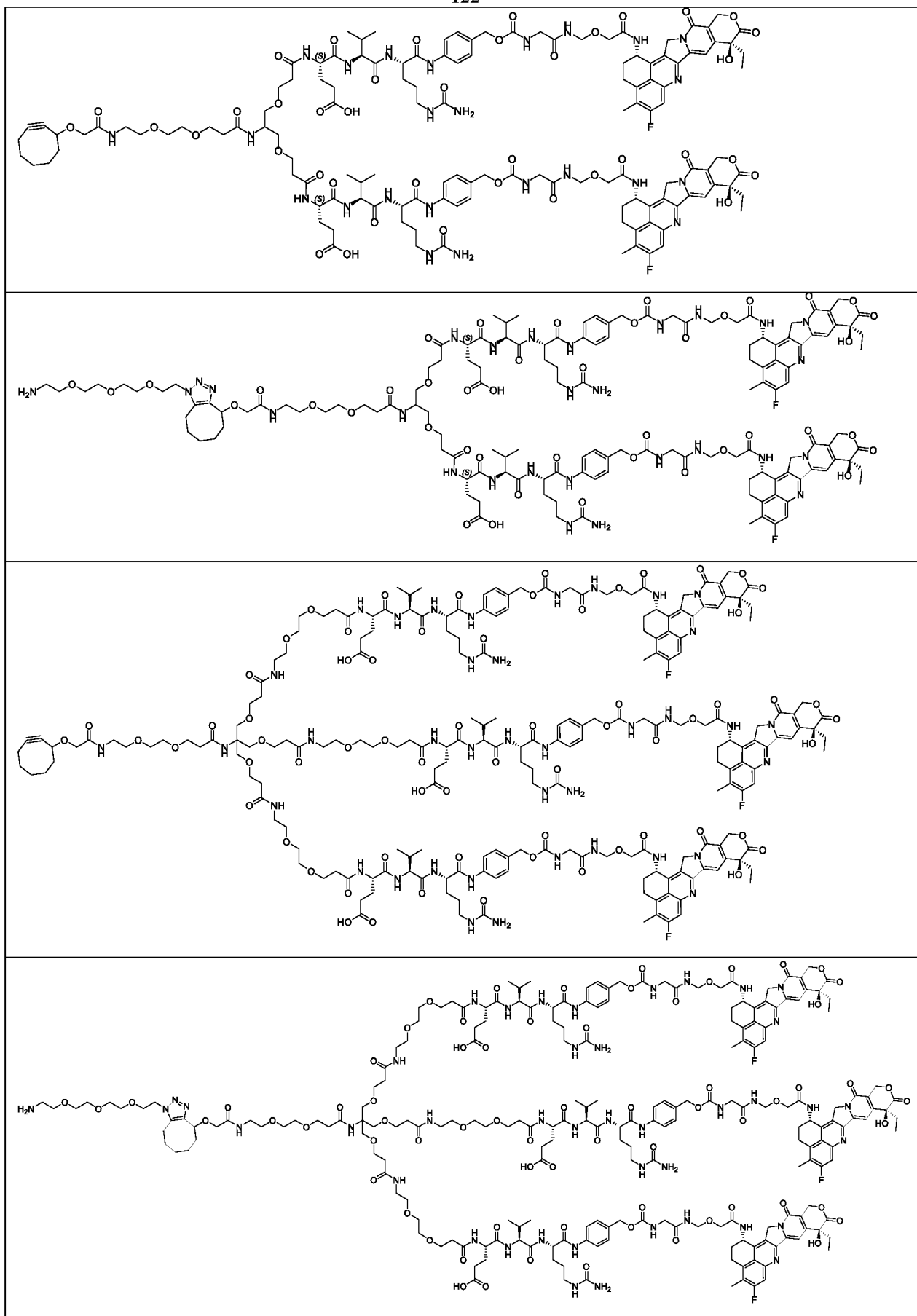
Таблица 2. Структуры разветвленный линкер-2-полезные нагрузки (BL2P)

Структуры



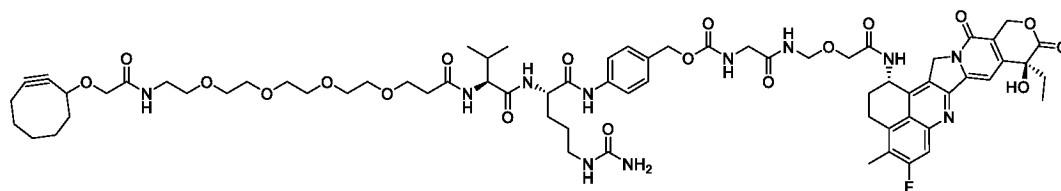








[0277] В одном варианте осуществления соединение (т. е. линкер-полезная нагрузка) согласно настоящему изобретению характеризуется структурой:



или его фармацевтически приемлемой соли.

[0278] В некоторых вариантах осуществления Ab конъюгировано с линкер-полезной нагрузкой или с полезной нагрузкой, раскрытой в WO 2015/157592, например, с раскрытым в ней соединением T32. В некоторых вариантах осуществления Ab конъюгировано с дерукстеканом (DXd), необязательно посредством линкера, содержащего GGFG.

[0279] В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10.

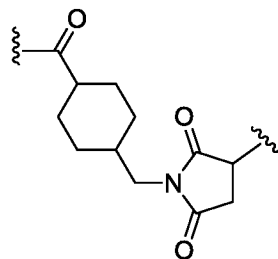
[0280] В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28. В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 28.

[0281] В некоторых вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие CDR в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 40 и CDR в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 44. В некоторых

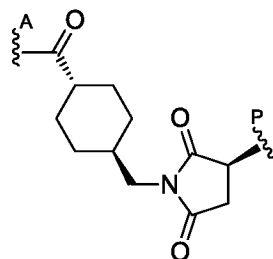
вариантах осуществления Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 40 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 44.

[0282] В некоторых вариантах осуществления L представляет собой расщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления L представляет собой нерасщепляемый линкер. В некоторых вариантах осуществления L содержит дипептид. В некоторых вариантах осуществления L содержит фрагмент PAB.

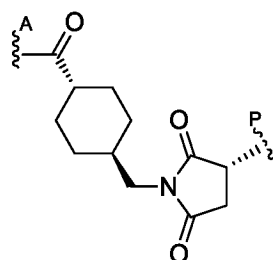
[0283] В некоторых вариантах осуществления L содержит фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



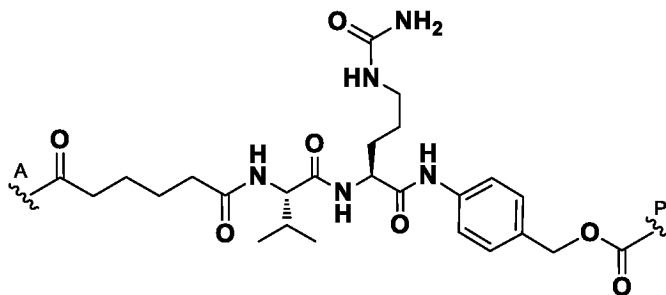
[0284] В некоторых вариантах осуществления L содержит фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



[0285] В некоторых вариантах осуществления L содержит фрагмент, характеризующийся следующей структурой:



[0286] В некоторых вариантах осуществления L содержит фрагмент, характеризующийся следующей структурой:

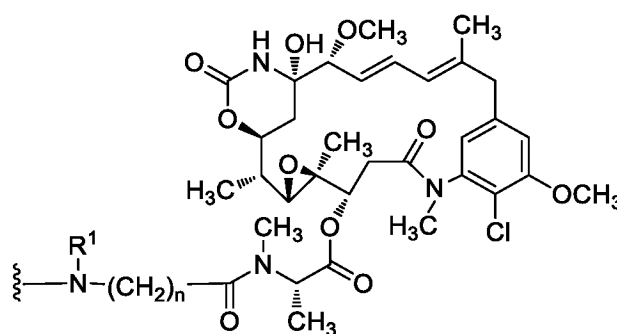


[0287] В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой тубулизин.

[0288] В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой аналог камптотецина.

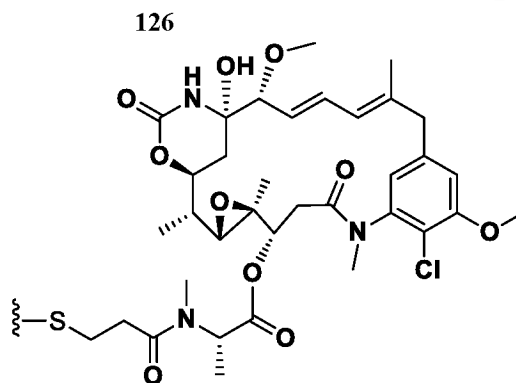
[0289] В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой майтанзиноид.

[0290] В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой:

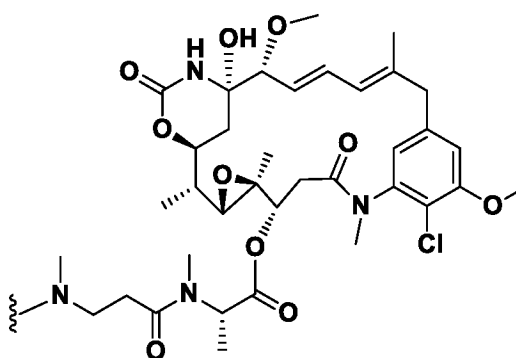


где R¹ представляет собой алкил.

[0291] В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой:

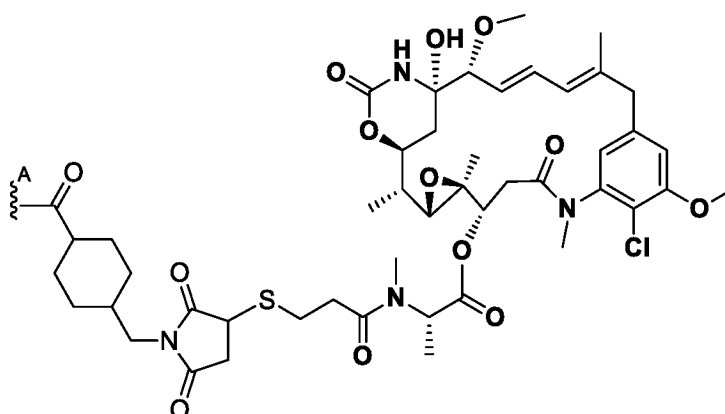


[0292] В некоторых вариантах осуществления Рау представляет собой:



[0293] В некоторых вариантах осуществления n представляет собой целое число от 2 до 5.

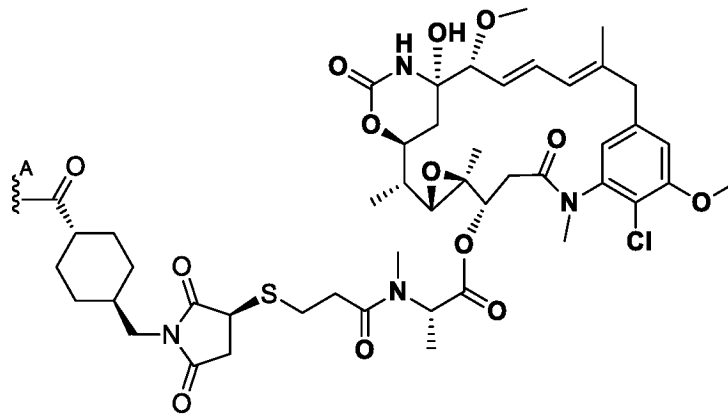
[0294] В некоторых вариантах осуществления -L-Рау представляет собой:



где ξ^A представляет собой связь с антителом.

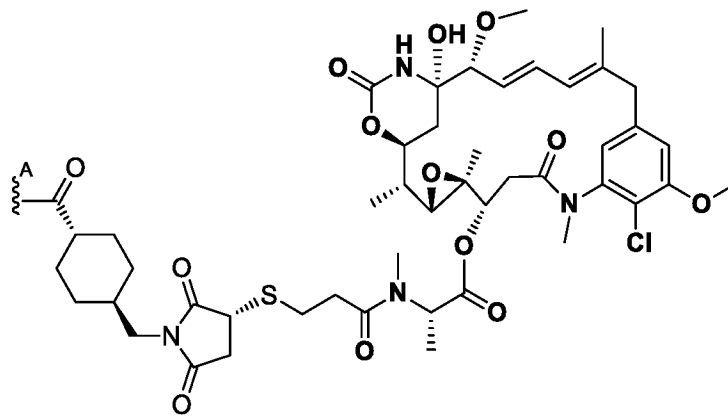
[0295] В некоторых вариантах осуществления -L-Рау представляет

собой:



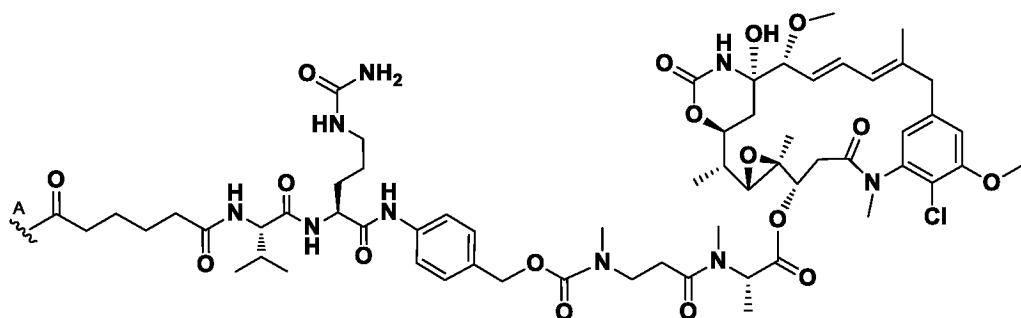
где $\overset{A}{\sim}$ представляет собой связь с антителом.

[0296] В некоторых вариантах осуществления -L-Рау представляет собой



где $\overset{A}{\sim}$ представляет собой связь с антителом.

[0297] В некоторых вариантах осуществления -L-Рау представляет собой:



где ξ^A представляет собой связь с антителом.

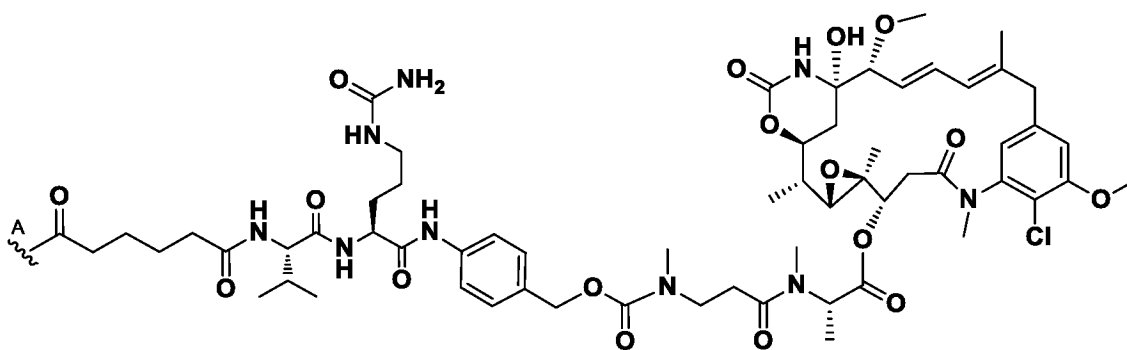
[0298] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16;

L-Pay представляет собой



(майтанзиноид 1ALP),

где ξ^A представляет собой связь с антигенсвязывающим белком, и n представляет собой целое число от 2 до 5.

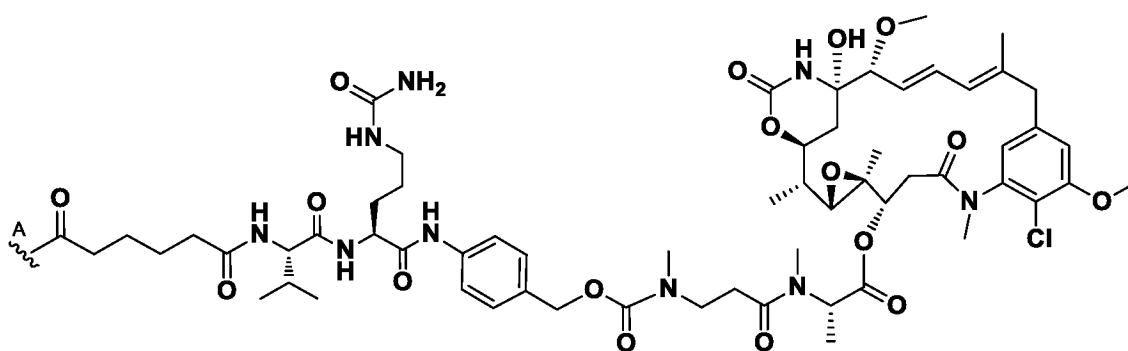
[0299] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34;

L-Pay представляет собой



(майтанзиноид 1ALP),

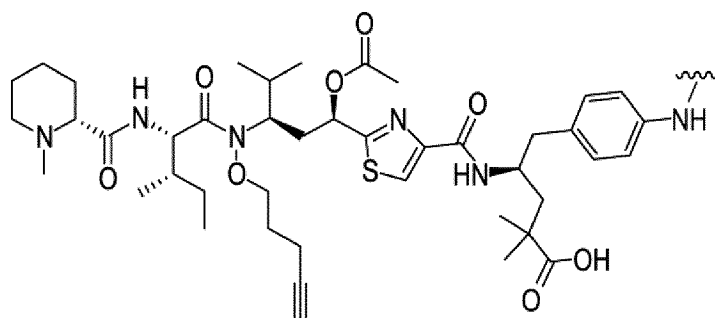
где ξ^A представляет собой связь с антигенсвязывающим белком, и n представляет собой целое число от 2 до 5.

[0300] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16; Pay представляет собой



где ξ^A представляет собой связь с антигенсвязывающим белком, и n представляет собой целое число от 2 до 5.

[0301] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:

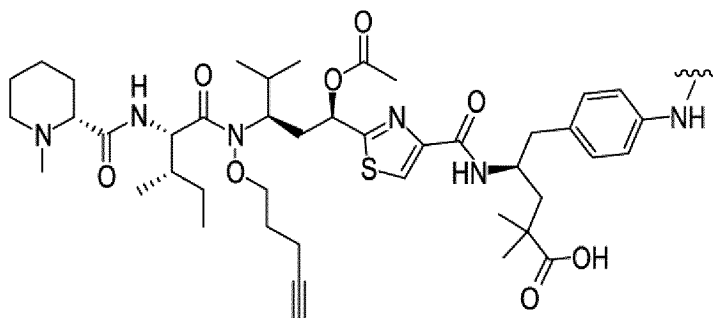


где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под

SEQ ID NO: 34;

Pay представляет собой



где ξ^A представляет собой связь с антигенсвязывающим белком, и n представляет собой целое число от 2 до 5.

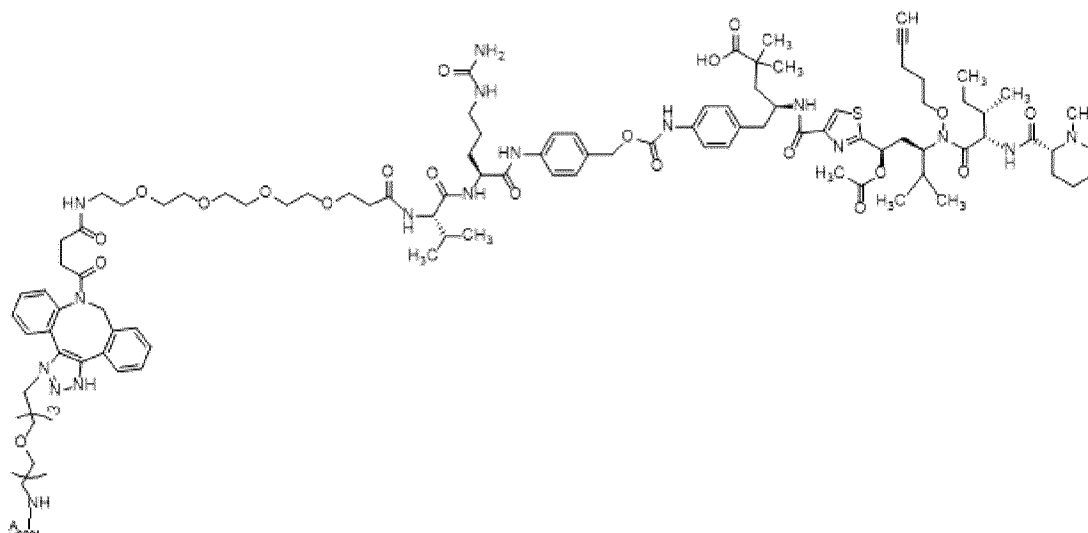
[0302] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16;

L-Pay представляет собой



или его региоизомер циклоприсоединения, где ξ^A представляет собой связь с глутамином тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления n равняется 2. В определенных вариантах осуществления n равняется 2, и L-Pay связан с глутаминами Q295. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4. В определенных вариантах осуществления n равняется 4, и L-Pay связан с глутаминами Q295 и Q297.

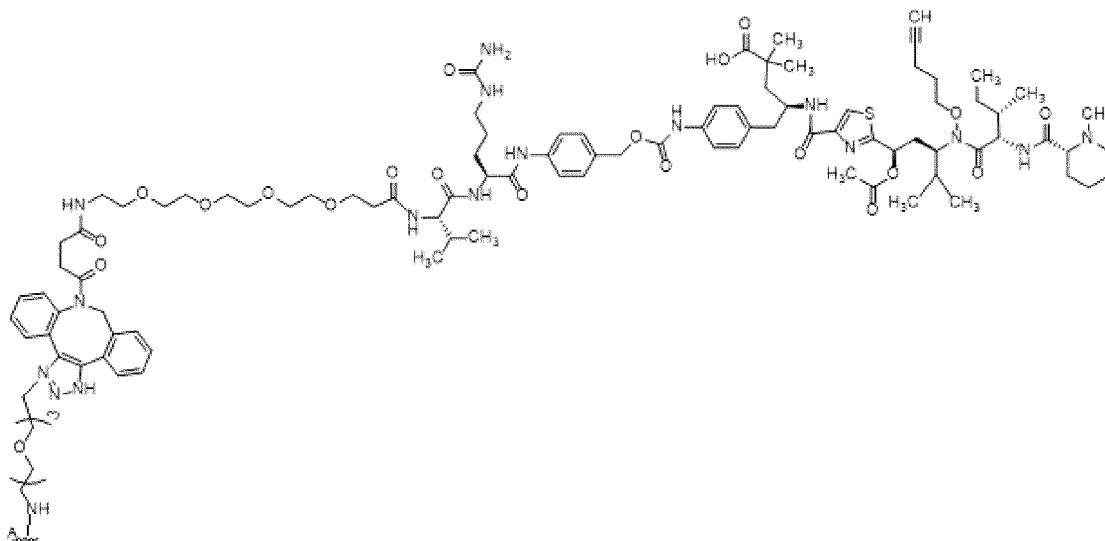
[0303] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34;

L-Рау представляет собой



или его региоизомер циклоприсоединения, где ξ^A представляет собой связь с глутамином тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления n равняется 2. В определенных вариантах осуществления n равняется 2, и L-Рау связан с глутаминами Q295. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4. В определенных вариантах осуществления n равняется 4, и L-Рау связан с глутаминами Q295 и Q297.

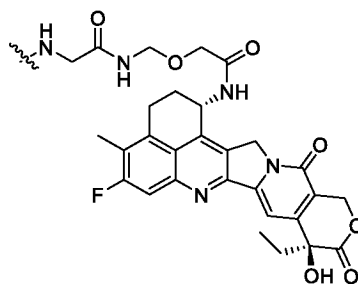
[0304] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



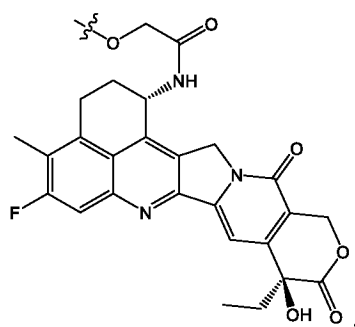
где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 13.

NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16; Pay представляет собой



или



где \sim представляет собой точку присоединения к антителу посредством линкера, и n представляет собой целое число от 2 до 8.

[0305] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:

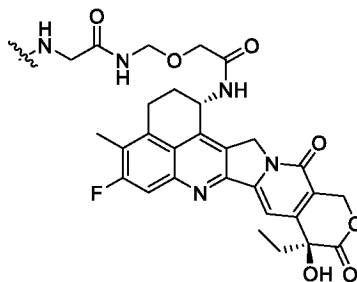


где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

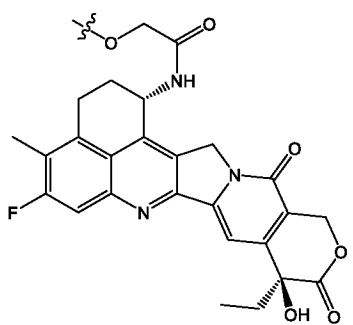
(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под

SEQ ID NO: 34;

Pay представляет собой



или



где \sim представляет собой точку присоединения к антителу посредством линкера, и n представляет собой целое число от 2 до 8.

[0306] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:

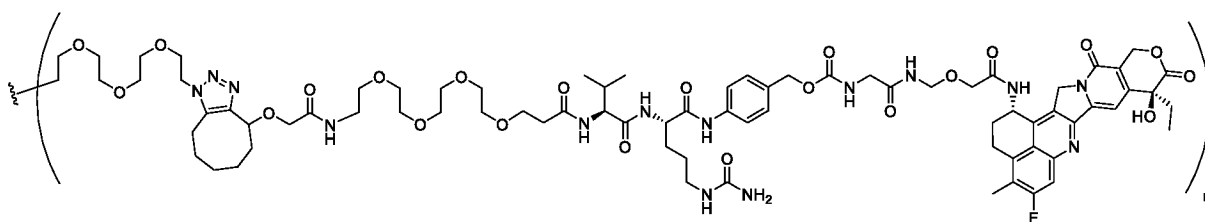


где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

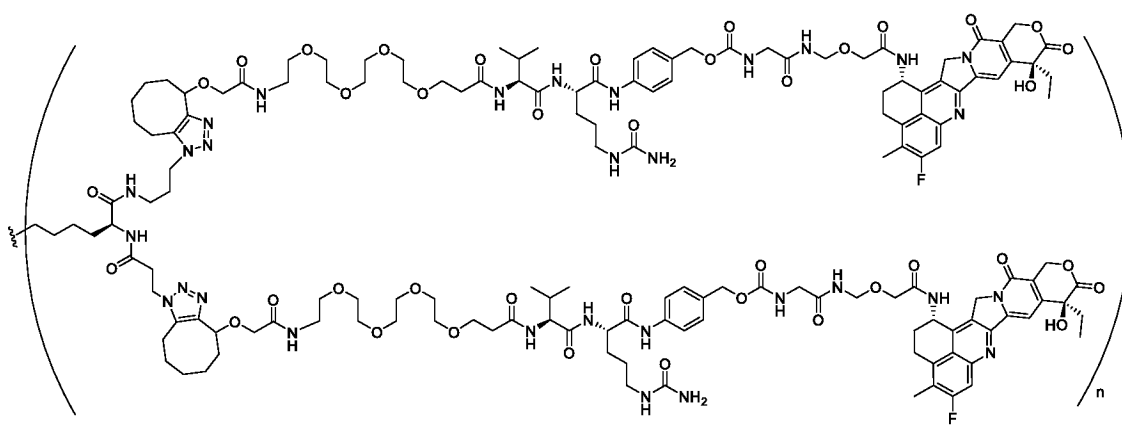
(i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под

SEQ ID NO: 16;

L-Рау представляет собой



ИЛИ



где L-рау связан с Ab посредством глутамина тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления n равняется 2. В определенных вариантах осуществления n равняется 2, и L-Рау связан с глутаминами Q295. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4. В определенных вариантах осуществления n равняется 4, и L-Рау связан с глутаминами Q295 и Q297. В некоторых вариантах осуществления n равняется 6. В некоторых вариантах осуществления n равняется 8. В некоторых вариантах осуществления n равняется 8, L является разветвленным, и L-Рау связан с Q295 и Q297.

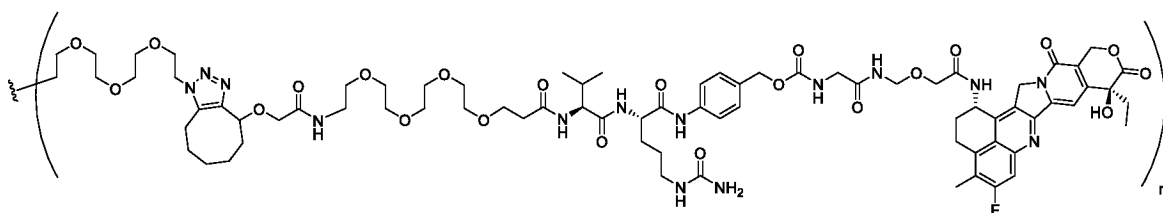
[0307] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты характеризуются следующей структурой:



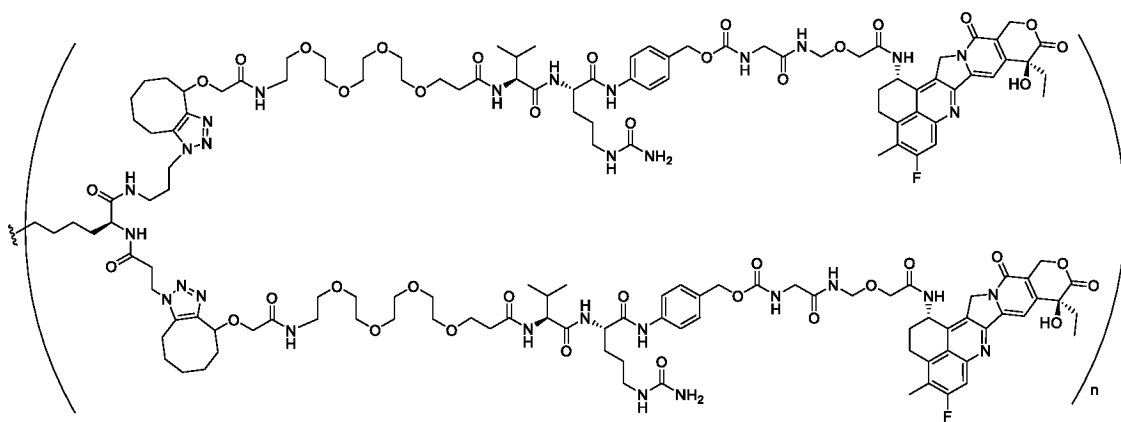
где: Ab представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34;

L-Рау представляет собой



ИЛИ



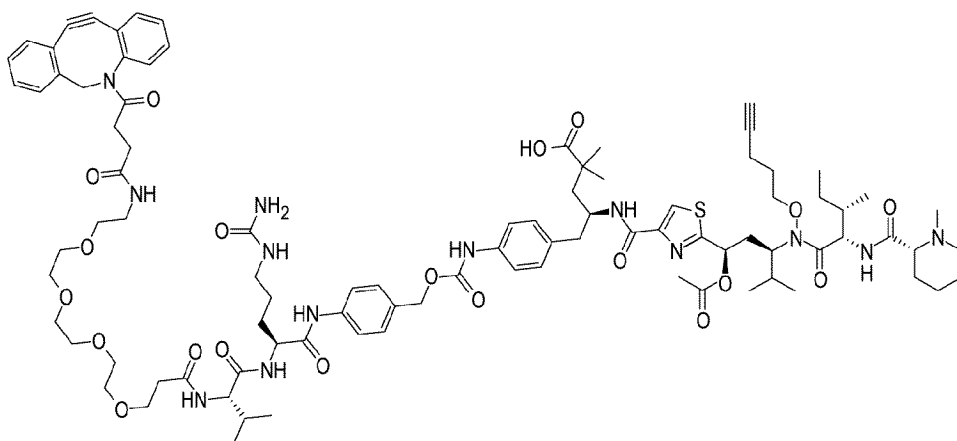
где L-Рау связан с Ab посредством глутамина тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления n равняется 2. В определенных вариантах осуществления n равняется 2, и L-Рау связан с глутаминами Q295. В некоторых вариантах осуществления n равняется 4. В определенных вариантах осуществления n равняется 4, и L-Рау связан с глутаминами Q295 и Q297. В некоторых вариантах осуществления n равняется 6. В некоторых вариантах осуществления n равняется 8. В некоторых вариантах осуществления n равняется 8, L является разветвленным, и L-Рау связан с Q295 и Q297.

[0308] Конъюгаты антитело-лекарственное средство, описанные в данном документе, можно получать с применением условий конъюгации, известных специалистам в данной области техники (см., например, *Doronina et al. Nature Biotechnology* 2003, 21, 7, 778, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте). В некоторых вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство на основе антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента получают посредством приведения антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в данном документе, в контакт с соединением, содержащим требуемый линкер и цитотоксическое средство, где указанный линкер содержит фрагмент, который реагирует с антителом или антигенсвязывающим белком, например, по требуемому остатку антитела или антигенсвязывающего белка.

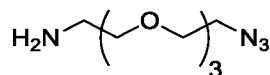
[0309] В некоторых вариантах осуществления конъюгаты антитело-лекарственное средство, предусмотренные в данном документе, конъюгированы с глутаминами Q295 и/или Q297 тяжелой цепи. Антитела, содержащие глутамины Q297 тяжелой цепи, можно получить с использованием методик, известных из уровня техники, например, посредством мутации N297Q. См., например, *Bioconjugate Chem.* 2014, 25, 3, 569 (2014). Такие способы конъюгации могут обеспечивать получение конъюгатов антитело-лекарственное средство, характеризующихся DAR 2 или 4. В таких вариантах осуществления, где линкер является разветвленным, способы конъюгации могут обеспечивать получение конъюгатов антитело-лекарственное средство, характеризующихся DAR 6 или 8.

[0310] В некоторых вариантах осуществления такие способы включают введение первого реакционноспособного фрагмента по глутаминам тяжелой цепи путем осуществления реакции антитела с соединением на основе первичного амина, содержащим указанный первый реакционноспособный фрагмент, в присутствии трансглутаминазы с получением антитела, содержащего первый реакционноспособный фрагмент при Q295 и, необязательно, при Q297. Этот продукт можно затем подвергать реакции с полезной нагрузкой, содержащей линкер и комплементарный второй реакционноспособный фрагмент, с получением конъюгатов антитело-лекарственное средство, предусмотренных в данном документе. В

некоторых вариантах осуществления первый реакционноспособный фрагмент представляет собой азид. В некоторых вариантах осуществления второй реакционноспособный фрагмент представляет собой циклоалкин. В некоторых вариантах осуществления полезная нагрузка, содержащая линкер и комплементарный второй реакционноспособный фрагмент, представляет собой:

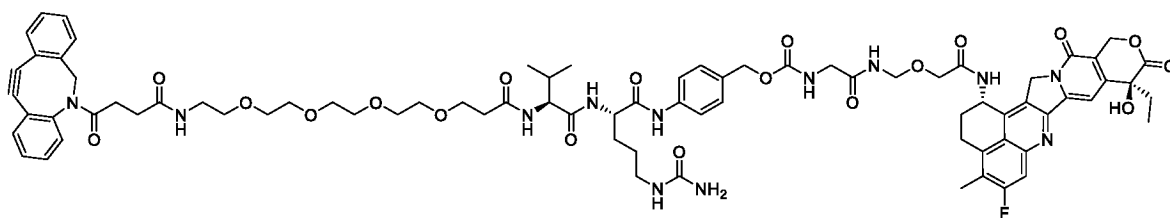


которую можно получить с применением способов, описанных в заявке на патент США № 16/724164, поданной 20 декабря 2019 г. (например, описанное в ней соединение LP4). В определенных вариантах осуществления соединение на основе



первичного амина представляет собой

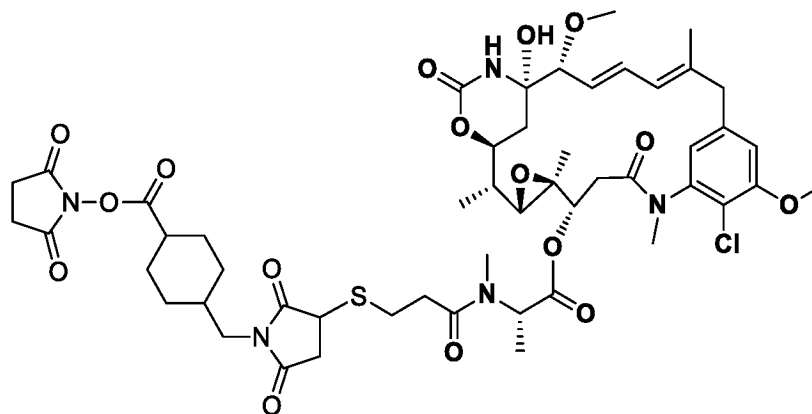
[0311] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающие приведение антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, в контакт с соединением



где антитело к FGFR2 функционализовано азидом.

[0312] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающие приведение антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего

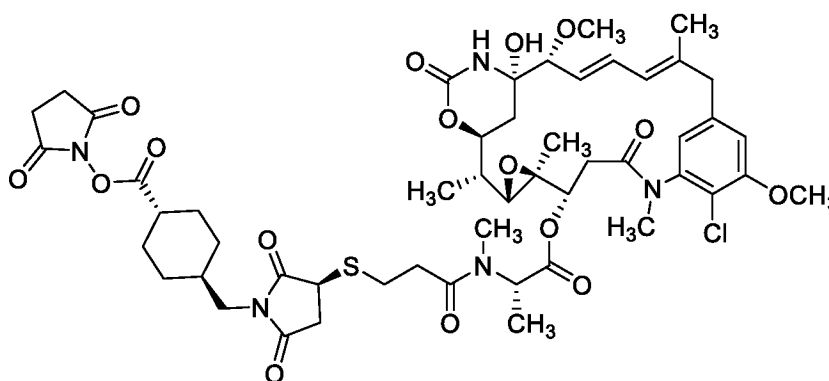
фрагмента, описанного в данном документе, в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой A¹:

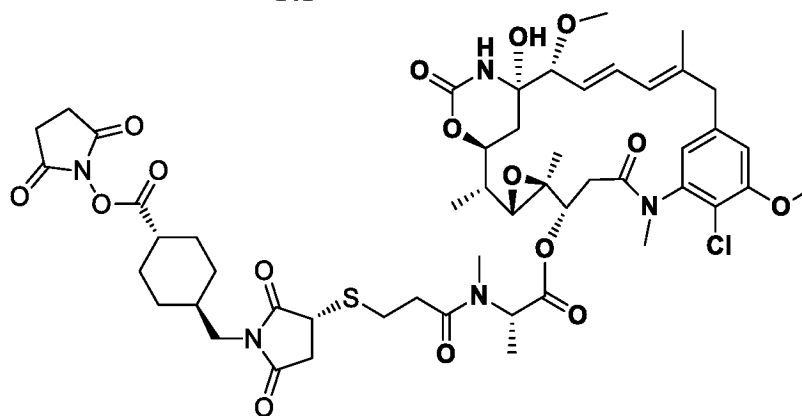
A¹,

и водным разбавителем.

[0313] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы A¹ присутствует в стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы A¹ присутствует в 5—6-кратном стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления водный разбавитель содержит HEPES. В некоторых вариантах осуществления водный разбавитель содержит DMA.

[0314] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы A¹ представляет собой соединение формулы A² или A³:

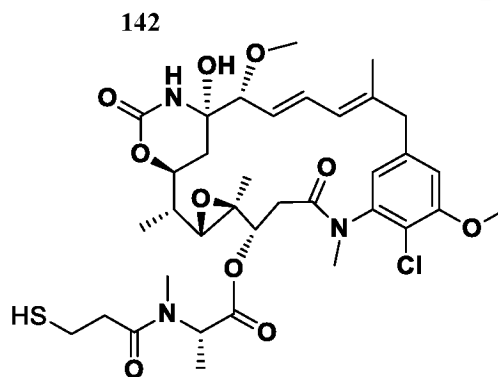
A²,

A³.

[0315] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы A² представляет собой стереометрически чистое соединение A³. В некоторых вариантах осуществления соединения формулы A¹ содержит соединение формулы A¹ или A², где соединение A¹ или A² присутствует в диастереомерном избытке, составляющем более чем 50%. В определенных вариантах осуществления диастереомерный избыток составляет более чем 70%. В определенных вариантах осуществления диастереомерный избыток составляет более чем 90%. В определенных вариантах осуществления диастереомерный избыток составляет более чем 95%.

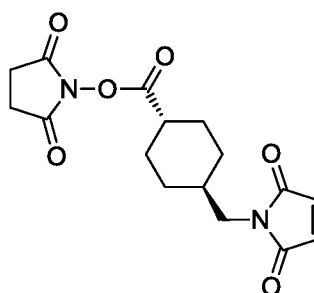
[0316] Термин «диастереомерный избыток» относится к разнице между молярной долей одного требуемого диастереомера по сравнению с остальными диастереомерами в композиции. Диастереомерный избыток рассчитывается следующим образом: (количество одного диастереомера)-(количество других диастереомеров)/1. Например, композиция, которая содержит 90% 1 и 10% 2, 3, 4 или их смеси, характеризуется диастереомерным избытком, составляющим 80% [(90-10)/1]. Композиция, которая содержит 95% 1 и 5% 2, 3, 4 или их смеси, характеризуется диастереомерным избытком, составляющим 90% [(95-5)/1]. Композиция, которая содержит 99% 1 и 1% 2, 3, 4 или их смеси, характеризуется диастереомерным избытком, составляющим 98% [(99-1)/1]. Диастереомерный избыток аналогичным образом можно рассчитать для любого из 1, 2, 3 или 4.

[0317] В некоторых вариантах осуществления соединения формулы A¹ получают посредством приведения в контакт соединения формулы (a):



(a),

с соединением формулы (b)

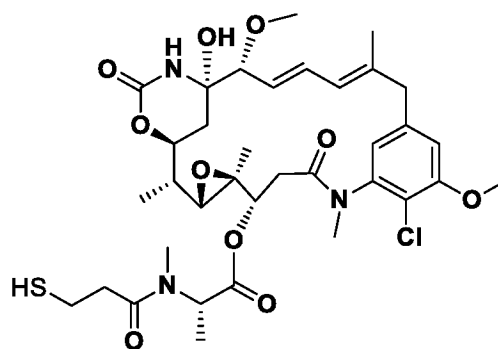


(b),

в присутствии силикагеля и разбавителя. В некоторых вариантах осуществления разбавитель содержит органический растворитель и воду.

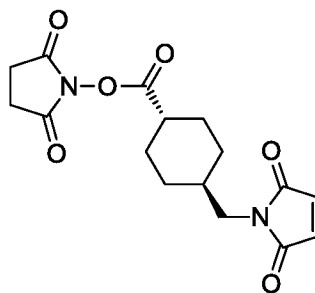
[0318] В данном документе также предусмотрен продукт, получаемый посредством способа:

(i) приведения в контакт соединения формулы (a):



(a),

с соединением формулы (b):

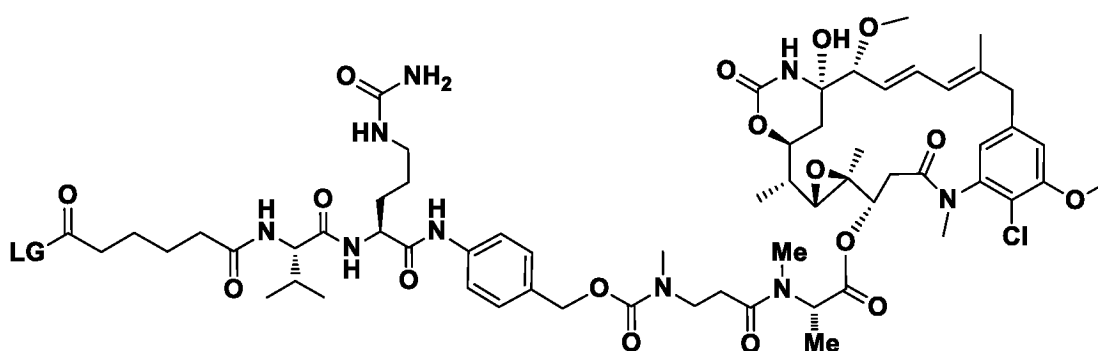


(b),

в присутствии силикагеля и разбавителя с синтезом промежуточного соединения, и

(ii) приведения антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, в контакт с промежуточным соединением и водным разбавителем.

[0319] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены способы получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающие приведение антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой В:



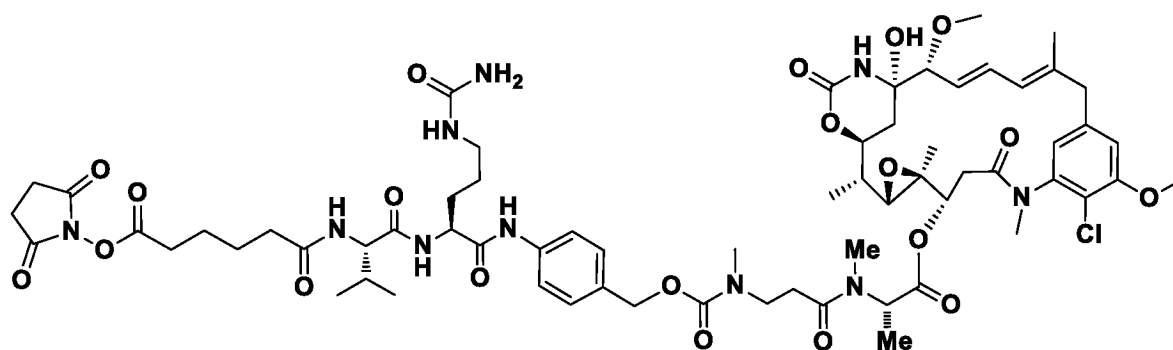
В,

где LG представляет собой уходящую группу, и водным разбавителем.

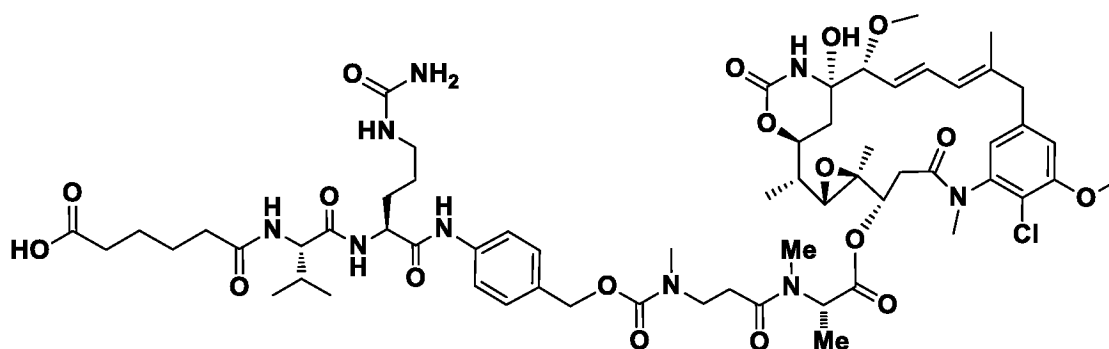
[0320] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы В

присутствует в стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления соединение формулы В присутствует в 5—6-кратном стехиометрическом избытке. В некоторых вариантах осуществления водный разбавитель содержит HEPES. В некоторых вариантах осуществления водный разбавитель содержит DMA. В некоторых вариантах осуществления $-C(O)-LG$ представляет собой сложный эфир, например, NHS или сложный трифторфениловый эфир.

[0321] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы В представляет собой соединение формулы В¹:

В¹.

[0322] В некоторых вариантах осуществления соединение формулы В¹ получают посредством приведения в контакт соединения формулы С:

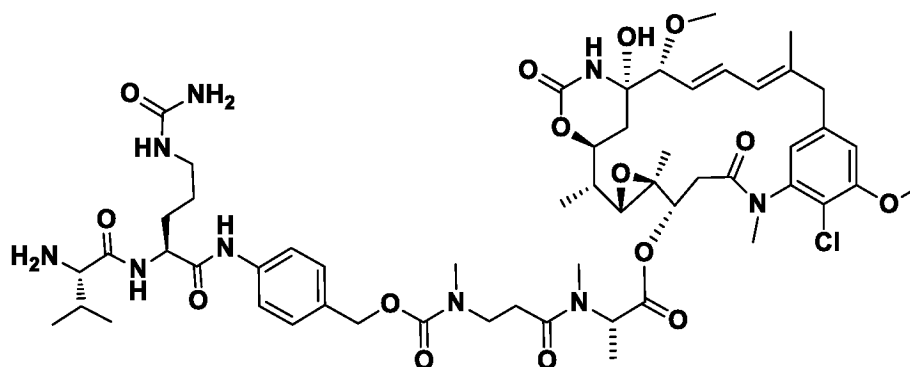


С,

с N-гидроксисукцинимидом (NHS), реагентом для образования пептидной связи и органическим разбавителем. Подходящие реагенты для образования пептидной связи включают реагенты, которые активируют, т. е. делают реакционноспособными остатки карбоновой кислоты для реакции с нуклеофилом. В

определенных вариантах осуществления реагент для образования пептидной связи представляет собой гидрохлорид N-(3-диметиламинопропил)-N'-этилкарбодиимида (EDC). В некоторых вариантах осуществления органический растворитель представляет собой дихлорметан.

[0323] В некоторых вариантах осуществления соединения формулы С получают посредством приведения в контакт соединения формулы D:



D,

с адипиновой кислотой, средством для образования пептидной связи и органическим растворителем. В определенных вариантах осуществления средство для образования пептидной связи представляет собой 2-этокси-1-этоксикарбонил-1,2-дигидрохинолин (EEDQ). В определенных вариантах осуществления органический растворитель содержит дихлорметан. Соединение D можно получать, как описано в WO2014/145090.

Эпитопное картирование и связанные с ним технологии

[0324] Термин «эпитоп» относится к сайту на антигене, в отношении которого у В- и/или Т-клеток развивается ответ. В-клеточные эпитопы могут образовываться как из смежных аминокислот, так и из несмежных аминокислот, сближенных за счет укладки белка в третичную структуру. Эпитопы, образованные смежными аминокислотами, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, в то время как эпитопы, образованные за счет укладки в третичную структуру, как правило, утрачиваются при обработке денатурирующими растворителями. Как правило, эпитоп содержит по меньшей мере 3, а чаще по меньшей мере 5 или 8—10 аминокислот в уникальной пространственной

конформации.

[0325] В данном документе предусмотрены антитела к FGFR2, которые взаимодействуют с одной или более аминокислотами, обнаруженными в белке FGFR2.

[0326] Эпитоп, с которым связываются антитела и их антигенсвязывающие фрагменты, может состоять из одной непрерывной последовательности из 3 или больше (например, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20 или больше) аминокислот белка FGFR2. В качестве альтернативы, релевантный эпитоп может состоять из множества несмежных аминокислот (или аминокислотных последовательностей) FGFR2 (например, конформационный эпитоп).

[0327] Для определения эпитопа на FGFR2, с которым взаимодействуют антитела и антигенсвязывающие домены по настоящему изобретению, можно использовать различные методики, известные специалистам в данной области техники. Иллюстративные методики, которые можно использовать для определения эпитопа или связывающего домена конкретного антитела или антигенсвязывающего домена, включают, например, точечный мутагенез (например, аланин-сканирующий мутагенез, аргинин-сканирующий мутагенез и т. п.), анализ посредством пептидного блоттинга (Reineke, 2004, *Methods Mol Biol* 248:443—463), защиту от протеаз и анализ расщепления пептидов. Кроме того, можно использовать такие способы, как вырезание эпитопа, выделение эпитопа и химическая модификация антигенов (Tomer, 2000, *Protein Science* 9:487—496). Другим способом, который можно использовать для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, является водородно-дейтериевый обмен, выявляемый посредством масс-спектрометрии. В общих чертах метод водородно-дейтериевого обмена включает мечение дейтерием представляющего интерес белка с последующим связыванием антитела с белком, меченным дейтерием. Затем комплекс белок/антитело переносят в воду и способные к обмену протоны в аминокислотах, которые защищены комплексом с антителом, подвергаются обратному дейтерий-водородному обмену с более низкой скоростью, чем способные к обмену протоны в аминокислотах, которые не являются частью поверхности

взаимодействия. В результате аминокислоты, которые образуют часть поверхности взаимодействия белок/антитело, способны удерживать дейтерий и, таким образом, демонстрировать относительно более высокую массу по сравнению с аминокислотами, не включенными в поверхность взаимодействия. После диссоциации антитела целевой белок подвергают расщеплению протеазами и масс-спектрометрическому анализу, за счет чего выявляют остатки, меченные дейтерием, которые соответствуют конкретным аминокислотам, с которыми взаимодействует антитело. См., например, Ehring (1999) *Analytical Biochemistry* 267(2):252—259; Engen and Smith (2001) *Anal. Chem.* 73:256A—265A. Для идентификации аминокислот в пределах полипептида, с которым взаимодействует антитело, также можно использовать рентгеноструктурный анализ.

[0328] Кроме того, в данном документе предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с тем же эпитопом, что и любое из специфических иллюстративных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 3 в данном документе). Сходным образом, в данном документе также предусмотрены антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, которые конкурируют за связывание с FGFR2 с любым из специфических иллюстративных антител, описанных в данном документе (например, антитела, содержащие любую из аминокислотных последовательностей, представленных в таблице 3 в данном документе).

[0329] Используя стандартные способы, известные из уровня техники и представленные в данном документе в качестве примера, можно легко определить, связывается ли антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к FGFR2, или конкурирует с ним за связывание. Например, чтобы определить, связывается ли тестируемое антитело с тем же эпитопом, что и эталонное антитело к FGFR2, предусмотренное в данном документе, обеспечивается возможность связывания эталонного антитела с белком FGFR2. Затем оценивают способность тестируемого антитела связываться с молекулой FGFR2. Если тестируемое антитело способно связываться с FGFR2 после насыщающего связывания с применением эталонного

антитела к FGFR2, то можно сделать вывод, что тестируемое антитело связывается с другим эпитопом, отличным от эпитопа, с которым связывается эталонное антитело к FGFR2. С другой стороны, если тестируемое антитело не способно связываться с молекулой FGFR2 после насыщающего связывания с эталонным антителом к FGFR2, то тестируемое антитело способно связываться с тем же эпитопом, что и эпитоп, связанный с эталонным антителом к FGFR2. Затем можно провести дополнительные стандартные эксперименты (например, анализы с внесением в пептиды мутаций и анализы связывания) для того, чтобы подтвердить, действительно ли наблюдаемое отсутствие связывания тестируемого антитела обусловлено связыванием с тем же эпитопом, как у эталонного антитела, или что причиной отсутствия наблюдаемого связывания является стерическое блокирование (или другое явление). Эксперименты такого типа можно проводить с применением ELISA, RIA, Biacore, проточной цитометрии или любого другого количественного или качественного анализа связывания антитела, доступного в данной области техники. В соответствии с определенными вариантами осуществления два антитела связываются с одним и тем же (или перекрывающимся) эпитопом, если, например, 1-, 5-, 10-, 20- или 100-кратный избыток одного антитела подавляет связывание другого на по меньшей мере 50%, но предпочтительно 75%, 90% или даже 99%, при измерении посредством анализа конкурентного связывания (см., например, Junghans et al., *Cancer Res.* 1990;50:1495—1502). В качестве альтернативы, считается, что два антитела связываются с одним и тем же эпитопом, если практически все аминокислотные мутации в антигене, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела. Считается, что два антитела имеют «перекрывающиеся эпитопы», если только часть аминокислотных мутаций, которые ослабляют или устраняют связывание одного антитела, ослабляют или устраняют связывание другого антитела.

[0330] Для определения того, конкурирует ли антитело за связывание (или перекрестно конкурирует за связывание) с эталонным антителом к FGFR2, описанную выше методику исследования связывания осуществляют в двух направлениях: в первом направлении обеспечивается возможность связывания эталонного антитела с белком FGFR2 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания тестируемого антитела с молекулой FGFR2. Во втором направлении

обеспечивается возможность связывания тестируемого антитела с молекулой FGFR2 в условиях насыщения с последующей оценкой связывания эталонного антитела с молекулой FGFR2. Если в обоих направлениях только первое (насыщающее) антитело способно связываться с молекулой FGFR2, то делается заключение, что тестируемое антитело и эталонное антитело конкурируют за связывание с FGFR2. Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело, которое конкурирует за связывание с эталонным антителом, необязательно может связываться с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, но может стерически блокировать связывание эталонного антитела за счет связывания перекрывающегося или смежного эпитопа.

Получение человеческих антител

[0331] Способы получения человеческих антител у трансгенных мышей известны из уровня техники. Любые такие известные способы можно применять в контексте настоящего изобретения для получения человеческих антител, которые специфически связываются с FGFR2. Для получения антител к FGFR2 можно использовать иммуноген, предусматривающий любое из следующего. В определенных вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению получают от мышей, иммунизированных FGFR2b, например, последовательность под номером доступа GenBank NP_075259.4 (SEQ ID NO: 55) или внеклеточный домен изоформы рекомбинантного человеческого FGFR2b (номер доступа NP_075259.4) сливают с мышинным Fc-доменом (номер доступа P01863) (SEQ ID NO: 56). В качестве альтернативы, белок FGFR2 или его фрагмент можно получить с использованием стандартных биохимических методик, а также модифицировать и использовать в качестве иммуногена. В одном варианте осуществления иммуноген представляет собой рекомбинантный белок FGFR2 или его фрагмент. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой коммерчески доступный белок FGFR2. В определенных вариантах осуществления можно вводить одну или более бустерных инъекций. В определенных вариантах осуществления бустерные инъекции могут содержать один или более коммерчески доступных белков FGFR2. В определенных вариантах осуществления иммуноген может представлять собой рекомбинантный белок FGFR2, экспрессируемый в

клетках *E. coli* или в любых других эукариотических клетках или клетках млекопитающих, таких как клетки яичника китайского хомячка (CHO).

[0332] С применением технологии VELOCIMMUNE® (см., например, US 6596541, Regeneron Pharmaceuticals, VELOCIMMUNE®) или любого другого известного способа получения моноклональных антител первоначально выделяют химерные антитела к FGFR2 с высокой аффинностью, содержащие человеческую переменную область и мышиную константную область. Технология VELOCIMMUNE® предусматривает получение трансгенной мыши, имеющей геном, содержащий человеческие переменные области тяжелых и легких цепей, функционально связанные с эндогенными локусами мышинных константных областей, за счет чего мышь в ответ на стимуляцию антигеном продуцирует антитело, содержащее человеческую переменную область и мышиную константную область. ДНК, кодирующую переменные области тяжелых и легких цепей антитела, выделяют и осуществляют функциональное связывание с ДНК, кодирующей человеческие константные области тяжелой и легкой цепей. Затем экспрессируют ДНК в клетке, способной к экспрессии полностью человеческого антитела.

[0333] Как правило, мыши VELOCIMMUNE® вводят представляющий интерес антиген, и из организма мышей, которые экспрессируют антитела, выделяют лимфатические клетки (такие как В-клетки). Лимфатические клетки можно подвергать слиянию с линией клеток миеломы с получением immortalized lines of cells of hybridoma, и такие линии клеток гибридомы подвергают скринингу и отбирают для идентификации линий клеток гибридомы, которые продуцируют антитела, специфические к антигену, представляющему интерес. ДНК, кодирующая переменные области тяжелой цепи и легкой цепи, может быть выделена и связана с константными областями требуемых изотипов тяжелой цепи и легкой цепи. Такой белок, представляющий собой антитело, может продуцироваться в клетке, такой как клетка CHO. В качестве альтернативы, ДНК, кодирующую антигенспецифические химерные антитела или переменные домены легкой и тяжелой цепей, можно выделять непосредственно из антигенспецифических лимфоцитов.

[0334] Сначала выделяют высокоаффинные химерные антитела,

имеющие человеческую переменную область и мышиную константную область. Как показано в экспериментальном разделе ниже, антитела характеризуют и отбирают в отношении требуемых характеристик, включая аффинность, селективность, эпитоп и т. п. Мышиные константные области заменяют на требуемую человеческую константную область с получением полностью человеческого антитела, например, IgG1 или IgG4 дикого типа или модифицированного IgG1 или IgG4. Хотя отобранная константная область может варьироваться в зависимости от конкретного применения, характеристики, касающиеся высокой аффинности связывания антигена или специфичности к мишени, присущи переменной области. В определенных случаях полностью человеческие антитела к FGFR2 выделяют непосредственно из антиген-положительных В-клеток.

Биоэквиваленты

[0335] Антитела к FGFR2 и их фрагменты, предусмотренные в данном документе, охватывают белки, характеризующиеся аминокислотными последовательностями, которые отличаются от последовательностей описанных антител, но которые сохраняют способность связывать FGFR2 человека. Такие варианты антител и фрагментов антител содержат одно или более добавлений, делеций или замен аминокислот при сравнении с исходной последовательностью, но проявляют биологическую активность, которая практически эквивалентна активности описанных антител. Сходным образом, последовательности ДНК по настоящему изобретению, кодирующие антитело к FGFR2, охватывают последовательности, которые содержат одно или более добавлений, делеций или замен нуклеотидов при сравнении с раскрытой последовательностью, но которые кодируют антитело к FGFR2 или фрагмент антитела, которые практически биоэквивалентны антителу к FGFR2 или фрагменту антитела по настоящему изобретению. Примеры таких вариантов аминокислотных последовательностей и последовательностей ДНК обсуждались выше.

[0336] Два антигенсвязывающих белка или антитела считаются биоэквивалентами, если, например, они являются фармацевтическими эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, у которых скорость и степень поглощения не демонстрируют значительной разницы при введении с одинаковой молярной дозой

в сходных экспериментальных условиях, как в случае однократной дозы, так и в случае нескольких доз. Некоторые антитела будут считаться эквивалентами или фармацевтическими альтернативами, если они являются эквивалентами по степени их поглощения, но не по скорости их поглощения, и все же могут считаться биоэквивалентами, поскольку такие различия в скорости поглощения являются предусмотренными и отражены в информации по лекарственному препарату, не являются необходимыми для достижения в организме эффективных концентраций лекарственного средства, например, при длительном применении, и считаются не значимыми с медицинской точки зрения в случае конкретного исследуемого продукта, представляющего собой лекарственное средство.

[0337] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если отсутствуют клинически значимые различия в отношении их безопасности, чистоты и эффективности.

[0338] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если пациента можно перевести один или более раз с эталонного продукта на биологический продукт без ожидаемого повышения риска возникновения побочных эффектов, в том числе значимого с клинической точки зрения изменения иммуногенности или снижения эффективности по сравнению с таковой при продолжении терапии без такого перевода.

[0339] В одном варианте осуществления два антигенсвязывающих белка являются биоэквивалентами, если они оба действуют согласно общему механизму или механизмам действия при условии или условиях применения, в том объеме, в котором такие механизмы известны.

[0340] Биоэквивалентность можно продемонстрировать посредством способов *in vivo* и *in vitro*. Измерения степени биоэквивалентности включают, например, (a) тест *in vivo* у людей или других млекопитающих, в котором концентрация антитела или его метаболитов измеряется в крови, плазме крови, сыворотке крови или других биологических жидкостях в виде зависимости от времени; (b) тест *in vitro*, который коррелировал с данными биодоступности *in vivo* у человека и с достаточной точностью предсказывал их; (c) тест *in vivo* у людей или

других млекопитающих, у которых соответствующий ранний фармакологический эффект антитела (или его мишени) измеряется в виде зависимости от времени, и (d) строго контролируемое клиническое испытание, в котором устанавливается безопасность, эффективность или биодоступность или биоэквивалентность антитела.

[0341] Биоэквивалентные варианты антител к FGFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов, предусмотренные в данном документе, можно конструировать посредством, например, осуществления различных замен остатков или последовательностей или делеции концевых или внутренних остатков или последовательностей, которые не являются необходимыми для биологической активности. Например, остатки цистеина, не являющиеся необходимыми для биологической активности, можно подвергнуть делеции или заменить другими аминокислотами для предупреждения образования нежелательных или несоответствующих внутримолекулярных дисульфидных мостиков при ренатурации. В других ситуациях биоэквивалентные антитела могут включать варианты антител к FGFR2, содержащие аминокислотные изменения, которые модифицируют характеристики гликозилирования антител, например, мутации, которые обеспечивают устранение или удаление гликозилирования.

Видовая селективность и межвидовая перекрестная реактивность

[0342] Настоящее изобретение в соответствии с определенными вариантами осуществления предусматривает антитела к FGFR2 (и антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающие домены, связывающие FGFR2), которые связываются с FGFR2 человека, но не с FGFR2 других видов. Настоящее изобретение также включает антитела к FGFR2 (и антигенсвязывающие молекулы, содержащие антигенсвязывающие домены, связывающие FGFR2), которые связываются с FGFR2 человека и с FGFR2 одного или более видов, отличных от человека. Например, антитела к FGFR2 и антигенсвязывающие молекулы могут связываться с FGFR2 человека и могут связываться или не связываться, в зависимости от конкретного случая, с одним или более из FGFR2 мыши, крысы, морской свинки, хомяка, песчанки, свиньи, кошки, собаки, кролика, козы, овцы, коровы, лошади, верблюда, яванского макака, мартышки, макака-резуса или шимпанзе.

Составление и введение терапевтического средства

[0343] В данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие антитела к FGFR2, включая ADC, связывающие FGFR2, по настоящему изобретению. Фармацевтические композиции можно составлять с подходящими носителями, вспомогательными веществами и другими средствами, которые обеспечивают улучшение переноса, доставки, переносимости и т. п.

[0344] В некоторых аспектах предусмотрена фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество одного или более выделенных человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов, описанных в данном документе, вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

Пути терапевтического применения антител

[0345] В данном документе предусмотрены способы, включающие введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтической композиции, содержащей антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, включая ADC на основе антитела к FGFR2, содержащие любую из последовательностей, представленных в данном документе. Терапевтическая композиция может содержать любое из антител к FGFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов, включая ADC на основе антитела к FGFR2, раскрытые в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель или разбавитель. В некоторых аспектах терапевтические композиции используют в изготовлении лекарственного препарата для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения, ассоциированного с экспрессией, передачей сигнала или активностью FGFR2 или опосредованного ими, или поддающегося лечению путем блокирования передачи сигнала FGFR2 или иного ингибирования активности и/или передачи сигнала FGFR2. В некоторых аспектах терапевтические композиции используют в изготовлении лекарственного препарата для лечения рака.

[0346] Антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, применимы, среди прочего, для лечения, предупреждения и/или ослабления любого заболевания или нарушения,

ассоциированного с экспрессией, передачей сигнала или активностью FGFR2 или опосредованного ими, или поддающегося лечению путем блокирования передачи сигнала FGFR2 или иного подавления активности и/или передачи сигнала FGFR2.

[0347] Например, антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, по настоящему изобретению применимы для лечения опухолей, которые экспрессируют (или сверхэкспрессируют) FGFR2, в частности FGFR2b. В некоторых вариантах осуществления антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, связывают клетки, положительные в отношении FGFR2b, например, клетки SNU-16 и MFM-223. В некоторых вариантах осуществления антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, в минимальной степени связываются с FGFR2c-положительными клетками, например, клетками NCI-H716. В некоторых вариантах осуществления антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, плохо связываются с клетками, лишенными экспрессии FGFR2, например, с клетками IM-9.

[0348] В некоторых вариантах осуществления антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, демонстрируют уничтожение FGFR2b-положительных клеток, но не клеток с низким уровнем экспрессии FGFR2. В некоторых аспектах уничтожение клеток составляет менее чем приблизительно 15%, менее чем приблизительно 10%, менее чем приблизительно 5% или менее чем приблизительно 2% клеток, экспрессирующих FGFR2 на низких уровнях.

[0349] В некоторых вариантах осуществления антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, демонстрируют уничтожение FGFR2b-положительных клеток, но не FGFR2c-положительных клеток. В некоторых аспектах уничтожение клеток составляет менее чем приблизительно 35%, менее чем приблизительно 30%, менее чем приблизительно 20%, менее чем приблизительно 10% или менее чем приблизительно 1% клеток, экспрессирующих FGFR2c.

[0350] В определенных вариантах осуществления антитела к FGFR2

или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, применимы для лечения одного или более из следующих видов рака: астроцитомы, рака мочевого пузыря, рака крови, рака кости, рака головного мозга, рака молочной железы, рака шейки матки, светлоклеточной почечноклеточной карциномы, колоректального рака, колоректального рака с умеренным уровнем микросателлитной нестабильности, плоскоклеточной карциномы кожи, диффузной В-крупноклеточной лимфомы, рака эндометрия, рака пищевода, фибросаркомы, рака желудка, глиобластомы, мультиформной глиобластомы, плоскоклеточной карциномы головы и шеи, печеночноклеточной карциномы, лейкоза, рака печени, лейомиосаркомы, рака легкого, лимфомы, меланомы, мезотелиомы, миеломы, рака носоглотки, немелкоклеточного рака легкого, остеосаркомы, рака яичника, рака поджелудочной железы, первичного и/или рецидивирующего рака, рака предстательной железы, почечноклеточной карциномы, рабдомиосаркомы, мелкоклеточного рака легкого, плоскоклеточного рака, синовиальной саркомы, рака щитовидной железы, трижды отрицательного рака молочной железы, рака матки и опухоли Вильмса. В некоторых аспектах рак представляет собой первичный рак. В некоторых аспектах рак представляет собой метастатический и/или рецидивирующий рак.

[0351] В некоторых аспектах антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, можно применять для лечения первичных и/или метастатических опухолей, положительных в отношении FGFR2b, т. е. опухолей, возникающих в головном мозге и мозговых оболочках, ротоглотке, легком и бронхиальном дереве, желудочно-кишечном тракте, мужском и женском репродуктивных трактах, мышцах, костях, коже и придатках, соединительной ткани, селезенке, иммунной системе, кроветворных клетках и костном мозге, печени и мочевыводящих путях, а также специальных органах чувств, таких как глаз.

[0352] В контексте способов лечения, описанных в данном документе, антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить в виде монотерапии (т. е. в качестве единственного терапевтического средства), в комбинации с одним или более дополнительными терапевтическими средствами (примеры которых описаны в других местах в данном документе) или в качестве ADC

(примеры которых также описаны в других местах в данном документе).

[0353] Таким образом, в данном документе предусмотрены способы лечения рака у субъекта, страдающего опухолью, сверхэкспрессирующей FGFR2. Способы включают введение субъекту антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, предусмотренных в данном документе. В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: (i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16. В некоторых аспектах антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: (ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34.

[0354] В определенных аспектах рак выбран из группы, состоящей из инвазивной протоковой карциномы молочной железы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, аденокарциномы толстой кишки и аденокарциномы желудочно-пищеводного соединения.

[0355] Также в данном документе предусмотрены способы лечения рака, снижения скорости роста опухоли и/или инициации регрессии опухоли у субъекта. Способы включают введение нуждающемуся в этом субъекту конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксин, где антитело к FGFR2 или его

антигенсвязывающий фрагмент содержит: (i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16, или (ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34. В некоторых аспектах цитотоксин представляет собой тубулизин. В некоторых аспектах цитотоксин представляет собой майтанзиноид. В некоторых аспектах цитотоксин представляет собой аналог камптотецина. В некоторых аспектах цитотоксин представляет собой ауристин.

Комбинированные средства терапии и составы

[0356] В данном документе предусмотрены композиции и терапевтические составы, содержащие любые из антител к FGFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов, включая ADC на основе антитела к FGFR2, описанные в данном документе, в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, и способы лечения, включающие введение таких комбинаций субъектам, нуждающимся в этом.

[0357] Антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, можно объединять в состав и/или вводить в комбинации с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, выбранными из группы, состоящей из другого антагониста FGFR2, например, антагониста FGFR2b (например, бемаритузумаба, или апрутумаба, или апрутумаба иксадотина), антагониста HER2/ErbB2 (например, антитела к ErbB2

[например, трастузумаба, или T-DM1 {KADCYLA®}, или трастузумаба дерукстикана {T-SXD; ингибитора ДНК-топоизомеразы 1}], или низкомолекулярного ингибитора активности ErbB2), антагониста другого представителя семейства EGFR, такого как ErbB3 или ErbB4 (например, антитела к ErbB3, или антитела к ErbB4, или низкомолекулярного ингибитора активности ErbB3 или ErbB4), антагониста MET (например, антитела к MET [например, онартузумаба, эмибетузумаба и H4H14639D] или низкомолекулярного ингибитора MET), антагониста EGFR (например, антитела к EGFR [например, цетуксимаба или панитумумаба] или низкомолекулярного ингибитора EGFR [например, гефитиниба или эрлотиниба]), антагониста EGFRvIII (например, антитела к EGFRvIII), антагониста IGF1R (например, антитела к IGF1R), ингибитора B-raf (например, вемурафениба, сорафениба, GDC-0879, PLX-4720), ингибитора PDGFR- α (например, антитела к PDGFR- α), ингибитора PDGFR- β (например, антитела к PDGFR- β или низкомолекулярного ингибитора киназ, такого как, например, мезилат иматиниба или малат сунитиниба), ингибитора лиганда PDGF (например, антитела к PDGF-A, -B, -C, или -D, аптамера, siRNA и т. п.), антагониста VEGF (например, VEGF-Трап, такого как афлиберцепт, см., например, US 7087411 (также называемого в данном документе как «слитый белок, ингибирующий VEGF»)), антитела к VEGF (например, бевацизумаба), низкомолекулярного ингибитора киназы рецептора VEGF (например, сунитиниба, сорафениба или пазопаниба)), антагониста DLL4 (например, антитела к DLL4, раскрытого в US 2009/0142354, такого как REGN421), антагониста Ang2 (например, антитела к Ang2, раскрытого в US 2011/0027286, такого как H1H685P), антагониста FOLH1 (например, антитела к FOLH1), антагониста STEAP1 или STEAP2 (например, антитела к STEAP1 или антитела к STEAP2), антагониста TMPRSS2 (например, антитела к TMPRSS2), антагониста MSLN (например, антитела к MSLN), антагониста CA9 (например, антитела к CA9), антагониста уроплакина (например, антитела к уроплакину [например, антитела к UPK3A]), антагониста MUC16 (например, антитела к MUC16), антагониста антигена Tn (например, антитела к Tn), антагониста CLEC12A (например, антитела к CLEC12A), антагониста TNFRSF17 (например, антитела к TNFRSF17), антагониста LGR5 (например, антитела к LGR5), моновалентного антагониста CD20 (например, моновалентного антитела к CD20, такого как ритуксимаб), биспецифического антитела к CD20 x CD3, средства, блокирующего

PD-1 (например, антитела к PD-1, такого как пембролизумаб или ниволумаб), и т. п. Другие средства, которые можно эффективно вводить в комбинации с антителами, предусмотренными в данном документе, включают, например, тамоксифен, ингибиторы ароматазы и ингибиторы цитокинов, включая низкомолекулярные ингибиторы цитокинов и антитела, которые связываются с цитокинами, такими как IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, или с их соответствующими рецепторами.

[0358] В качестве иллюстрации, ингибитор PD-1, такой как антитело к PD-1, можно комбинировать с антителом к FGFR2 или его антигенсвязывающим фрагментом или с конъюгатом антитело-лекарственное средство, описанным в данном документе. Целевая популяция пациентов включает, в частности, пациентов с опухолями, у которых сверхэкспрессируется FGFR2 или экспрессируется FGFR2 с мутацией, таких как пациент с раком молочной железы, при котором экспрессируется FGFR2.

[0359] В данном документе предусмотрены композиции и терапевтические составы, содержащие любые из антител к FGFR2 или их антигенсвязывающих фрагментов, включая ADC на основе антитела к FGFR2, описанные в данном документе, в комбинации с одним или более химиотерапевтическими средствами. Примеры химиотерапевтических средств включают алкилирующие средства, такие как тиотепа и циклофосфамид (Cytoxan™); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамид, триэтилентиофосфорамид и триметилломеламин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, холофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид мехлорэтаминоксида, мелфалан, новэмбихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как аклациномизины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кактиномицин, калихеамицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-

оксо-L-норлейцин, доксорубицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, потфиروмицин, пурамицин, квеламицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, циностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азацитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновую кислоту; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдатрексат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфорнитин; ацетат эллиптиния; этоглюцид; нитрат галлия; гидроксимочевину; лентинан; лонидамин; митогуазон; митоксантрон; мопидамол; нитракрин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; подофиллиновую кислоту; 2-этилгидразид; прокарабазин; PSK™; разоксан; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновую кислоту; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид («Ara-C»); циклофосфамид; тиотепу; таксаны, например, паклитаксел (Taxol™, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси) и доцетаксел (Taxotere™, Aventis Antony, Франция); хлорамбуцил; гемцитабин; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; платину; этопозид (VP-16); ифосфамид; митомицин С; митоксантрон; винкристин; винорелбин; навельбин; новантрон; тенипозид; дауномицин; аминокптерин; кселода; ибандронат; СРТ-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноевую кислоту; эсперамицины; капецитабин и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных. В данное определение также включены антигормональные средства, которые регулируют или подавляют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены, включая, например, тамоксифен, ралоксифен, 4(5)-имидазолы, ингибирующие ароматазу, 4-

гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY 117018, онапристон и торемифен (фарестон); и антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты или производные любого из вышеперечисленных.

[0360] Антитела к FGFR2 или их антигенсвязывающие фрагменты, включая ADC на основе антитела к FGFR2, также можно вводить и/или объединять в состав в комбинации с противовирусными средствами, антибиотиками, анальгетиками, кортикостероидами, стероидами, кислородом, антиоксидантами, ингибиторами COX, кардиопротекторами, хелаторами металлов, IFN-гамма и/или NSAID.

[0361] Дополнительный(дополнительные) терапевтически активный(активные) компонент(компоненты), например, любое из перечисленных выше средств или их производных, можно вводить непосредственно перед введением антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, включая ADC на основе антитела к FGFR2, одновременно с их введением или вскоре после их введения; (для целей настоящего изобретения такие режимы введения рассматриваются как введение антитела «в комбинации с» дополнительным терапевтически активным компонентом). Настоящее изобретение включает фармацевтические композиции, в которых антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, включая ADC на основе антитела к FGFR2, объединены в состав с одним или более дополнительными терапевтически активными компонентами, описанными в других местах в данном документе.

Режимы введения

[0362] В соответствии с определенными вариантами осуществления несколько доз антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, включая ADC на основе антитела к FGFR2, или фармацевтической композиции, содержащей комбинацию антитела к FGFR2 или ADC на основе антитела к FGFR2 и любого из дополнительных терапевтически активных средств, упомянутых в данном документе, можно вводить субъекту в течение определенного периода времени. Способы в соответствии с данным аспектом включают последовательное введение субъекту

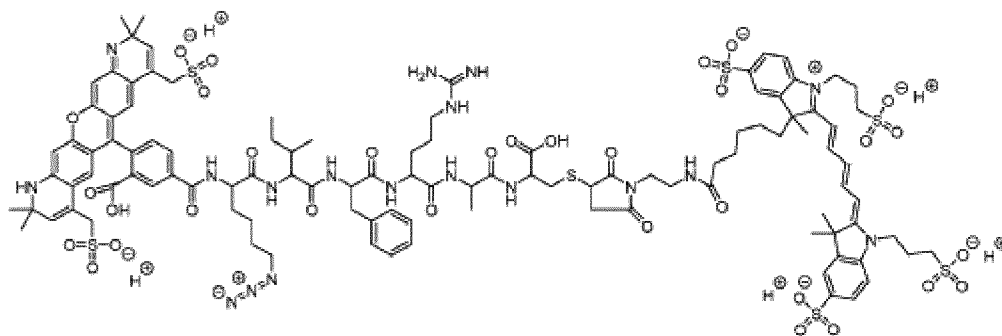
нескольких доз антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, включая ADC на основе антитела к FGFR2, предусмотренный в данном документе. Используемый в данном документе термин «последовательное введение» означает, что каждая доза антитела или ADC вводится субъекту в отдельный момент времени, например, в разные дни, разделенные предварительно определенным интервалом (например, часы, дни, недели или месяцы). Настоящее изобретение предусматривает способы, которые включают последовательное введение пациенту однократной начальной дозы антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента, включая ADC на основе антитела к FGFR2, с последующим введением одной или более вторичных доз антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента или ADC на основе антитела к FGFR2 и необязательно после этого введение одной или более третичных доз антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента или ADC.

[0363] Термины «начальная доза», «вторичные дозы» и «третичные дозы» относятся к временной последовательности введения антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента или ADC на основе антитела к FGFR2. Таким образом, «начальная доза» представляет собой дозу, которая вводится в начале режима лечения (также обозначена как «исходная доза»); «вторичные дозы» представляют собой дозы, которые вводятся после начальной дозы; и «третичные дозы» представляют собой дозы, которые вводятся после вторичных доз. Все из начальной, вторичной и третичной доз могут содержать одинаковое количество антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента или ADC на основе антитела к FGFR2, но обычно могут отличаться друг от друга частотой введения. Однако в определенных вариантах осуществления количества антитела, содержащегося в начальной, вторичной и/или третичной дозах, отличаются друг от друга (например, при необходимости корректируются в сторону повышения или понижения) на протяжении курса лечения. В определенных вариантах осуществления две или более (например, 2, 3, 4 или 5) доз вводятся в начале режима лечения в качестве «нагрузочных доз» с последующим введением последующих доз, которые вводятся с меньшей частотой (например, «поддерживающие дозы»).

Пути применения антител в диагностике

[0364] Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по

настоящему изобретению также можно применять для выявления и/или измерения уровня FGFR2, например, FGFR2b, или FGFR2b-экспрессирующих клеток в образце, например, для диагностических целей. Например, антитело к FGFR2 или его фрагмент можно применять для диагностики состояния или заболевания, характеризующегося aberrантной экспрессией (например, сверхэкспрессией, недостаточной экспрессией, отсутствием экспрессии и т. п.) FGFR2. Иллюстративные диагностические анализы в отношении FGFR2 могут предусматривать, например, приведение образца, полученного от субъекта, в контакт с антителом к FGFR2 или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело помечено выявляемой меткой или репортерной молекулой. В качестве альтернативы, немеченое антитело к FGFR2 можно применять в диагностических путях применения в комбинации со вторичным антителом, которое само является меченым для выявления. Выявляемая метка или репортерная молекула могут представлять собой радиоизотоп, такой как ^3H , ^{14}C , ^{32}P , ^{35}S или ^{125}I , флуоресцентный или хемилюминесцентный фрагмент, такой как флуоресцеин или родамин, или фермент, такой как щелочная фосфатаза, бета-галактозидаза, пероксидаза хрена или люцифераза. Конкретные иллюстративные анализы, которые можно применять для выявления или измерения уровня FGFR2 в образце, включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), иммуно-PET (например, ^{89}Zr , ^{64}Cu и т. п.) и сортировку клеток с активированной флуоресценцией (FACS). В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент помечены, как описано в WO 2018/044540, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте. В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент помечены



биосенсором 1.

[0365] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 2 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 10, помечены биосенсором 1.

[0366] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 22 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 28, помечены биосенсором 1.

[0367] В некоторых вариантах осуществления антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие аминокислотную последовательность HCVR под SEQ ID NO: 40 и аминокислотную последовательность LCVR под SEQ ID NO: 44, помечены биосенсором 1.

[0368] Образцы, которые можно применять в диагностических анализах FGFR2 согласно настоящему изобретению, включают любой образец ткани или жидкости, получаемый от пациента. Обычно для первоначального определения исходного или стандартного уровня FGFR2 будут измеряться уровни FGFR2 в конкретном образце, полученном от здорового пациента (например, пациента, не пораженного заболеванием или состоянием, ассоциированным с аномальными уровнями или активностью FGFR2). Затем этот исходный уровень FGFR2 можно сравнивать с уровнями FGFR2, измеренными в образцах, полученных от индивидуумов с подозрением на наличие заболевания или состояния, связанного с FGFR2.

ПРИМЕРЫ

[0369] Следующие примеры представлены с тем, чтобы обеспечить специалистов средней квалификации в данной области техники полным раскрытием и описанием того, как осуществлять и применять способы и получать и применять композиции, предусмотренные в данном документе, и они не предполагают ограничение объема того, что авторы настоящего изобретения рассматривают в качестве своего изобретения. Были приложены усилия для обеспечения точности в

отношении используемых чисел (например, количеств, температуры и т. п.), однако необходимо учитывать некоторые экспериментальные погрешности и отклонения. Если не указано иное, то части являются частями по массе, молекулярная масса является средней молекулярной массой, температура представлена в градусах Цельсия, а давление является атмосферным или близким к атмосферному.

[0370] Два антитела для сравнения, использованные в примерах, обозначены как Comp1 и Comp2. Comp1 (Five Prime Therapeutics) представляет собой гуманизированное биспецифическое антитело к изоформе FGFR2b, идентифицированное в Catenacci et al. (2020, Phase I Escalation and Expansion Study of Bemarituzumab (FPA144) in Patients With Advanced Solid Tumors and FGFR2b-Selected Gastroesophageal Adenocarcinoma, *J Clin Onc*, DOI <https://doi.org/10.1200/JCO.19.01834>). Это же биспецифическое антитело упоминается в патенте США № 8603987 (Galaxy Biotech) как HuGAL-FR21. Comp2 (Bayer) представляет собой гуманизированное антитело IgG1, которое связывает на N-конце как FGFR2b, так и FGFR2c. Антитело Comp2 упоминается в Sommer et al. (2016, Preclinical Efficacy of Auristatin-based antibody-drug conjugate BAY 1187982 for the treatment of FGFR2-positive solid tumors, *Cancer Res*, 76 (21), 6631—6639, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0180) и в публикации заявки на патент США № 2014/0322220. В патентной публикации антитело Comp2 упоминается как TPP-1402, которое является вариантом MO48-D01 и характеризуется предполагаемой SEQ ID NO: 133 тяжелой цепи и SEQ ID NO: 124 легкой цепи согласно публикации U.S. 2014/0322220.

[0371] Используемые в данном документе антитела изотипического контроля обозначены как IC1 и IC2. Такие антитела можно конъюгировать с любыми полезными нагрузками с линкером, включая майтанзиноид 1 LP, который высвобождает полезную нагрузку на основе майтанзиноида 1A, тубулизин 1 LP, который высвобождает полезную нагрузку на основе тубулизина 1A, DXd1 LP (разветвленный) и DXd2 LP (неразветвленный), которые высвобождают DXd-G или DXd, и BAY-LP (BAY1187982; см. Sommer et al., 2016, Preclinical Efficacy of Auristatin-based Antibody-Drug Conjugate BAY 1187982 for the Treatment of FGFR2-Positive Solid Tumors, *Cancer Res*, 76 (21), 6631—6639, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-0180)).

Пример 1. Получение человеческих антител к FGFR2

[0372] Человеческие антитела к FGFR2 получали посредством иммунизации генетически сконструированной мыши, содержащей ДНК, кодирующую переменные области тяжелой и легкой каппа-цепи иммуноглобулина человека, иммуногеном, содержащим внеклеточный домен рекомбинантной изоформы человеческого FGFR2b (номер доступа NP_075259.4), слитый с мышиним Fc-доменом (номер доступа P01863) согласно SEQ ID NO: 56.

[0373] Мониторинг иммунного ответа с образованием антител осуществляли посредством FGFR2-специфического иммуноанализа. После достижения требуемого иммунного ответа собирали спленоциты и сливали их с клетками миеломы мыши для сохранения их жизнеспособности и формирования линий клеток гибридомы. Линии клеток гибридомы подвергали скринингу и отбирали для идентификации линий клеток, которые продуцируют FGFR2-специфические антитела. С применением данной методики получали несколько химерных антител к FGFR2 (т. е. антител, содержащих переменные домены человека и константные домены мыши). Кроме того, несколько полностью человеческих антител к FGFR2 выделяли непосредственно из антиген-положительных В-клеток без слияния с клетками миеломы, как описано в патенте США № 7582298, который специально включен в данный документ посредством ссылки во всей его полноте. С применением данного способа получали полностью человеческие антитела к FGFR2 (т. е. антитела, содержащие переменные домены человека и константные домены человека).

[0374] Определенные биологические свойства иллюстративных антител к FGFR2, полученных в соответствии со способами из данного примера, подробно описаны в примерах, представленных ниже.

Пример 2. Аминокислотные последовательности переменной области тяжелой и легкой цепей, аминокислотные последовательности и нуклеотидные последовательности тяжелой и легкой цепей

[0375] В таблице 3 представлены идентификаторы аминокислотных последовательностей переменных областей и CDR тяжелой и легкой цепей, а также последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи иллюстративных антител к FGFR2. Соответствующие идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

представлены в таблице 4.

Таблица 3. Идентификаторы аминокислотных последовательностей

Обозначение антитела	SEQ ID NO:									
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC
mAb1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
mAb2	22	24	6	26	28	30	32	34	36	38
mAb3	40	24	6	42	44	46	32	34	49	51

Таблица 4. Идентификаторы последовательностей нуклеиновой кислоты

Обозначение антитела	SEQ ID NO:									
	HCVR	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR	LCDR1	LCDR2	LCDR3	HC	LC
mAb1	1	3	5	7	9	11	13	15	17	19
mAb2	21	23	5	25	27	29	31	33	35	37
mAb3	39	23	5	41	43	45	31	47	48	50

[0376] Антитела, раскрытые в данном документе, содержат полностью человеческие переменные области, однако могут содержать мышинные константные области (например, мышинный Fc IgG1 или мышинный Fc IgG2 (изотип а или b)) или человеческие константные области (например, человеческий Fc IgG1 или человеческий Fc IgG4). Специалисту в данной области техники будет понятно, что антитело с Fc конкретного изотипа можно превращать в антитело с Fc другого изотипа (например, антитело с Fc из IgG1 мыши можно превращать в антитело с IgG4 человека и т. п.), но в любом случае переменные домены (в том числе CDR), которые обозначены числовыми идентификаторами, показанными в таблицах 3 и 4, останутся такими же, и при этом ожидается, что свойства связывания будут идентичными или по сути сходными независимо от природы Fc-домена. В некоторых случаях раскрытые в данном документе антитела характеризуются идентичными последовательностями переменной области тяжелой цепи, но могут содержать модификацию N297Q в Fc-домене полной аминокислотной последовательности

тяжелой цепи или не содержать ее.

Пример 3. Полученные с помощью Biacore значения аффинности связывания и кинетические константы человеческих моноклональных антител к FGFR2

[0377] Равновесные константы диссоциации (значения K_D) для связывания hFGFR2b.mmh с антителами к FGFR2, конъюгированными с тубулизином («тубулизин 1ALP»), ауристатином («ауристин LP1») или mc-VC-PAB-NMe-C3-Mau («майтантиноид 1ALP»), определяли с применением биосенсорного анализа поверхностного плазмонного резонанса в режиме реального времени на приборе Biacore 2000 или Biacore 4000. Поверхность сенсора Biacore дериватизировали посредством иммобилизации по аминогруппе моноклонального мышиного антитела к Fc человека (REGN2567 или Jackson, № по каталогу 109-005-098) для захвата ADC, связывающих FGFR2, и исходных немодифицированных антител, экспрессируемых с константными областями человека. Исследования связывания с помощью прибора Biacore проводили в буфере для анализа HBS-EP (0,01 М HEPES, pH 7,4, 0,15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0,05% объем/объем поверхностно-активного вещества P20). Самостоятельно получали FGFR2b человека и FGFR2c человека, экспрессирующие C-концевую метку тус-тус-гексагистидин (hFGFR2b-MMH – SEQ ID NO: 57; hFGFR2c-MMH – SEQ ID NO: 58). Различные концентрации (3-кратные разбавления) hFGFR2b-MMH или hFGFR2c-MMH (в диапазоне от 30 нМ до 1,1 нМ), полученные в буфере для анализа HBS-EP, вносили на поверхность с захваченным ADC или антителом к FGFR2 при расходе 50 мкл/мин. Мониторинг ассоциации hFGFR2b-MMH или hFGFR2c-MMH с каждым из захваченных ADC и моноклональных антител осуществляли в течение 4 минут. Затем осуществляли мониторинг диссоциации в течение 10 минут в буфере для анализа HBS-EP. Поверхность с антителом к Fc человека регенерировали посредством кратковременного внесения 20 мМ H_3PO_4 . Все эксперименты по кинетике связывания проводили при 25°C. Константы кинетической скорости ассоциации (k_a) и диссоциации (k_d) определяли путем аппроксимирования сенсограмм, полученных в режиме реального времени, к модели связывания 1:1 с применением программного обеспечения для аппроксимации кривых Scrubber 2.0с. На всех сенсограммах осуществляли вычитание двух опорных сигналов посредством вычитания сигнала на сенсограмме от внесения буфера из соответствующей

сенсограммы аналита, тем самым удаляя артефакты, полученные в результате диссоциации антитела от поверхности захвата. Равновесные константы диссоциации связывания (K_D) и полупериоды диссоциации ($t_{1/2}$) рассчитывали исходя из кинетических констант скоростей следующим образом:

$$K_D (M) = \frac{k_d}{k_a}, \text{ и } t_{1/2} (\text{мин}) = \frac{\ln(2)}{60 \cdot k_d}$$

[0378] Параметры кинетики связывания в случае связывания hFGFR2b.mmh с моноклональными антителами к FGFR2 при 25°C показаны в таблице 5a и таблице 5b.

Таблица 5a. Кинетика связывания антител к FGFR2 с hFGFR2b.mmh при 25°C

Антитело и ADC	Захваченное mAb (RU)	Связанное с антигеном (RU)	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (M)	$t_{1/2}$ (мин)
mAb2	337,1±2,5	62,5	5,01E+04	4,47E-04	8,92E-09	25,8
mAb2-майтаниноид 1ALP	266,8 ± 8,4	31,3	6,85E+04	8,79E-04	1,28E-08	13,1
mAb2-тубулизин 1ALP	254,1±3,4	32,7	5,10E+04	1,18E-03	2,31E-08	9,8
mAb1	514,2±9,7	70,9	4,17E+04	1,04E-03	2,50E-08	11,1
mAb1-майтаниноид 1ALP	369 ± 7,6	42,1	2,48E+04	1,04E-03	4,18E-08	11,1
mAb1-тубулизин 1ALP	305,2±4,9	36,4	2,21E+04	1,06E-03	4,81E-08	7,4
Comp2	1267,6±9,3	296,1	3,69E+05	1,01E-04	2,74E-10	113,9

		171				
Comp2-BAУ- LP	294,7±7,7	133,1	3,58E+05	4,90E- 05	1,37E- 10	235,8
Comp1	582,6±2,4	68,3	7,74E+04	4,71E- 03	6,08E- 08	2,5
IC1	480,7±9,1	0	NB	NB	NB	NB

Таблица 5b. Кинетика связывания антител к FGFR2 с hFGFR2c.mmh при 25°C

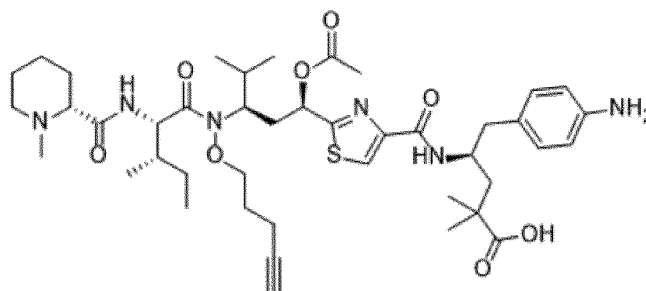
Антитело	Захваченное mAb (RU)	Связанное с антигеном (RU)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	K _D (M)	t1/2 (мин)
mAb2	351,4±4	-1,4	NB	NB	NB	NB
mAb1	279,3±4,1	1,5	NB	NB	NB	NB
Comp2	1227,4±2,1	295,2	1,41E+05	1,03E- 04	7,30E- 10	112,1
Comp1	567,2±0,7	0,6	NB	NB	NB	NB
IC1	232,6±2,7	-0,1	NB	NB	NB	NB

[0379] При 25°C моноклональные антитела к FGFR2 связывались с hFGFR2b.mmh со значениями K_D, составляющими 8,92 нМ и 25,0 нМ соответственно. Конъюгаты на основе моноклонального антитела к FGFR2 связывались с hFGFR2b.mmh со значениями K_D в диапазоне от 12,8 нМ до 48,1 нМ. Антитело изотипического контроля IC1 не проявляло связывания. См. таблицу 5a. Напротив, моноклональные антитела к FGFR2 не связывались с hFGFR2c.mmh, демонстрируя специфичность в отношении белка FGFR2b. Comp2 связывалось как с hFGFR2b.mmh, так и с hFGFR2c.mmh, как и ожидалось.

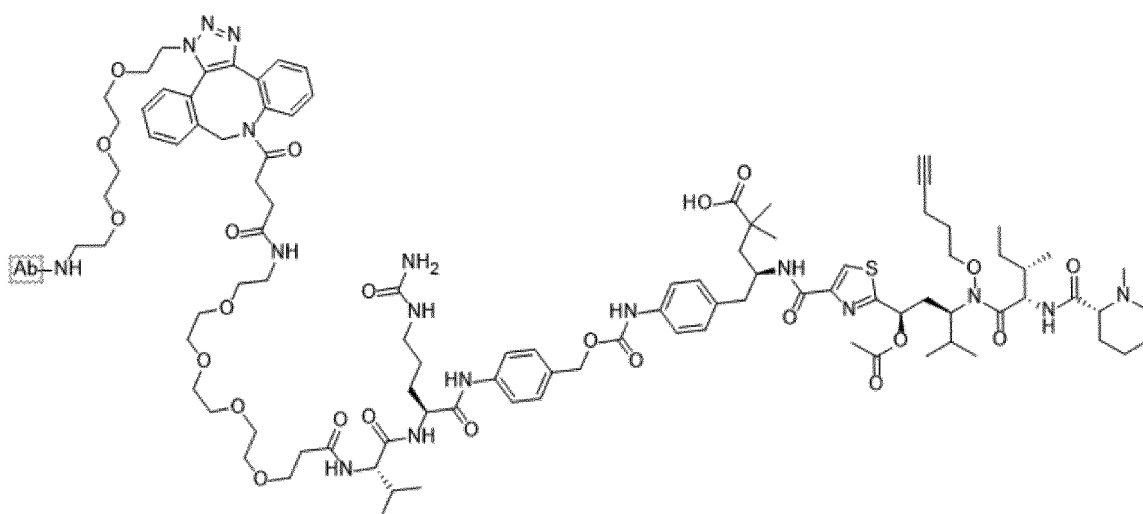
Пример 4. Сайт-специфическая конъюгация антител к FGFR2 с тубулизином 1A

[0380] В данном примере антитела к FGFR2 конъюгировали с цитотоксином тубулизином 1A, характеризующимся следующей структурой:

172



Антитело конъюгировали посредством линкерного фрагмента, как описано в процедуре ниже, с получением ADC, характеризующегося следующей структурой, и/или его региоизомера циклоприсоединения.



где Ab представляет собой антитело к FGFR2.

[0381] Сайт-специфические конъюгаты циклооктин-спейсер-полезная нагрузка с антителом дикого типа или его антигенсвязывающим фрагментом получали в ходе трех стадий. На первой стадии проводили дегликозилирование антитела дикого типа. На второй стадии проводили ферментативное присоединение спейсерного фрагмента, подходящего для последующей обработки, с применением микробной трансглутаминазы (MTG), например, посредством циклоприсоединения, такого как азидо-PEG₃-аминовый спейсер, к сайту Q295 дегликозилированного антитела (далее в данном документе конъюгация «с применением MTG»). На третьей стадии присоединение циклооктин-спейсер-полезной нагрузки к антителу, функционализованному азидом, выполняли посредством [2+3]циклоприсоединения, например, 1,3-диполярного циклоприсоединения между

азидом и циклооктином (также известного как клик-химия без применения ионов меди). См. *Baskin, J. M.; Prescher, J. A.; Laughlin, S. T.; Agard, N. J.; Chang, P. V.; Miller, I. A.; Lo, A.; Codelli, J. A.; Bertozzi, C. R. PNAS 2007, 104 (43), 16793—7*. На фигуре 1A представлен пример линкер-спейсер-полезной нагрузки, содержащей фрагмент DIBAC, конъюгированный с антителом, функционализированным азидом, посредством [2+3]циклоприсоединения. Этот способ обеспечивал получение сайт-специфических и стехиометрических конъюгатов с фактическим выходом приблизительно 50—80%. На фигуре 1B представлен пример 3-стадийной сайт-специфической конъюгации, выполненной следующим образом.

[0382] Стадия 1. Получение дегликозилированного антитела.

[0383] Дегликозилирование проводили, чтобы экспонировать сайт конъюгации. Человеческое антитело IgG4 к FGFR2 (30 мг, 40 мг/мл в PBS; pH 5,5—8,0) смешивали с ферментом PNGазой F (New England BioLabs, 500000 ед/мл, 2 мкл фермента на 1 мг антитела, т. е. всего 60 мкл). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение ночи при осторожном встряхивании. Мониторинг дегликозилирования проводили посредством ESI-MS. После завершения реакции реакцию смесь непосредственно использовали на следующей стадии.

[0384] Стадия 2: Получение антитела, функционализированного азидом.

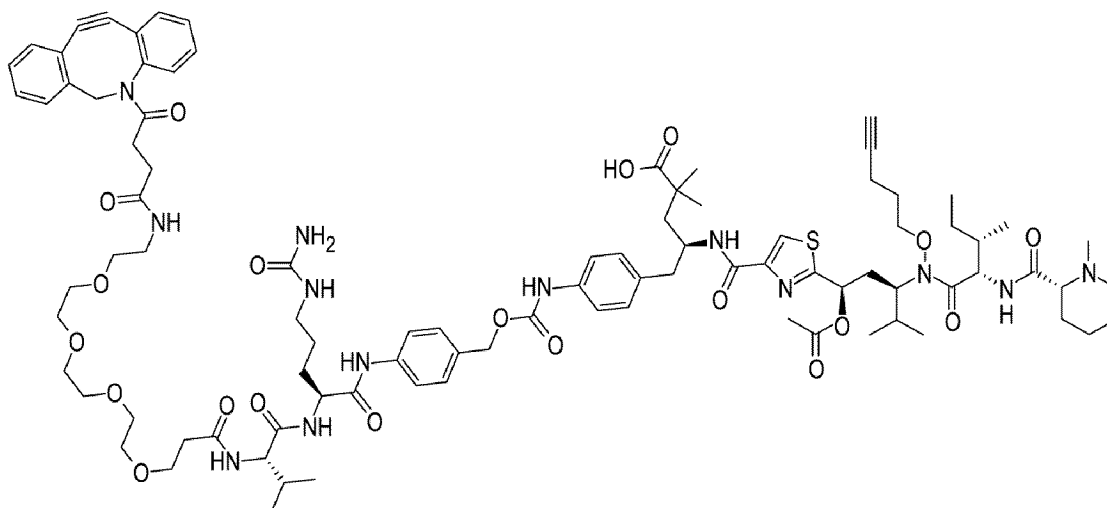
[0385] Дегликозилированное антитело к FGFR2 (30 мг) в 1,5 мл PBS (pH 7,2) инкубировали с 200 молярными эквивалентами азидо-PEG₃-амина (MW = 218,26 г/моль) в присутствии MTG (ACTIVA TI, Ajinomoto, Япония) (0,06 мг MTG на мг антитела). Реакционную смесь инкубировали при 37°C в течение 4 ч, затем при 25°C в течение ночи при осторожном перемешивании. Мониторинг реакции проводили посредством ESI-MS. После завершения реакции избыток азидо-PEG₃-амина и MTG удаляли посредством SEC (Superdex 200 PG, GE Healthcare) с получением антитела, функционализированного азидом. Азидо-PEG₃-амин добавляли к двум сайтам Q295 в антителе, что приводило к увеличению молекулярной массы конъюгата антитело-PEG₃-азид на 404 Да с 2DAR.

[0386] Этот способ также можно осуществлять на антителах, содержащих модификацию N297Q в одной или обеих тяжелых цепях. В этом случае азидо-PEG₃-амин добавляли бы к двум сайтам Q295 и к по меньшей мере одному сайту 297Q в

антителе, что привело бы к получению конъюгата антитело-PEG₃-азид с 3DAR или 4DAR.

[0387] Стадия 3. Получение сайт-специфических конъюгатов посредством [2+3]клик-реакции между антителами, функционализированными азидом и модифицированными глутамином, и циклооктин-содержащим конъюгатом линкер-полезная нагрузка (LP).

[0388] Как правило, конъюгат функционализированное азидом антитело-LP получали путем инкубации антитела, функционализированного азидом и модифицированного глутамином, с ≥ 6 молярными эквивалентами LP, например, соединением следующей структуры:



растворенном в подходящем органическом растворителе (например, DMSO, DMF или DMA; реакционная смесь содержит 10—20% органического растворителя, объем/объем), при от 25°C до 37°C в течение 3—24 ч. Мониторинг хода реакции проводили посредством ESI-MS. Отсутствие антитела, функционализированного азидом (mAb-PEG₃-N₃), указывало на завершение конъюгации. Избыток линкер-полезной нагрузки (LP) и органического растворителя удаляли с помощью колонки для обессоливания или эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищенный конъюгат анализировали посредством SEC-HPLC и ESI-MS. Чистота мономера конъюгатов составляла > 99% согласно результатам анализа посредством SEC-HPLC.

[0389] В конкретном примере антитела к FGFR2, функционализированные

азидом, например, mAb1 и mAb2 (23 мг), в 3,2 мл PBS обрабатывали шестью эквивалентами тубулизина 1A-LP (конц. 10 мг/мл в DMA) при 30°C в течение ночи. Избыток полезной нагрузки с линкером (LP) удаляли посредством SEC (Superdex 200 PG, GE Healthcare). Конечный продукт характеризовали посредством UV, SEC-HPLC (см. фигуру 2) и ESI-MS.

[0390] В таблице 6 показан перечень значений DAR (ESI-MS) для конъюгатов антитело-тубулизин (ADC).

Определение характеристик антитела и ADC посредством SEC-HPLC и LC-ESI-MS

[0391] Очищенные конъюгаты анализировали посредством SEC-HPLC и ESI-MS с репрезентативными SEC и ESI-MS.

[0392] Эксперименты с применением аналитической SEC проводили с использованием прибора Waters 1515 на колонке Superdex™ 200 Increase (1,0 x 30 см) при расходе 0,80 мл/мин с использованием PBS, pH 7,2, и мониторинг осуществляли при $\lambda = 280$ нм с применением Waters 2998 PDA. Аналитический образец состоял из 30—80 мкл тестируемого образца. Результаты SEC на фигуре 2 указывают на типичные значения времени удерживания мономерных mAb и их конъюгатов с минимальной степенью агрегации или деградации.

[0393] Измерение массы исходного вещества для образцов ADC посредством LC-ESI-MS выполняли для определения профилей распределения лекарственное средство-полезная нагрузка и для расчета среднего значения DAR. Каждый тестируемый образец (20—50 нг, 5 мкл) восстанавливали с помощью DTT и затем загружали в колонку Acquity UPLC Protein BEH C₄ (10000 фунтов на кв. дюйм, 300 Å, 1,7 мкм, 75 мкм × 100 мм; № по каталогу 186003810). После обессоливания в течение 3 мин белок элюировали и масс-спектры получали с помощью масс-спектрометра Waters Synapt G2-Si.

Таблица 6. DAR конъюгатов антитело-лекарственное средство

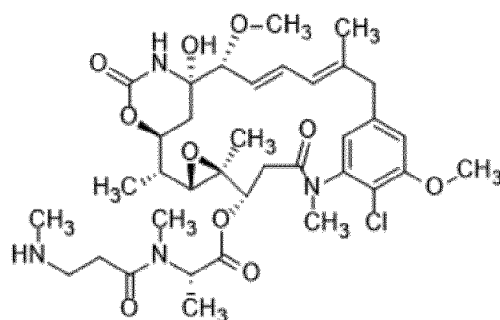
	ADC	DAR (согласно результатам ESI-MS)

mAb1-тубулизин 1A-LP	mAb1 к FGFR2-PEG ₃ -N ₃ -тубулизин 1A-LP	2,1
mAb2-тубулизин 1A-LP	mAb2 к FGFR2-PEG ₃ -N ₃ -тубулизин 1A-LP	2,1
IC1-тубулизин 1A-LP	Изотипическое mAb-PEG ₃ -N ₃ -тубулизин 1A-LP	2,0

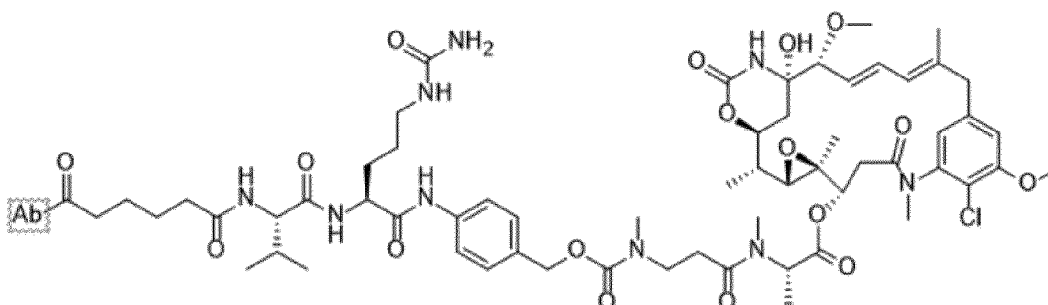
[0394] ADC, полученные в данном эксперименте, использовали в следующих примерах.

Пример 5. Конъюгация антител к FGFR2 с конъюгатом майтанзиноид-линкер-полезная нагрузка

[0395] В данном примере антитела к FGFR2 конъюгировали с цитотоксином майтанзиноидом 1A, который характеризовался следующей структурой:



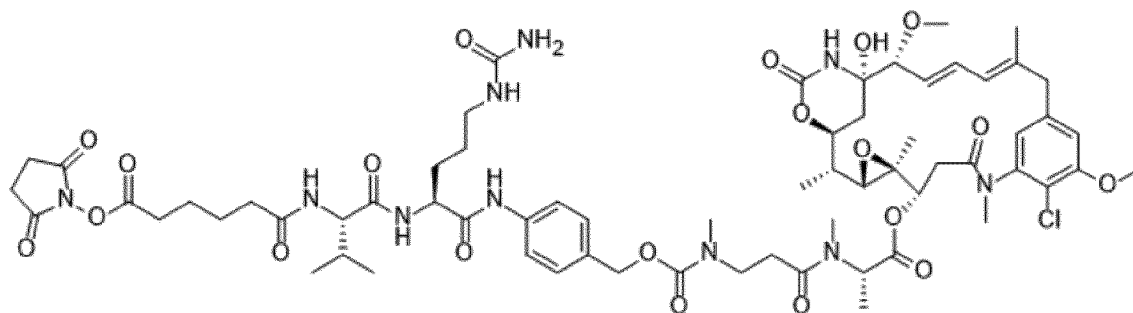
Антитело конъюгировали посредством линкерного фрагмента, как описано в процедуре ниже, с получением ADC, характеризующегося следующей структурой:



где Ab представляет собой антитело к FGFR2.

[0396] Антитела (10—20 мг/мл) в 50 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, pH 8,0 и 10—15% (объем/объем) DMA конъюгировали с 5—6-кратным избытком следующих

соединений:



в течение 2 часов при температуре окружающей среды. Конъюгаты очищали посредством эксклюзионной хроматографии или экстенсивной ультрафильтрации и подвергали стерилизующей фильтрации. Значения концентрации белка определяли посредством UV-спектрального анализа. Посредством эксклюзионной HPLC установили, что все использованные конъюгаты были на > 90% мономерными, и посредством RP-HPLC установили, что количество неконъюгированной линкер-полезной нагрузки составляло < 1%. Все конъюгированные антитела анализировали в отношении значений содержания линкер-полезной нагрузки с помощью UV в соответствии с Hamblett *et al.* (American Association for Cancer Research. 2004 Oct 15;10(20):7063—70) и/или по разнице масс, нативных по сравнению с конъюгированными. Соотношения содержания полезной нагрузки и содержания антитела (DAR) показаны в таблице 7.

Таблица 7. Процентный выход и значения соотношений содержания нагрузки и содержания антитела для каждого конъюгата антитело-лекарственное средство

Антитело	Выход (%)	DAR (ESI-MS)
mAb3-майтаниноид 1ALP	70	2,2
mAb2- мйтаниноид 1ALP	70	1,9
mAb1- мйтаниноид 1ALP	70	2,5
IC1- мйтаниноид 1ALP	80	2,0

Определение характеристик конъюгатов посредством жидкостной хроматографии с масс-спектрометрией

[0397] Для определения нагрузки линкер-полезных нагрузок на антитело конъюгаты дегликозилировали и анализировали посредством LC-MS.

[0398] Для анализа 50 мкг конъюгата разбавляли водой milli-Q до конечной концентрации 1 мг/мл. Десять мкл раствора PNGазы F [раствор PNGазы F получали посредством добавления 150 мкл исходного раствора PNGазы F (New England Biolabs, № по каталогу P0704L) к 850 мкл воды milli-Q и тщательного перемешивания] добавляли к разбавленному раствору конъюгата, а затем инкубировали при 37°C в течение ночи. Вводили по 5 мкл каждого образца в систему для LC-MS (Waters Synat G2-Si) и элюировали при 0,1 мл/минута с градиентом концентрации подвижной фазы 20—40% в течение 25 минут (подвижная фаза А: 0,1% объем/объем FA в H₂O; подвижная фаза В: 0,1% объем/объем FA в ацетонитриле). LC-разделение осуществляли на колонке Waters Acquity BEH C4 (1,0 X 50 мм, 1,7 мкм) при 80°C.

[0399] Спектры масс-спектрометрии подвергали деконволюции с применением программного обеспечения Masslynx, и соотношение содержания лекарственного средства и содержания антитела (DAR) рассчитывали с применением следующих уравнений.

1. Относительный процент (%) лекарственного средства (D_n) по максимуму интенсивности распределения (PI):

$$D_n\% = PIn / \Sigma(PI_0 + PI_1 + PI_2 + \dots + PI_i) \times 100, (n = 0, 1, 2, 3, \dots, i)$$

2. Расчет среднего значения DAR:

$$DAR = \Sigma(1 \times D1\% + 2 \times D2\% + 3 \times D3\% + \dots + i \times Di\%).$$

Пример 6. Анализ цитотоксичности конъюгатов антитела к FGFR2 и лекарственного средства *in vitro* на линиях опухолевых клеток

[0400] Для тестирования способности раскрытых в данном документе конъюгатов антитела к FGFR2 и лекарственного средства (ADC) уничтожать линии клеток человека проводили анализ цитотоксичности *in vitro*. Цитотоксичность *in vitro* ADC к FGFR2, ADC изотипического контроля и эталонных свободных полезных нагрузок оценивали с использованием набора для анализа CellTiter-Glo 2.0 (Promega, № по каталогу G9243), в котором количество присутствующей АТФ используют для определения количества жизнеспособных клеток в культуре. Полезные нагрузки на

основе майтанзиноида 1A, майтанзиноида 1A* (проникающего в клетки эквивалента майтанзиноида 1A) и тубулизина 1A тестировали в качестве свободных полезных нагрузок, и неконъюгированные антитела, включая антитела для сравнения, использовали в качестве контролей.

[0401] Для анализа клетки SNU-16, MFM-223, NCI-H716 или IM-9 высевали при 2000 клеток/лунка в покрытые поли-D-лизином белые 96-луночные планшеты BioCoat (Corning, № 356693) в полной среде для роста и выращивали в течение ночи при 37°C в 5% CO₂. Пятикратные серийные разбавления ADC на основе антитела к FGFR2 или ADC на основе антитела изотипического контроля получали в среде для разбавления (Optimem + 0,1% BSA) и добавляли к клеткам в конечных концентрациях в диапазоне от 20 нМ до 0,051 пМ (концентрации корректировали по DAR и дозировали исходя из эффективной концентрации полезной нагрузки). Получали пятикратные серийные разбавления свободных полезных нагрузок в 100% DMSO, переносили в свежую среду для разбавления и затем добавляли к клеткам при конечной постоянной концентрации DMSO, составляющей 0,2%, и конечных концентрациях полезных нагрузок, находящихся в диапазоне от 20 нМ до 0,051 пМ. Последняя лунка в каждой серии разбавлений служила в качестве необработанного контроля и включала только среду или среду с 0,2% DMSO, и ее наносили на график как продолжение 5-кратного серийного разбавления. Через шесть дней в каждую лунку добавляли 100 мкл CellTiter Glo 2.0, содержимое планшетов перемешивали в течение 2 минут на орбитальном шейкере и планшеты инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут. Относительные световые единицы (RLU) измеряли на люминометре Envision (PerkinElmer) и жизнеспособность клеток выражали в виде процента необработанных (100% жизнеспособных) клеток. Значения IC₅₀ определяли с использованием четырехпараметрического логистического уравнения по 10-точечной кривой доза-ответ (GraphPad Prism). Максимальный % уничтожения также определяли для каждого тестируемого изделия следующим образом: 100 – минимальный процент жизнеспособности. Значение IC₅₀ и максимальный % уничтожения для каждого тестируемого изделия показаны в таблице 8.

[0402] Как показано в таблице 8, mAb2-тубулизин 1A-LP и mAb1-тубулизин 1A-LP (ADC, связывающие FGFR2, конъюгированные с полезной нагрузкой на основе тубулизина) уничтожали FGFR2b-положительные клетки SNU-16 и MFM-223

со значениями IC_{50} в диапазоне от 37,0 пМ до 125 пМ и значениями максимального % уничтожения, находящимися в диапазоне от 90,0% до 95,4%. Эти же ADC, связывающие FGFR2, проявляли слабую цитотоксичность в клетках NCI-H716 (линия клеток с низкой экспрессией FGFR2b, но с высокой экспрессией FGFR2c) и в клетках IM-9, не экспрессирующих FGFR2, со значениями $IC_{50} > 20$ нМ. Свободная полезная нагрузка на основе тубулизина 1A (полезная нагрузка на основе тубулизина 1A-LP) уничтожала все тестируемые клетки со значениями IC_{50} , находящимися в диапазоне от 3,69 пМ до 74,3 пМ. Несвязывающее контрольное антитело, конъюгированное с полезной нагрузкой на основе тубулизина (IC1-тубулизин 1A-LP), проявляло слабую цитотоксичность во всех тестируемых клетках со значениями IC_{50} , находящимся в диапазоне от 1,98 нМ до > 20 нМ. Конъюгаты на основе антитела mAb2-майтаниноид 1A-LP и mAb1-майтаниноид 1A-LP (ADC, связывающие FGFR2, конъюгированные с полезной нагрузкой на основе мйтаниноида) также уничтожали FGFR2b-положительные клетки SNU-16 и MFM-223 со значениями IC_{50} , находящимися в диапазоне от 172 пМ до 268 пМ, и значениями максимального % уничтожения, находящимися в диапазоне от 85,5% до 95,0%. Свободная полезная нагрузка на основе мйтаниноида 1A (полезная нагрузка на основе мйтаниноида 1A-LP) и несвязывающее контрольное антитело, конъюгированное с полезной нагрузкой на основе мйтаниноида (IC1-майтаниноид 1A-LP), обладали небольшой активностью уничтожения клеток или вовсе не обладали ей при тестируемых концентрациях со значениями IC_{50} , находящимися в диапазоне от 4,63 нМ до > 20 нМ. Эквивалент мйтаниноида 1A, проникающий в клетки (информативный для эффекта «свидетеля»), действительно уничтожал все тестируемые линии со значениями IC_{50} , находящимися в диапазоне от 113 пМ до 5,45 нМ, что свидетельствует о том, что ни одна из протестированных линий клеток в целом не является устойчивой к этому классу полезных нагрузок на основе мйтаниноида.

[0403] ADC, связывающий FGFR2, для сравнения, который распознает как FGFR2b, так и FGFR2c, и конъюгирован с полезной нагрузкой на основе ауристатины (Comp2-BAY-LP), также тестировали в отношении цитотоксичности. Подобно другим протестированным ADC, связывающим FGFR2, Comp2-BAY-LP уничтожал клетки SNU-16 и MFM-223 со значениями IC_{50} , составляющими 87,1 пМ и 63,8 пМ соответственно. В отличие от других протестированных ADC, связывающих

FGFR2, которые связывают только FGFR2b, двойное FGFR2b + FGFR2c связывающее средство, Comp2-BAY-LP, также уничтожало клетки NCI-H716 (экспрессирующие высокие уровни FGFR2c, но низкие уровни FGFR2b) со значением IC₅₀, составляющим 349 пМ. Comp2-BAY-LP проявляло слабую цитотоксичность в FGFR2-отрицательных клетках IM-9, и несвязывающий контроль, конъюгированный с полезной нагрузкой на основе ауристатина (IC2-BAY-LP), проявлял слабую цитотоксичность во всех протестированных линиях со значением IC₅₀, находящимся в диапазоне от 6,06 нМ до более чем 20 нМ. Все неконъюгированные антитела, включая антитело для сравнения, селективное к FGFR2b, Comp1, проявляли слабую цитотоксичность во всех тестируемых линиях со значениями EC₅₀, составляющими более чем 20 нМ.

Таблица 8. Цитотоксичность ADC, связывающих FGFR2, в клетках SNU-16, NCI-H716, MFM-223, MFE-296 и IM-9

Тестируемое изделие	IM-9		MFM-223		NCI-H716		SNU-16	
	IC ₅₀ (М)	Максимальный % уничтожения	IC ₅₀ (М)	Максимальный % уничтожения	IC ₅₀ (М)	Максимальный % уничтожения	IC ₅₀ (М)	Максимальный % уничтожения
mAb2-тубулизин 1ALP	> 2,00 E-08	6,9	6,36 E-11	90,0	> 2,00 E-08	30,9	3,70 E-11	95,3
mAb1-тубулизин 1ALP	> 2,00 E-08	13,4	1,25 E-10	91,1	> 2,00 E-08	19,3	4,34 E-11	95,4
IC1-тубулизин 1ALP (контроль)	1,45 E-08	95,2	1,98 E-09	89,6	> 2,00 E-08	7,1	3,40 E-09	94,9
Тубулизин 1A	2,12 E-11	94,6	3,76 E-12	89,7	7,43 E-11	84,9	3,69 E-12	95,1

mAb2- майтанзиноид 1ALP	> 2,00 E-08	9,5	1,72 E-10	91,1	> 2,00 E-08	17,0	2,06 E-10	95,0
mAb1- майтанзиноид 1ALP	> 2,00 E-08	0,0	2,14 E-10	85,5	> 2,00 E-08	0,5	2,68 E-10	93,1
IC1- мایتанзиноид 1ALP (контроль)	> 2,00 E-08	4,0	4,63 E-09	84,3	> 2,00 E-08	3,3	> 2,00 E-08	6,0
Мایتанзиноид 1А	> 2,00 E-08	3,7	> 2,00 E-08	18,1	> 2,00 E-08	6,4	> 2,00 E-08	9,2
Мایتанзиноид 1А*, проникающий в клетки	2,99 E-10	95,3	1,13 E-10	92,0	5,45 E-09	59,5	1,89 E-10	95,9
Comp2-BAU-LP	> 2,00 E-08	2,2	6,38 E-11	90,4	3,49 E-10	77,2	8,71 E-11	94,7
IC2-BAU-LP (контроль)	> 2,00 E-08	10,5	6,06 E-09	89,3	> 2,00 E-08	19,0	1,31 E-08	66,1
Comp1 (неконъюгированно е)	> 2,00 E-08	3,8	> 2,00 E-08	0,8	> 2,00 E-08	9,9	> 2,00 E-08	0,0
Comp2 (неконъюгированно е)	> 2,00 E-08	7,6	> 2,00 E-08	7,8	> 2,00 E-08	0,6	> 2,00 E-08	12,0
mAb2 (неконъюгированно е)	> 2,00 E-08	6,4	> 2,00 E-08	4,5	> 2,00 E-08	7,8	> 2,00 E-08	10,3
mAb1 (неконъюгированно е)	> 2,00	4,4	> 2,00	4,5	> 2,00	7,8	> 2,00	5,4

е)	183							
	E-08		E-08		E-08		E-08	
IC1 (Неконъюгированный контроль)	> 2,00 E-08	1,6	> 2,00 E-08	2,9	> 2,00 E-08	12,6	> 2,00 E-08	6,0
IC2 (неконъюгированный контроль)	> 2,00 E-08	6,2	> 2,00 E-08	8,5	> 2,00 E-08	3,5	> 2,00 E-08	2,1

Совместные культуры и эффект «свидетеля»

[0404] Также оценивали способность ADC, связывающих FGFR2, индуцировать цитотоксичность в FGFR2-отрицательных клетках посредством высвобождения полезной нагрузки в FGFR2-положительных клетках, т. е. активность, обуславливающую эффект «свидетеля». В этом анализе 10000 FGFR2-положительных клеток SNU-16, 10000 FGFR2-отрицательных клеток NALM-6 или смесь 1:1 по 5000 клеток SNU-16 и NALM-6 высевали в 96-луночные планшеты для анализа (Corning, № 355691) и инкубировали в течение ночи при 37°C и 5% CO₂. Цитотоксичность оценивали, как описано ранее для линий опухолевых клеток, за исключением того, что для всех тестируемых изделий проводили трехкратные серийные разбавления с концентрациями в диапазоне от 100 нМ до 15,2 пМ, и клетки инкубировали с тестируемыми изделиями в течение 5 дней.

[0405] Как показано в таблице 9, конъюгаты на основе антител mAb2-тубулизин 1ALP и mAb1-тубулизин 1ALP уничтожали FGFR2-положительные монокультуры SNU-16 со значением максимального % уничтожения, составляющим 97,2 и 97,1 соответственно, но не проявляли цитотоксичность в FGFR2-отрицательных монокультурах NALM-6. Конъюгаты на основе антител mAb2-тубулизин 1ALP и mAb1-тубулизин 1ALP также уничтожали совместные культуры SNU-16 + NALM-6 со значением максимального % уничтожения, составляющим 97,7 и 87,8, что свидетельствует об активности уничтожения, обуславливающей эффект «свидетеля». Несвязывающий контрольный ADC (IC1-тубулизин 1ALP) проявлял слабую цитотоксичность в совместной культуре SNU-16 + NALM-6 со значением макс. % уничтожения, составляющим 17,0%. mAb2-майтаниноид 1ALP демонстрировал цитотоксичность в монокультурах FGFR2-положительных клеток SNU-16 (значение EC₅₀ составляет 64,5 пМ и 94,8% макс. уничтожения) и не проявлял

цитотоксическую активность в монокультурах FGFR2-отрицательных клеток NALM-6 (5,0% макс. уничтожения). В совместных культурах клеток SNU-16 и NALM-6, полученных в соотношении 1:1, mAb2-майтаниноид 1ALP проявлял максимальную цитотоксичность, составляющую примерно 18,3%, что свидетельствует о том, что имела место небольшая активность уничтожения, обуславливающая эффект «свидетеля», либо ее не было вовсе, в отношении популяции FGFR2-отрицательных клеток NALM-6. Несвязывающий контрольный IC1-майтаниноид 1ALP проявлял слабую цитотоксичность во всех протестированных условиях (макс. уничтожение < 10%). ADC для сравнения, Comp2-BAY-LP, также проявлял слабую активность, обуславливающую эффект «свидетеля», о чем свидетельствуют его устойчивая активность уничтожения в клетках SNU-16 (макс. % уничтожения составляет 95,6%) и слабая активность уничтожения в совместной культуре SNU-16 + NALM16 (макс. % уничтожения составляет 21,2%).

Таблица 9. Цитотоксичность ADC, связывающих FGFR2, в анализе активности, обуславливающей эффект «свидетеля», in vitro

Тестируемое изделие	Клетки SNU-16		Клетки NALM-6		Клетки SNU-16 + NALM-6	
	IC50 (M)	Максимальный % уничтожения	IC50 (M)	Максимальный % уничтожения	IC50 (M)	Максимальный % уничтожения
mAb2-тубулизин 1ALP	2,73E-11	97,2	> 1,0E-07	0,0	1,16E-08	97,7
mAb1-тубулизин 1ALP	6,69E-11	97,1	> 1,0E-07	0,0	4,97E-08	87,8
IC1-тубулизин 1ALP	4,11E-08	91,0	> 1,0E-07	3,7	> 1,0E-07	17,0
Тубулизин 1A	1,84E-11	99,3	7,09E-11	99,9	1,66E-10	99,5
mAb2-майтаниноид 1ALP	6,45E-10	94,8	> 1,0E-07	5,0	> 1,0E-07	18,3
IC1-майтаниноид 1ALP	> 1,0E-07	9,8	> 1,0E-07	0,0	> 1,0E-07	3,6

(контроль)						
Comp2-BAY-LP	2,34E-10	95,6	> 1,0E-07	0,0	> 1,0E-07	21,2
IC2-BAY-LP (контроль)	5,68E-08	76,9	> 1,0E-07	7,8	> 1,0E-07	19,3

Пример 7. Эффективность конъюгатов антитела к FGFR2 и лекарственного средства (ADC) in vivo в отношении роста ксенотрансплантатов рака желудка SNU-16

[0406] ADC, связывающий FGFR2, с тубулизином, mAb1-тубулизин 1ALP, тестировали в эксперименте А (фигура 3), и ADC, связывающий FGFR2, с майтанзиноидом, mAb2-майтанзиноид 1ALP, тестировали в эксперименте В (фигура 4) в отношении их способности подавлять рост ксенотрансплантатов рака желудка человека SNU-16 в разных дозах. Вкратце, 5×10^6 клеток SNU-16 (ATCC), смешанных с матригелем (BD Biosciences), имплантировали подкожно в бок самцам мышей BALB/c SCID (возраст 6—8 недель, Jackson Laboratory). После того, как опухоли достигали среднего объема 200—250 мм³, мышей рандомизировали в группы для обработки ($n = 5—6$ мышей на группу для эксперимента А и $n = 6—7$ мышей на группу для эксперимента В). Мышам вводили ADC на основе человеческого Fc изотипического контроля с тубулизином, IC1-тубулизин 1ALP (3,0 мг/кг), или ADC, связывающий FGFR2, с тубулизином, mAb1-тубулизин 1ALP (0,1, 0,3, 1,0 или 3,0 мг/кг), в эксперименте А, и ADC на основе человеческого Fc изотипического контроля с майтанзиноидом, IC1-майтанзиноид 1ALP, или ADC, связывающий FGFR2, с майтанзиноидом, mAb2-майтанзиноид 1ALP (1,0, 3,0, 10 или 15 мг/кг), в эксперименте В. Все ADC вводили однократно путем подкожной инъекции. Измерение объемов опухолей проводили два раза в неделю в течение всего эксперимента. Средние значения (среднее значение +/- стандартное отклонение) скорости роста опухоли (изменение объема опухоли от начала обработки до окончания эксперимента) рассчитывали для каждой группы обработки. Процент снижения скорости роста опухоли рассчитывали по сравнению с группой изотипического контроля, и процент регрессии опухолей в конце эксперимента рассчитывали по сравнению с объемом опухоли в начале обработки. Результаты показаны в таблице 10.

Таблица 10. Подавление роста ксенотрансплантата SNU-16 у мышей BALB/c
SCID

Антитело (мг/кг)	Общая доза полезной нагрузки (мкг/кг)	Рост опухоли в мм ³ от начала обработки (среднее значение \pm SD)	Среднее значение % снижения скорости роста опухоли	Среднее значение % регрессии опухоли
Эксперимент А				
IC1-тубулизин 1ALP (3,0 мг/кг)	36	519,3 \pm 576,8		
mAb1-тубулизин 1ALP (0,1 мг/кг)	1,2	435,2 \pm 189,7	16,2	
mAb1-тубулизин 1ALP (0,3 мг/кг)	3,6	141,8 \pm 141,5	72,7	
mAb1-тубулизин 1ALP (1,0 мг/кг)	12	-168,8 \pm 37,8		79,3
mAb1-тубулизин 1ALP (3,0 мг/кг)	36	-202,5 \pm 48,7		88,3
Эксперимент В				
IC1-майтаниноид 1ALP (15 мг/кг)	190	1516,2 \pm 413,9		
mAb2-майтаниноид 1ALP (1,0 мг/кг)	14	547,6 \pm 292,3	63,9	
mAb2-майтаниноид 1ALP (3,0 мг/кг)	42	164,1 \pm 245,5	89,2	
mAb2-майтаниноид 1ALP (10 мг/кг)	140	-35,1 \pm 102,7		18,2
mAb2-майтаниноид 1ALP (15 мг/кг)	210	-5,8 \pm 145,6		8,4

[0407] Эти результаты демонстрируют, что ADC, целенаправленно воздействующие на изоформы FGFR2b, индуцировали полную регрессию

ксенотрансплантатов опухоли SNU-16 дозозависимым образом с максимальной эффективностью, обеспечиваемой дозой 1,0 мг/кг ADC, связывающего FGFR2, с тубулизином, и дозой 10 мг/кг ADC, связывающего FGFR2, с майтанзиномидом.

Пример 8. Эффективность конъюгатов антитела к FGFR2b и лекарственного средства (ADC) *in vivo* в отношении роста опухолей PDX GA0033 при раке желудка человека

[0408] ADC, связывающий FGFR2, с майтанзиномидом, mAb1-майтанзиномид 1ALP, и ADC, связывающий FGFR2, с тубулизином, mAb1-тубулизин 1ALP, тестировали в данном эксперименте (фигура 5) в отношении их способности подавлять рост опухолей PDX GA0033 при раке желудка человека в разных дозах. Вкратце, фрагменты опухоли PDX GA0033 при первичном раке желудка человека NuPrime® диаметром 2—3 мм (Crown Bioscience) имплантировали подкожно в правый бок самкам бестимусных мышей BALB/c (возраст 5—9 недель, GemPharmatech). После того, как опухоли достигали среднего объема 100—200 мм³, мышам рандомизировали в группы для обработки (n = 6 мышам на группу). Мышам вводили ADC на основе человеческого Fc изотипического контроля с майтанзиномидом, IC-майтанзиномид 1ALP (10 мг/кг), ADC, связывающий FGFR2, с майтанзиномидом, mAb1-майтанзиномид 1ALP (3 или 10 мг/кг), ADC на основе человеческого Fc изотипического контроля с тубулизином, IC-тубулизин 1ALP (3 мг/кг), ADC, связывающий FGFR2, с тубулизином, mAb1-тубулизин 1ALP (1 или 3 мг/кг), «голое» антитело на основе человеческого Fc изотипического контроля, IC (15 мг/кг), или «голое» антитело к FGFR2, mAb1 (15 мг/кг). Все ADC вводили один раз в неделю посредством подкожной инъекции в течение двух обработок и все «голые» антитела вводили два раза в неделю посредством подкожной инъекции на протяжении всего эксперимента. Измерение объемов опухолей проводили два раза в неделю в течение всего эксперимента. Средние значения (среднее значение +/- стандартное отклонение) скорости роста опухоли (изменение объема опухоли от начала обработки до окончания эксперимента) рассчитывали для каждой группы обработки. Процент снижения скорости роста опухоли рассчитывали по сравнению с соответствующей группой изотипического контроля, и процент регрессии опухолей в конце эксперимента рассчитывали по сравнению с объемом опухоли в начале обработки. Результаты показаны в таблице 11.

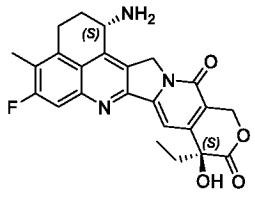
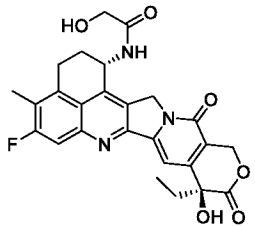
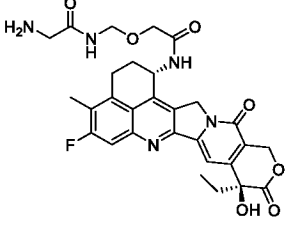
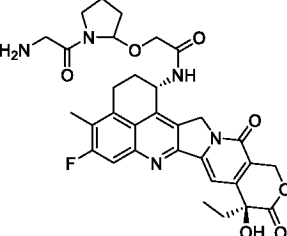
Таблица 11. Подавление роста опухоли PDX GA0033 при раке желудка человека у бестимусных мышей BALB/c

Антитело (мг/кг)	Общая доза полезной нагрузки (мкг/кг)	Рост опухоли в мм ³ от начала обработки (среднее значение \pm SD)	Среднее значение % снижения скорости роста опухоли	Среднее значение % регрессии опухоли
IC-майтаниноид 1ALP (10 мг/кг)	132 x 2	1099,4 \pm 676,3		
mAb1-майтаниноид 1ALP (3 мг/кг)	40 x 2	273,6 \pm 241,9	75,1	
mAb1-майтаниноид 1ALP (10 мг/кг)	132 x 2	-104,2 \pm 20,6		75,0
IC-тубулизин 1ALP (3 мг/кг)	36 x 2	1497,7 \pm 839,5		
mAb1-тубулизин 1ALP (1 мг/кг)	12 x 2	197,3 \pm 201,7	86,8	
mAb1-тубулизин 1 ALP (3 мг/кг)	36 x 2	-138,4 \pm 27,6		96,5
IC (15 мг/кг)	N/A	1273,7 \pm 750,2		
mAb1 (15 мг/кг)	N/A	1135,3 \pm 391,3	10,9	

[0409] Эти результаты демонстрируют, что ADC, целенаправленно воздействующие на изоформы FGFR2b, индуцировали полную регрессию опухолей PDX GA0033 при раке желудка человека дозозависимым образом с максимальной эффективностью, обеспечиваемой дозой 3,0 мг/кг ADC, связывающего FGFR2, с тубулизином, и дозой 10 мг/кг ADC, связывающего FGFR2, с мایتаниноидом.

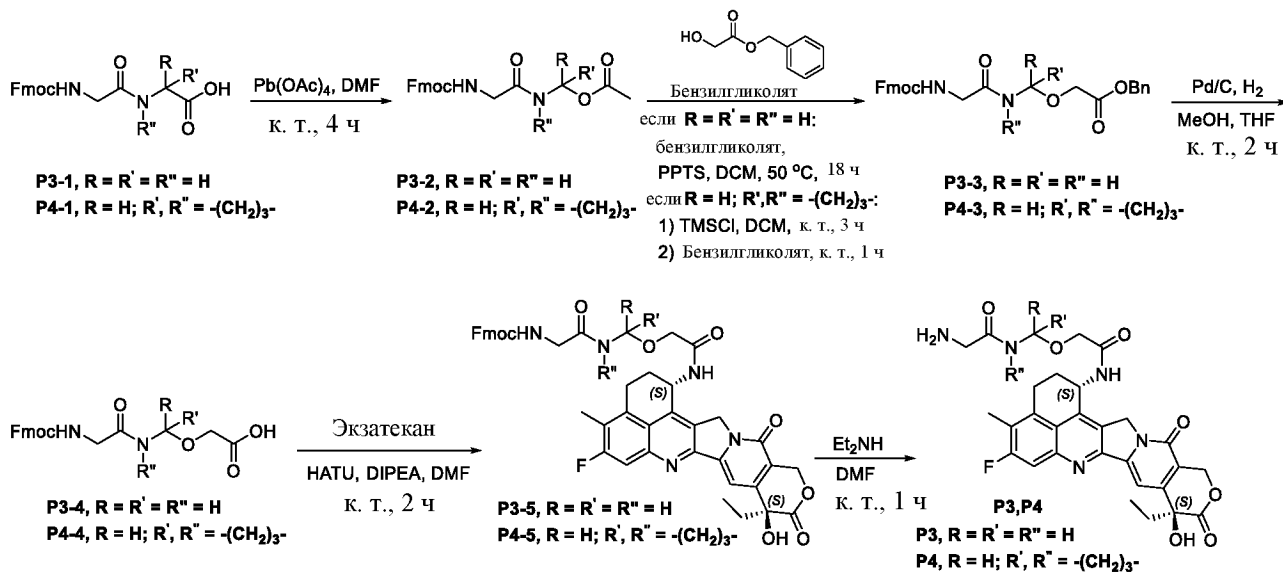
Пример 9. Синтез производных камптотецина (полезных нагрузок)

Таблица 12. Иллюстративные полезные нагрузки P1—P4 на основе аналогов камптотецина

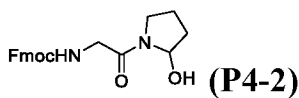
#	Название	Структуры	cLog P	MF	M W	Чистота (%)	m/z	Соль
P1	Экзатекан		1,45	C ₂₄ H ₂₂ FN ₃ O ₄ . CH ₄ O ₃ S	531, 56	97	436,1 [M+H], 893,2 [2M+N a]	MsO H
P2	Dxd		0,55	C ₂₆ H ₂₄ FN ₃ O ₆	493, 48	100	494,2 [M+H]	NA
P3			-0,60	C ₂₉ H ₃₀ FN ₅ O ₇ . C ₂ HF ₃ O ₂	693, 59	97	580,2 [M+H], 1159,2 [2M+H]	TFA
P4			0,02	C ₃₂ H ₃₄ FN ₅ O ₇	619, 64	88	620,3 [M+H]	NA

[0410] Полезная нагрузка P1, мезилат экзатекана, получена коммерчески от MCE. Полезные нагрузки P2 и P3 синтезировали, как описано в WO2015155998, включенной в данный документ посредством ссылки, и полезную нагрузку P4 на основе производного камптотецина синтезировали, как описано в схеме 1A и в соответствии со стадиями синтеза, описанными в примерах 9A—1E:

Схема 1. Синтез производных камптотецина (полезных нагрузок) P3 и P4



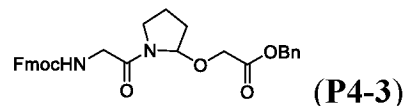
[0411] Пример 9А. Синтез 9*H*-флуорен-9-илметил-*N*-[2-(2-гидроксипирролидин-1-ил)-2-оксоэтил]карбамата (P4-2)



[0412] К смеси Fmoc-Gly-Pro-OH P4-1 (0,10 г, 0,26 ммоль) в сухом DMF (1 мл) добавляли тетраацетат свинца (0,14 г, 0,31 ммоль). Полученную смесь перемешивали при к. т. в течение 30 минут; мониторинг хода реакции осуществляли посредством LCMS. Полученную смесь фильтровали через целит, фильтрат разбавляли этилацетатом, промывали водой и солевым раствором, высушивали над безводным сульфатом натрия и концентрировали *in vacuo*. Остаток очищали посредством колоночной хроматографии на силикагеле (0—10% этилацетата в петролейном эфире) с получением соединения P4-2 (50 мг, выход 53%) в виде белого твердого вещества и без получения промежуточного соединения, представляющего собой ацетат. Значение *m/z*, определенное посредством ESI: 389 (*M* + 23)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO) δ 7,90 (d, *J* = 7,4 Гц, 2H), 7,73 (d, *J* = 7,5 Гц, 2H), 7,47—7,37 (m, 3H), 7,33 (t, *J* = 7,3 Гц, 2H), 5,86 (br s, 1H), 5,48 (d, *J* = 4,0 Гц, 0,25H), 5,39 (d, *J* = 4,0 Гц, 0,75H), 4,33—4,18 (m, 3H), 3,96 (d, *J* = 6,0 Гц, 1,5H), 3,75 (d, *J* = 6,0 Гц, 0,5H), 3,59—3,33 (m, 1H), 3,22—3,11 (m, 1H), 2,00—1,59 (m, 4H) ppm.

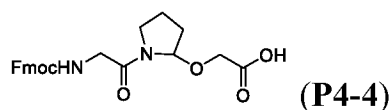
[0413] Пример 9В. Синтез бензил-2-{{1-(2-{{(9*H*-флуорен-9-

илметокси)карбонил]амино}ацетил)пирролидин-2-ил]окси}ацетата (**P4-3**)



[0414] К раствору соединения **P4-2** (0,30 г, 0,82 ммоль) в DCM (25 мл) добавляли хлортриметилсилан (TMSCl) (0,27 г, 2,5 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 3 часов; мониторинг хода реакции осуществляли посредством LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток разбавляли с помощью DCM (25 мл). К раствору добавляли бензилгликолят (0,27 г, 1,6 ммоль) и DIPEA (0,21 г, 1,6 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение часа; мониторинг завершения реакции осуществляли посредством LCMS. Полученную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали посредством флэш-хроматографии с обращенной фазой (0—100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (0,05%)) с получением соединения **P4-3** (0,11 г, выход 25%, с чистотой > 99%, и 50 мг с чистотой 75%) в виде белого твердого вещества. Значение *m/z*, определенное посредством ESI: 537,3 (M + Na)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 7,91—7,89 (m, 2H), 7,74—7,69 (m, 2H), 7,63—7,48 (m, 1H), 7,42—7,25 (m, 9H), 5,51—5,09 (m, 2H), 4,35—4,21 (m, 5H), 4,00—3,77 (m, 2H), 3,52—3,38 (m, 2H), 3,30—3,18 (m, 1H), 2,19—1,64 (m, 4H) ppm.

[0415] Пример 9С. Синтез 2-{{1-(2-{{(9H-флуорен-9-илметокси)карбонил]амино}ацетил)пирролидин-2-ил]окси}уксусной кислоты (**P4-4**)



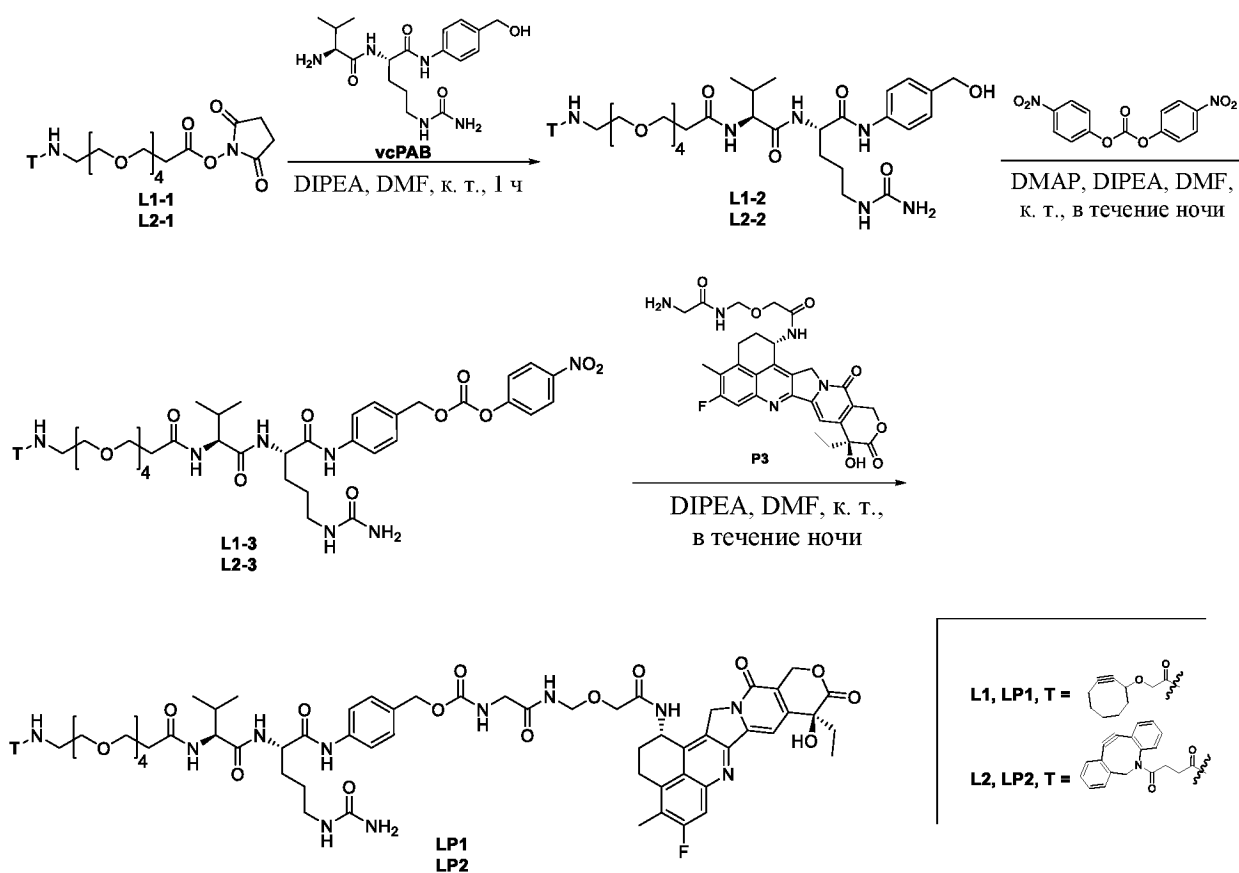
[0416] К раствору соединения **P4-3** (89 мг, 0,17 ммоль) в метаноле (3 мл) и THF (7 мл) добавляли влажный палладий на угле (10% Pd, 20 мг) в атмосфере азота. Смесь дегазировали и перемешивали в атмосфере водорода из баллона под давлением при к. т. в течение 2 часов и мониторинг завершения реакции осуществляли посредством LCMS. Реакционную смесь фильтровали через целит и фильтрат концентрировали *in vacuo*. Остаток очищали посредством флэш-хроматографии с обращенной фазой (0—100% ацетонитрила в водн. бикарбонате аммония (0,05%)) с получением соединения **P4-4** (36 мг, выход 49%) в виде белого твердого вещества.

Реакционную смесь концентрировали *in vacuo* и остаток очищали посредством флэш-хроматографии на силикагеле (0—10% метанола в DCM) с получением соединения **P4** (9,5 мг, выход 28%) в виде бесцветного масла. Значение *m/z*, определенное посредством ESI: 620,3 (M + H)⁺.

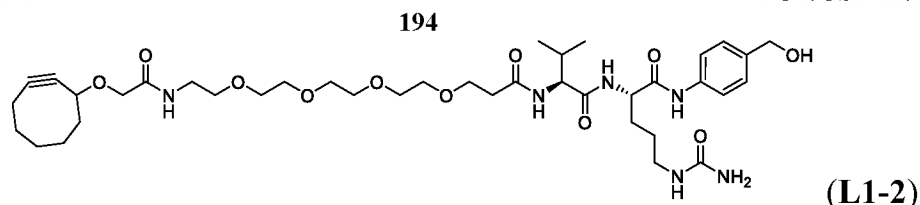
Пример 10. Синтез *vcPAB*-карбаматных линкеров с полезными нагрузками

[0421] Линкеры с полезными нагрузками **LP1** и **LP2** синтезировали, как описано в схеме 2 и в примерах 10A—10C (для **LP1**) и 10D (для **LP2**) ниже. Исходные материалы **L1-1** (CAS 2226472-26-8) и **L2-3** (CAS 2226472-28-0) синтезировали в соответствии с WO2018089373A2, включенной в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте.

Схема 2. Синтез *vcPAB*-карбаматных линкеров с полезными нагрузками

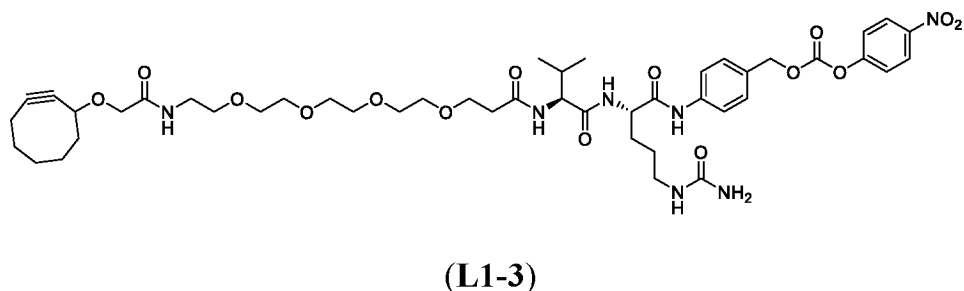


[0422] **Пример 10A.** *N*-[(1*S*)-1-{[(1*S*)-4-(карбамоиламино)-1-{[4-(гидроксиметил)фенил]карбамоил}бутил]карбамоил}-2-метилпропил]-1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетида]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амид (**L1-2**)



[0423] К раствору соединения **L1-1** (0,17 г, 0,33 ммоль) в DMF (10 мл) последовательно добавляли DIPEA (0,13 г, 1,0 ммоль) и *vs*PAВ (0,13 г, 0,34 ммоль) и реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение часа. Мониторинг завершения реакции осуществляли посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очищали посредством флэш-хроматографии с обращенной фазой (0—80% ацетонитрила в воде) с получением соединения **L1-2** (0,18 г, выход 70%) в виде бесцветного масла. Значение *m/z*, определенное посредством ESI: 791,3 (M + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9,91 (s, 1H), 8,11 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 7,89 (d, *J* = 8,8 Гц, 1H), 7,61 (t, *J* = 5,6 Гц, 1H), 7,55 (d, *J* = 8,4 Гц, 2H), 7,23 (d, *J* = 8,4 Гц, 2H), 5,98 (t, *J* = 5,6 Гц, 1H), 5,42 (s, 2H), 5,10 (br s, 1H), 4,43 (s, 2H), 4,39—4,37 (m, 1H), 4,30—4,21 (m, 2H), 3,87 (d, *J* = 14,8 Гц, 1H), 3,75 (d, *J* = 14,8 Гц, 1H), 3,62—3,58 (m, 2H), 3,50—3,46 (m, 12H), 3,43 (t, *J* = 6,0 Гц, 2H), 3,27—3,22 (m, 2H), 3,06—2,92 (m, 2H), 2,41—2,32 (m, 2H), 2,26—2,05 (m, 3H), 1,99—1,66 (m, 6H), 1,62—1,55 (m, 3H), 1,44—1,35 (m, 3H), 0,89 (d, *J* = 6,8 Гц, 3H), 0,83 (d, *J* = 6,8 Гц, 3H) ppm.

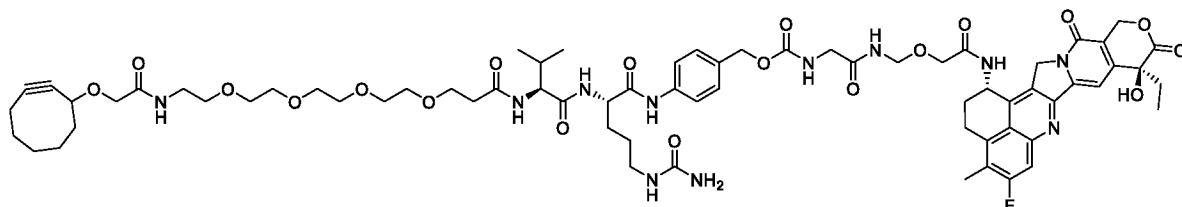
[0424] **Пример 10В.** {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетида]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил}метил-4-нитрофенилкарбонат (**L1-3**)



[0425] Суспензию соединения **L1-2** (80 мг, 0,10 ммоль), DMAP (12 мг, 0,10 ммоль) и DIPEA (26 мг, 0,20 ммоль) в сухом DMF (5 мл) перемешивали при к. т. в течение 10 минут перед добавлением бис(4-нитрофенил)карбоната (61 мг, 0,20 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при к. т. в течение 2 часов. Мониторинг завершения реакции осуществляли посредством LCMS. Полученную

смесь напрямую очищали посредством флэш-хроматографии с обращенной фазой (0—80% ацетонитрила в воде) с получением соединения **L1-3** (53 мг, выход 55%) в виде белого твердого вещества. Значение m/z , определенное посредством ESI: 956,3 (M + H)⁺.

[0426] Пример 10С. {4-[(2S)-5-(Карбамоиламино)-2-[(2S)-2-{1-[2-(циклоокт-2-ин-1-илокси)ацетамидо]-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо}-3-метилбутанамидо]пентанамидо]фенил} метил-N-({[({[(10S,23S)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0²,¹⁴.0⁴,¹³.0⁶,¹¹.0²⁰,²⁴]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил} метокси)метил]карбамоил} метил)карбамат (**LP1**)



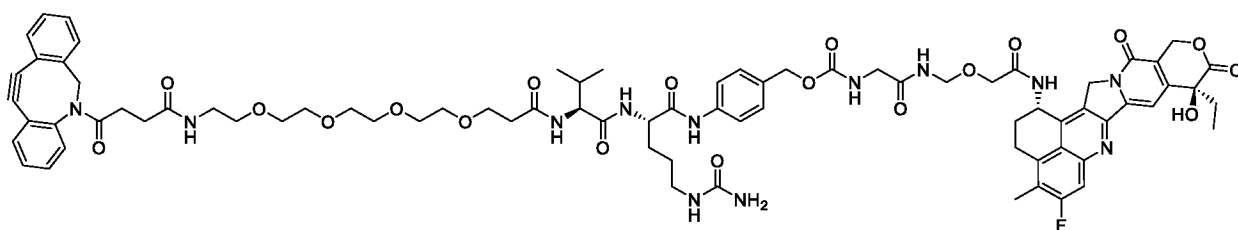
(**LP1**)

[0427] К желтому раствору соединения **L1-3** (16 мг, 17 мкмоль) и мезилата экзатекана (12 мг, 17 мкмоль) в сухом DMF (2 мл) добавляли DIPEA (6,5 мг, 51 мкмоль) и прозрачный реакционный раствор перемешивали при к. т. в течение 2 часов. Мониторинг завершения реакции осуществляли посредством LCMS. Полученную смесь напрямую очищали посредством флэш-хроматографии с обращенной фазой (0—60% ацетонитрила в *водн.* TFA (0,01%)) с получением линкер-полезной нагрузки **LP1** (15 мг, выход 63% в виде соли TFA) в виде белого твердого вещества. Значение m/z , определенное посредством ESI: 698,8 (M/2 + H)⁺. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO-*d*₆) δ 9,99 (s, 1H), 8,80 (t, $J = 6,8$ Гц, 1H), 8,50 (d, $J = 9,2$ Гц, 1H), 8,12 (d, $J = 7,2$ Гц, 1H), 7,87 (d, $J = 8,8$ Гц, 1H), 7,79 (d, $J = 10,8$ Гц, 1H), 7,62—7,58 (m, 3H), 7,42 (t, $J = 6,0$ Гц, 1H), 7,31 (s, 1H), 7,28 (d, $J = 8,4$ Гц, 2H), 6,53 (br s, 1H), 5,98 (t, $J = 5,2$ Гц, 1H), 5,63—5,57 (m, 1H), 5,46—5,37 (m, 3H), 5,21 (s, 2H), 4,93 (s, 2H), 4,63 (d, $J = 6,4$ Гц, 2H), 4,41—4,35 (m, 1H), 4,29—4,21 (m, 2H), 4,02 (s, 2H), 3,87 (d, $J = 14,4$ Гц, 1H), 3,75 (d, $J = 14,8$ Гц, 1H), 3,63—3,58 (m, 4H), 3,50—3,48 (m, 12H), 3,46—3,41 (m, 2H), 3,27—3,24 (m, 2H), 3,23—3,12 (m, 2H), 3,07—2,91 (m, 2H), 2,47—2,45 (m, 0,5H), 2,41—2,33 (m, 4,5H), 2,25—2,04 (m, 5H), 1,99—1,69 (m, 9H), 1,63—1,54 (m, 3H),

1,44—1,33 (m, 3H), 0,88—0,82 (m, 9H) ppm. (Протон TFA не наблюдался). ^{19}F ЯМР (376 МГц, DMSO_{d6}) δ -74 (TFA), -111 (Ar-F) ppm.

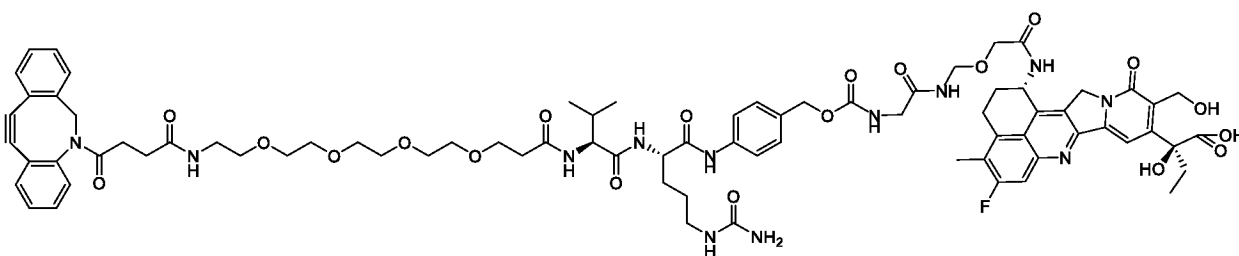
[0428] Пример 10D. {4-[(2*S*)-2-[(2*S*)-2-[1-(4-{2-

Азатрицикло[10.4.0.0^{4,9}]гексадека-1(12),4(9),5,7,13,15-гексаен-10-ин-2-ил}-4-оксобутанамидо)-3,6,9,12-тетраоксапентадекан-15-амидо]-3-метилбутанамидо]-5-(карбамоиламино)пентанамидо]фенил}метил-*N*-({[({[(10*S*,23*S*)-10-этил-18-фтор-10-гидрокси-19-метил-5,9-диоксо-8-окса-4,15-диазагексацикло[14.7.1.0^{2,14}.0^{4,13}.0^{6,11}.0^{20,24}]тетракоза-1,6(11),12,14,16,18,20(24)-гептаен-23-ил]карбамоил}метокси)метил]карбамоил}метил)карбамат (LP2)



(LP2)

[0429] Следуя процедуре получения LP1, за исключением замены L2-3 на L1-3, линкер-полезную нагрузку LP2 (12 мг, выход 46%) получали в виде смеси лактонного продукта (LP2, изображен выше) и продукта с раскрытым кольцом (LP2-RO, изображен ниже) в виде белого твердого вещества после очистки посредством флэш-хроматографии с обращенной фазой (0—100% метанола в водн. бикарбонате аммония (10 мМ)).



(LP2-RO)

[0430] Лактонный LP2: чистота согласно HPLC: 67%, время удерживания: 7,41 мин, значение m/z , определенное посредством ESI: 507,3 ($M/3 + H$)⁺, 760,5 ($M/2 + H$)⁺; продукт с раскрытым кольцом LP2-RO: чистота согласно HPLC: 33%, время удерживания: 6,61 мин, значение m/z , определенное посредством ESI: 513,3 ($M/3 +$

H)⁺, 769,5 (M/2 + H)⁺.

[0431] Смесь лактонного продукта и продукта с раскрытым кольцом. ¹H ЯМР (400 МГц, DMSO_{д6}) δ 9,99 (s, 1H), 8,80 (t, *J* = 6,4 Гц, 1H), 8,50 (d, *J* = 8,8 Гц, 1H), 8,12 (d, *J* = 7,2 Гц, 1H), 7,87 (d, *J* = 8,4 Гц, 1H), 7,80—7,75 (m, 2H), 7,69—7,67 (m, 1H), 7,63—7,58 (m, 3H), 7,51—7,46 (m, 3H), 7,45—7,33 (m, 3H), 7,32—7,26 (m, 4H), 6,53 (s, 1H), 5,98 (t, *J* = 6,0 Гц, 1H), 5,63—5,57 (m, 1H), 5,42 (s, 4H), 5,21 (s, 2H), 5,03 (d, *J* = 14,0 Гц, 1H), 4,93 (s, 2H), 4,63 (d, *J* = 6,8 Гц, 2H), 4,41—4,35 (m, 1H), 4,25—4,21 (m, 1H), 4,02 (s, 2H), 3,62—3,57 (m, 5H), 3,48—3,45 (m, 12H), 3,31—3,28 (m, 2H), 3,23—3,14 (m, 2H), 3,11—3,07 (m, 2H), 3,05—2,98 (m, 1H), 2,96—2,91 (m, 1H), 2,60—2,55 (m, 1H), 2,46—2,44 (m, 1H), 2,39 (s, 3H), 2,35—2,33 (m, 1H), 2,26—2,15 (m, 3H), 2,03—1,94 (m, 2H), 1,88—1,67 (m, 4H), 1,63—1,57 (m, 1H), 1,46—1,33 (m, 2H), 0,88—0,81 (m, 9H) ppm. ¹⁹F ЯМР (376 МГц, DMSO_{д6}) δ -111 ppm.

Пример 11. Конъюгация FGFR2b-камптотецина

[0432] В данном примере демонстрируется способ сайт-специфической конъюгации в соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения, в целом, полезной нагрузки с антителом к FGFR2b или его антигенсвязывающим фрагментом. Первая стадия представляет собой опосредованное микробной трансглутаминазой (MTG) присоединение линкера 1 (L1-B'), такого как бис-азидоалкилзамещенный амин (**BL7**) или азид-PEG₃-амин (**AL1**), к антителу к FGFR2b, где использовали избыток реагента на основе амина, чтобы избежать возможного перекрестного связывания цепей антитела. На второй стадии присоединяли полезную нагрузку с линкером, представляющую собой полезную нагрузку, связанную с алкином (**L2P**), к N₃-меченному конъюгату посредством азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением (SPAAC). Количество молекул **L2P**, добавляемых к антителу, зависит от количества сайтов конъюгации и количества азидных функциональных групп (*n*) в L₁ (**AL**, *n* = 1; **BL**, *n* ≥ 2). Для антител с Fc-доменом WT, которые были ферментативно дегликозилированы или содержат мутацию Fc N297D, а затем функционализованы азидом с помощью линкеров AL или BL, ожидаемое значение DAR = 2, умноженное на *n*, умноженное на

m , где n представляет собой количество азидных функциональных групп B' в каждом линкере $L1$, и m представляет собой количество полезных нагрузок $L2P$ соответственно. Для антител с мутацией Fc N297Q, функционализованных азидом с помощью линкеров AL или BL, ожидаемое значение $DAR = 4 \times (n) \times (m)$.

[0433] Пример 11А. Стадия 1: получение сайт-специфического конъюгата антитела, функционализованного азидом, с лекарственным средством, содержащего 2, 4 или 8 азидогрупп.

[0434] Антитело IgG человека к FGFR2b, содержащее мутацию N297Q, или антитело изотипического контроля смешивали со 150 молярными эквивалентами азидо-PEG3-амин (AL1, MW 218,26 г/моль) или бис-азидоалкил-замещенного амина (BL7, MW 325,38 г/моль). Полученный раствор смешивали с трансклутаминазой (25 ед/мл; 1 ед mTG на мг антитела, Zedira, Дармштадт, Германия), в результате чего конечная концентрация антитела составляла 1—20 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 25—37 °C в течение 4—24 часов при осторожном встряхивании под мониторингом посредством ESI-MS. После завершения избыток амина и mTG удаляли посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) или колоночной хроматографии с белком А. Конъюгат характеризовали посредством UV-Vis, SEC и ESI-MS. Азидо-линкеры, присоединенные к антителу, приводили к увеличению массы на 804 Да или 1232 Да для конъюгата с $DAR = 4$ с AL1 и BL7 соответственно. Чистота мономеров конъюгатов составляла > 99% по данным SEC.

[0435] Пример 11В. Стадия 2: получение сайт-специфических конъюгатов посредством реакций 1,3-циклоприсоединения («клик») между антителами, функционализованными азидом, и алкин-содержащими линкер-полезными нагрузками.

[0436] Сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство получали путем инкубации антитела, функционализованного азидом (1—20 мг/мл), в PBS (pH 7,4) с ≥ 6 молярными эквивалентами линкер-полезной нагрузки, растворенной в органическом растворителе, таком как DMSO или DMA (10 мг/мл), с получением реакционной смеси, содержащей 5—15% органического растворителя (объем/объем), при 25—37 °C в течение 1—48 часов при осторожном встряхивании.

Мониторинг реакции осуществляли посредством ESI-MS. После завершения избыточное количество линкер-полезной нагрузки и белковых агрегатов удаляли посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, подвергали стерилизующей фильтрации и характеризовали посредством UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгатов составляла > 99% по данным SEC.

Пример 12. Конъюгация ADC: три подхода

[0437] В настоящем изобретении представлены три иллюстративных подхода к присоединению полезных нагрузок с разветвленным линкером к сайтам Q295/297 антитела к FGFR2b.

[0438] Подходы I и II включают двухстадийный процесс конъюгаций антитело-лекарственное средство. Первая стадия представляет собой опосредованное микробной трансглутаминазой (MTG) присоединение низкомолекулярного амина, например, **AL1** или **BL2**, к сайтам mAb-Q, где используют избыток реагента на основе амина, чтобы избежать потенциального перекрестного связывания цепей антитела (WO2017/147542, включенная в данный документ посредством ссылки во всей ее полноте). На второй стадии присоединяют полезную нагрузку с линкером, связанным с алкином (**L₂P**), к N₃-меченному конъюгату посредством, например, азид-алкинового циклоприсоединения, промотируемого напряжением (SPAAC, также известного как клик-химия без применения ионов меди). Если реакционноспособная группа (RG) представляет собой фрагмент DIBAC или COT, конъюгацию проводят с антителом, функционализированным азидом, посредством [2+3]циклоприсоединения. Этот способ обеспечивает получение сайт-специфических и стехиометрических конъюгатов. Количество молекул **L₂P**, добавляемых к антителу, зависит от количества сайтов конъюгации и количества азидных функциональных групп (n) в **L₁** (например, для **AL** n = 1; для **BL** n ≥ 2).

[0439] Подход I заключается в конъюгации низкомолекулярных линкеров **L1** на основе аминов (например, **AL1**) с сайтами Q295/297 антитела с образованием антитела с азидо-меткой (Ab-N₃), которая затем подвергается ковалентной реакции

(например, посредством «клик-циклоприсоединения») с полезной нагрузкой с линейным линкером, связанным с алкином (**LL2P**), с получением ADC с 4DAR, и с полезной нагрузкой с разветвленным линкером, связанным с алкином (**BL2P**), с получением ADC с 8DAR.

[0440] Подход II заключается в конъюгации низкомолекулярного разветвленного азидоamina (например, **BL2**) с сайтами Q295/297 антитела с образованием антитела с разветвленной азидо-меткой (Ab-разветвление-2N3), которая затем подвергается ковалентной реакции (например, посредством «клик-циклоприсоединения») с полезной нагрузкой с линейным линкером с получением ADC с 8DAR и с полезной нагрузкой с разветвленным линкером-2, связанным с алкином, с получением ADC с 16DAR, или с разветвленной связанной-3 полезной нагрузкой с получением ADC с 24DAR. Сходным образом, посредством сайт-специфических конъюгаций ADC в сайтах Q295 антитела с полезной нагрузкой с линейным или разветвленным линкером можно получать ADC с DAR2 — DAR12.

[0441] При конъюгациях согласно подходу III опосредованное MTG присоединение полезной нагрузки с разветвленным линкером на основе амина к сайтам Q295/297 антитела достигалось с использованием ≥ 20 молярных эквивалентов реагентов на основе амина в одностадийной MTG-опосредованной реакции.

[0442] Для антител с Fc-доменом WT, которые были ферментативно дегликозилированы или содержат мутацию Fc N297D, а затем функционализованы азидом с помощью линкеров AL или BL, ожидаемое значение DAR на азидо-метку на $2 \text{ Fc} = 2n$. Для антител с мутацией Fc N297Q, которые были функционализованы азидом с помощью линкеров AL или BL, ожидаемое значение DAR на азидо-метку на $2 \text{ Fc} = 4n$. Для антител, конъюгированных с каждой линкер-полезной нагрузкой, содержащих m х полезная нагрузка (P_m), ожидаемое значение ADC-DAR = $(2n \times m)$ для антител с мутацией N297D и $(4n \times m)$ для антител с мутацией N297Q.

[0443] Общие процедуры получения сайт-специфических конъюгатов в две стадии:

[0444] **Пример 12A.** Стадия 1: получение сайт-специфического конъюгата

антитела, функционализированного азидом, с лекарственным средством, содержащего 2, 4 или 8 азидогрупп.

[0445] Агликозилированное человеческое антитело IgG (IgG1, IgG4 и т. п.) к FGFR2b, содержащее мутацию N297Q или мутацию N297D, смешивали в буфере ВирН (рН 7,4) с ≥ 150 молярными эквивалентами азидо-PEG3-амин (AL1) или бис-азидоалкил-замещенного амина (BL2). Полученный раствор смешивали с трансклутаминазой (25 ед/мл; 1 ед mTG на мг антитела, Zedira, Дармштадт, Германия, или 10 ед/мл; 5,5 ед MTG на мг антитела, Modernist Pantry-ACTIVA TI содержит мальтодекстрин от Ajinomoto, Япония), в результате чего конечная концентрация антитела составляла 0,5—20 мг/мл. Реакционную смесь инкубировали при 25—37°C в течение 24 часов при осторожном встряхивании под мониторингом посредством ESI-MS. После завершения избыток амина и mTG удаляли посредством эксклюзионной хроматографии (SEC) или колоночной хроматографии с белком А. Конъюгат характеризовали посредством UV-Vis, SEC и ESI-MS. Азидо-линкеры, присоединенные к антителу, приводили к увеличению массы на 804 Да или 1232 Да для конъюгатов с 4DAR с AL1 и BL2 соответственно и к увеличению массы на 2768 Да для конъюгата антитело-BL2-(азид)₈ с 8DAR. Чистота мономеров конъюгатов составляла > 99% по данным SEC.

[0446] **Пример 12В.** Стадия 2: получение сайт-специфических конъюгатов посредством [2+3]клик-реакций между антителами, функционализированными азидом, и алкин-содержащей линкер-полезной нагрузкой.

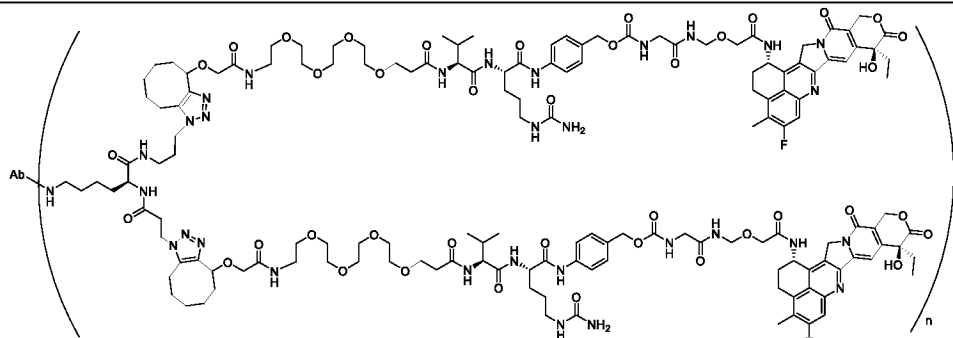
[0447] Сайт-специфический конъюгат антитело-лекарственное средство с человеческим IgG (IgG1, IgG4 и т. п.) получали посредством [2+3]азид-алкиновой «клик-реакции» между антителом, функционализированным азидом, и полезной нагрузкой с линкером, функционализированным алкином. Антитело, функционализированное азидом (1—20 мг/мл), в PBS (рН 7,4) инкубировали с ≥ 6 молярными эквивалентами линкер-полезной нагрузки (LP), растворенной в органическом растворителе, таком как DMSO или DMA (10 мг/мл), с получением реакционной смеси, содержащей 5—15% органического растворителя (объем/объем), при 25—37°C в течение 1—48 часов при осторожном встряхивании. Мониторинг реакции осуществляли посредством ESI-MS. После завершения избыточное

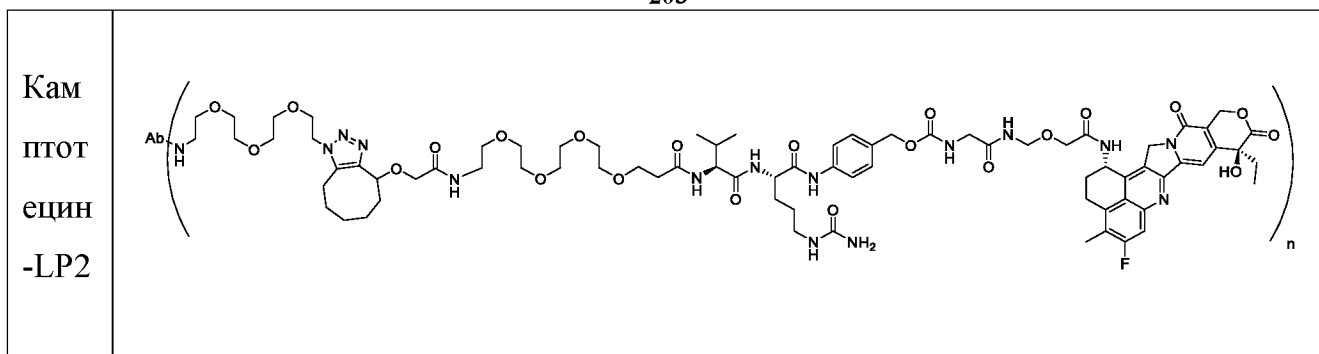
количество LP и органического растворителя удаляли на колонке для обессоливания с VupH (pH 7,4) и белковые агрегаты (при их наличии) удаляли посредством эксклюзионной хроматографии (SEC). Очищенный конъюгат концентрировали, подвергали стерилизующей фильтрации и характеризовали посредством UV-Vis, SEC и ESI-MS. Чистота мономеров конъюгатов составляла > 99% по данным SEC.

Пример 13. Влияние конъюгатов антитела к FGFR2b и лекарственного средства (ADC) на рост ксенотрансплантатов рака желудка SNU-16

[0448] Для оценки противоопухолевой активности ADC, связывающих FGFR2b, с камптотецином в отношении ксенотрансплантатов SNU16 (ксенотрансплантатов рака желудка человека), 5×10^6 клеток SNU-16 (ATCC), смешанных с матригелем (BD Biosciences), имплантировали подкожно в бок самцам мышей BALB/c SCID (возраст 6—8 недель, Jackson Laboratory). После того, как опухоли достигали среднего объема 200—250 мм³, мышей рандомизировали в группы для обработки (n = 6 мышей на группу). Камптотецин-LP1 и камптотецин-LP2 показаны в таблице 13. Все ADC вводили посредством подкожной инъекции в дозах, показанных в таблице 14. Мышам, которых обрабатывали с помощью ADC, связывающего FGFR2, с камптотецином-LP1 (DAR8), вводили дозу в день 0; мышам, которых обрабатывали с помощью ADC, связывающего FGFR2, с камптотецином-LP2 (DAR4), вводили дозу дважды, сначала в день 0, а затем еще раз в день 7.

Таблица 13. Производные камптотецина

Камптотецин-LP1	
-----------------	--



[0449] Конструкции содержат аналог камптотецина:

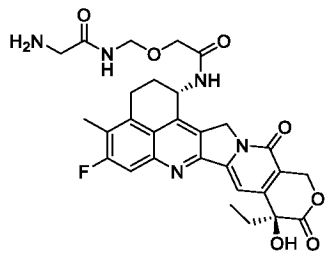


Таблица 14. Антитело с полезными нагрузками и линкером с производным камптотецина и соответствующие дозировки

Антитело-LP	Модификация Fc	Сайт конъюгации	DAR	Доза
ADC IC-камптотецин-LP1	N297Q	Q295, Q297	7,9	10 мг/кг
ADC mAb2-камптотецин-LP1	N297Q	Q295, Q297	7,5	1, 3 или 10 мг/кг
ADC mAb1-камптотецин-LP1	N297Q	Q295, Q297	7,9	1, 3 или 10 мг/кг
ADC IC-камптотецин-LP2	N297Q	Q295, Q297	3,7	3 мг/кг
ADC mAb1-камптотецин-LP2	N297Q	Q295, Q297	3,7	0,3, 1 или 3 мг/кг

[0450] Измерение объемов опухолей проводили два раза в неделю в течение всего эксперимента. Средние значения (среднее значение +/- стандартное отклонение) скорости роста опухоли (изменение объема опухоли от начала обработки до окончания эксперимента) рассчитывали для каждой группы обработки. Процент снижения скорости роста опухоли рассчитывали по сравнению с группой изотипического контроля, и процент регрессии опухолей в конце эксперимента рассчитывали по сравнению с объемом опухоли в начале обработки. Результаты двух отдельных экспериментов с использованием ADC с различными DAR показаны в

таблице 15 и на фигурах 6 и 7. Результаты демонстрируют, что ADC, связывающие FGFR2b, с производным камптотецина индуцируют полную регрессию ксенотрансплантатов опухоли SNU-16 дозозависимым образом.

Таблица 15. Подавление роста ксенотрансплантата SNU-16 у мышей BALB/c SCID

Антитело (мг/кг)	Общая доза полезной нагрузки (мкг/кг)	Рост опухоли в мм ³ от начала обработки (среднее значение \pm SD)	Среднее значение % снижения скорости роста опухоли	Среднее значение % регрессии опухоли
Эксперимент 1 (ADC с DAR 8)				
ADC mAb2-камптотецин-LP1 (1 мг/кг)	25	-27,2 \pm 89,2	103,3	11,0
ADC mAb2-камптотецин-LP1 (3 мг/кг)	76	-254,4 \pm 34,1	131,4	99,1
ADC mAb2-камптотецин-LP1 (10 мг/кг)	254	-259,0 \pm 25,8	131,9	100
ADC mAb1-камптотецин-LP1 (1 мг/кг)	26	4,7 \pm 181,9	99,4	6,7
ADC mAb1-камптотецин-LP1 (3 мг/кг)	79	-259,8 \pm 40,1	132,0	99,8
ADC mAb1-камптотецин-LP1 (10 мг/кг)	264	-260,8 \pm 25,0	132,1	100
ADC IC-камптотецин-LP1 (10 мг/кг)	264	579,5 \pm 229,3	28,6	-192,9
Контроль со средой-носителем		811,5 \pm 556,1		-291,8
Эксперимент 2 (ADC с DAR 4)				
ADC mAb1-камптотецин-	4	187,0 \pm 117,1	72,5	-74,8

LP2 (0,3 мг/кг)				
ADC mAb1-камптотецин-LP2 (1 мг/кг)	13	-43,5±91,6	106,4	16,3
ADC mAb1-камптотецин-LP2 (3 мг/кг)	38	-254,2±30,2	137,4	99,7
ADC IC-камптотецин-LP2 (3 мг/кг)	38	679,0±253,1		-259,1

Пример 14. Влияние конъюгатов антитела к FGFR2b и лекарственного средства (ADC) на рост ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с раком желудка (GA1224)

[0451] Для оценки противоопухолевой активности ADC, связывающих FGFR2b, с камптотецин-LP2 (таблица 13) в отношении ксенотрансплантатов рака желудка, полученных от пациентов (GA1224), фрагменты опухоли (диаметром 2—3 мм) имплантировали подкожно в бок самкам бестимусных мышей BALB/c (возраст 6—9 недель, GemPharmatech Co., Ltd). После того, как опухоли достигали среднего объема 100—150 мм³, мышей рандомизировали в группы для обработки (n = 6 мышей на группу). Мышам, несущим опухоли, вводили конъюгат один раз в неделю в течение двух недель посредством внутривенной инъекции в дозах, показанных в таблице 16.

Таблица 16. Антитело с полезными нагрузками и линкером с производным камптотецина и соответствующие дозировки

Антитело-LP	Модификация Fc	Сайт конъюгации	DAR	Доза
IC	N297Q	NA	NA	20 мг/кг
mAb1	N297Q	NA	NA	20 мг/кг
ADC IC-камптотецин-LP2	N297Q	Q295, Q297	4,0	20 мг/кг
ADC mAb1-камптотецин-LP2	N297Q	Q295, Q297	4,0	5, 10 или 20 мг/кг

[0452] Измерение объемов опухолей проводили два раза в неделю в течение всего эксперимента. Средние значения (среднее значение +/- стандартное отклонение) скорости роста опухоли (изменение объема опухоли от начала обработки до

окончания эксперимента) рассчитывали для каждой группы обработки. Процент снижения скорости роста опухоли рассчитывали по сравнению с группой изотипического контрольного антитела, и процент регрессии опухолей в конце эксперимента рассчитывали по сравнению с объемом опухоли в начале обработки. Результаты показаны в таблице 17 и на фигуре 10. Эти результаты демонстрируют, что ADC на основе DXd, целенаправленно воздействующие на изоформы FGFR2b, индуцировали полную регрессию опухолей PDX GA1224 при всех протестированных дозах.

Таблица 17. Подавление роста PDX GA1224 у бестимусных мышей BALB/c

Антитело (мг/кг)	Общая доза полезной нагрузки (мкг/кг)	Рост опухоли в мм³ от начала обработки (среднее значение ± SD)	Среднее значение % снижения скорости роста опухоли	Среднее значение % регрессии опухоли
ADC mAb1- камптотецин- LP2 (5 мг/кг)	68	-124,9±31,2	111,3	100
ADC mAb1- камптотецин- LP2 (10 мг/кг)	136	-124,9±36,5	111,3	100
ADC mAb1- камптотецин- LP2 (20 мг/кг)	272	-125,1±34,8	111,3	100
ADC IC- камптотецин- LP2 (20 мг/кг)	272	1499,7±432,8	-35,9	-1265,4
mAb 1	NA	1627,8±551,9	-47,5	-1300,5
IC	NA	1103,5±289,7	NA	-923,2

Пример 15. Влияние уничтожения клеток, обуславливающего эффект «свидетеля», под действием конъюгатов антитела к FGFR2b и лекарственного средства (ADC) in vivo на рост совместно инокулированных ксенотрансплантатов рака желудка SNU-16/SNU-5

[0453] Также оценивали способность ADC, связывающих FGFR2, индуцировать регрессию опухоли на FGFR2-отрицательных клетках посредством высвобождения полезной нагрузки в FGFR2-положительных клетках, т. е. активность, обуславливающую эффект «свидетеля». Способность ADC, связывающего FGFR2b, с камптотецином, и ADC, связывающего FGFR2b, с майтанзиноидом, подавлять рост опухоли тестировали на ксенотрансплантатах рака желудка человека SNU-16 с амплификацией FGFR2 (фигура 11), на FGFR2-отрицательных ксенотрансплантатах рака желудка человека SNU-5 (фигура 12) или на совместно инокулированных ксенотрансплантатах SNU-16 и SNU-5, имплантированных в соотношении 2:1 (фигура 13).

[0454] Вкратце, 5×10^6 раковых клеток SNU-16 и/или SNU-5 (ATCC), смешанных с матригелем (BD Biosciences), имплантировали подкожно в бок самцам мышей BALB/c SCID (возраст 6—8 недель, Jackson Laboratory). После того, как опухоли достигали среднего объема 200—250 мм³, мышей рандомизировали в группы для обработки (n = 6 мышей на группу). Мышам, несущим опухоли, вводили однократную дозу посредством подкожной инъекции в дозах, показанных в таблице 18.

Таблица 18. Антитело с полезными нагрузками и линкером с камптотецином и антитело с полезными нагрузками и линкером с майтанзиноидом и соответствующие дозировки

Антитело-LP	Модификация Fc	Сайт конъюгации	DAR	Доза
ADC mAb1-камптотецин-LP2	N297Q	Q295/Q297	3,7	10 мг/кг
ADC mAb1-майтанзиноид 1ALP	N297Q	Q295/Q297	3,0	10 мг/кг
ADC IC-камптотецин-LP2	N297Q	Lys	3,7	10 мг/кг

ADC IC-майтанзиноид 1ALP	N297Q	Lys	3,0	10 мг/кг
IC	N297Q	NA	NA	10 мг/кг

[0455] Измерение объемов опухолей проводили два раза в неделю в течение всего эксперимента. Средние значения (среднее значение +/- стандартное отклонение) скорости роста опухоли (изменение объема опухоли от начала обработки до окончания эксперимента) рассчитывали для каждой группы обработки. Процент снижения скорости роста опухоли рассчитывали по сравнению с группой изотипического контроля, и процент регрессии опухолей в конце эксперимента рассчитывали по сравнению с объемом опухоли в начале обработки. Результаты представлены в таблице 19.

[0456] Эти результаты демонстрируют, что ADC с камптотецином, целенаправленно воздействующие на изоформы FGFR2b, индуцировали полную регрессию ксенотрансплантатов SNU-16 (FGFR2b-положительных), не подавляли рост ксенотрансплантатов SNU-5 (FGFR2b-отрицательных), но индуцировали полную регрессию совместно инокулированных ксенотрансплантатов SNU-16 и SNU-5, что свидетельствует о значительном уничтожении, обуславливающим эффект свидетеля, популяции FGFR2-отрицательных клеток SNU-5. ADC с мйтанзиноидом, целенаправленно воздействующие на изоформы FGFR2b, индуцировали полную регрессию ксенотрансплантатов SNU-16, не подавляли рост ксенотрансплантатов SNU-5 и лишь частично подавляли рост совместно инокулированных ксенотрансплантатов SNU-16 и SNU-5, что свидетельствует о том, что уничтожение, обуславливающее эффект свидетеля, популяции FGFR2b-отрицательных клеток SNU-5 было небольшим или отсутствовало вовсе.

Таблица 19. Подавление роста ксенотрансплантатов SNU-16 и/или SNU-5 у мышей BALB/c SCID

Антитело (мг/кг)	Общая доза полезной нагрузки (мкг/кг)	Рост опухоли в мм ³ от начала обработки (среднее значение \pm SD)	Среднее значение % снижения скорости роста	Среднее значение % регрессии опухоли

			опухоли	
Фигура 11: SNU16 (FGFR2b-положительные клетки)				
ADC mAb1-камптотецин-LP2 (10 мг/кг)	130	-158,4±25,4	120,1	98,9
ADC mAb1-майтанзиноид 1ALP (10 мг/кг)	147	-160,7±28,4	120,4	100
ADC IC-камптотецин-LP2 (10 мг/кг)	130	560,2±302,0	29	-363,5
IC-майтанзиноид-1ALP (10 мг/кг)	147	686,0±174,5	13,1	-472,3
IC (10 мг/кг)	NA	789,2±413,5		-493,8
Фигура 12: SNU5 (FGFR2b-отрицательные клетки)				
ADC mAb1-камптотецин-LP2 (10 мг/кг)	130	220,6±103,8	46,9	-164
ADC mAb1-майтанзиноид 1ALP (10 мг/кг)	147	401,6±74,4	3,4	-311,8
ADC IC-камптотецин-LP2 (10 мг/кг)	130	252,1±159,6	39,4	-195,6
IC-майтанзиноид-1ALP (10 мг/кг)	147	395,6±225,0	4,8	-272,7
IC (10 мг/кг)		415,7±160,3		-323,4
Фигура 13: совместно инокулированные SNU16 и SNU5 (соотношение 2:1)				
ADC mAb1-камптотецин-LP2 (10 мг/кг)	130	-140,6±18,5	124,7	91,8
ADC mAb1-майтанзиноид 1ALP (10 мг/кг)	147	181,1±57,0	68,2	-118,3
ADC IC-камптотецин-LP2	130	291,8±131,3	48,7	-189,8

(10 мг/кг)				
IC-майтанзиноид-1ALP (10 мг/кг)	147	342,3±101,3	39,9	-222,9
IC (10 мг/кг)		569,4±480,7		-380,5

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Последовательность	Описание
1	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGG CAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGAGAGAGGAAAGCAGCGCGTCCGGGGTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA	mAb1 Варибельная область тяжелой цепи
2	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREESSASGVVDYWG QGTLVTVSS	mAb1 Варибельная область тяжелой цепи
3	GGATTCACCTTCAGTAGCTATGGC	mAb1 HCDR1
4	GFTFSSYG	mAb1 HCDR1
5	ATATGGTATGATGGAAGTAATAAA	mAb1, mAb2 и mAb3 HCDR2
6	IWYDGSNK	mAb1, mAb2 и mAb3 HCDR2

7	GCGAGAGAGGAAAGCAGCGCGTCCGGGGTTGACTA C	mAb1 HCDR3
8	AREESSASGV DY	mAb1 HCDR3
9	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCCT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCACCAGGTA CTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTG CAGTGTACTACTGTCAGGAGTATGGTAGCTCATCGAT CACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTA AA	mAb1 Вариабельная область легкой цепи
10	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSTRYLAWYQQ KRGQAPRL LIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRL EPEDFAVYYCQEY GSSSITFGQGTRLEIK	mAb1 Вариабельная область легкой цепи
11	CAGAGTGTTAGCACCAGGTAC	mAb1 LCDR1
12	QSVSTRY	mAb1 LCDR1
13	GGTGCATCC	mAb1 LCDR2
14	GAS	mAb1 LCDR2
15	CAGGAGTATGGTAGCTCATCGATCACC	mAb1 LCDR3
16	QEY GSSSIT	mAb1 LCDR3

17	<p> CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAGCTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGACTGGAGTGGGTGG CAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGAGAGAGGAAAGCAGCGCGTCCGGGGTTGACTACT GGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCAGCCT CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTG CTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGG CTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGAC GGTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGT GCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGC AGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGAT CACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGT TGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCCA GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGT TCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC </p>	<p> mAb1 Тяжелая цепь </p>
----	---	---------------------------------

18	<p> QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREESSASGVVYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSV VTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK* </p>	<p>mAb1</p> <p>Тяжелая цепь</p>
19	<p> GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCCT TGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGG CCAGTCAGAGTGTTAGCACCAGGTAAGCTTAGCCTGGT ACCAGCAGAAACGTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCA TCTATGGTGCATCCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAG ACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCA CTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTG CAGTGTACTACTGTCAGGAGTATGGTAGCTCATCGAT CACCTTCGGCCAAGGGACACGACTGGAGATTAAACG AACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCA TCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTG TGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCA AAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGG GTAAGTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGC TGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTAC GCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCC GTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG </p>	<p>mAb1</p> <p>Легкая цепь</p>

20	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVSTRYLAWYQQ KRGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRL EPEDFAVYYCQEYGSSSITFGQGTRLEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	mAb1 Легкая цепь
21	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAAACTCCAGTCAAGGGACTGGAGTGGGTGA CACTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATA CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGATCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGAGAGAGGGGAACTGGAACACTACGGGCATGCTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTT CA	mAb2 Варибельная область тяжелой цепи
22	QVQLVESGGGVVQPQKSLRLSCAASGFTFSNYGMHW VRQTPVKGLEWVTLIWYDGSNKYYTDSVKGRFTISRD NSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAREGNWNYGHAFD IWGQGMVTVSS	mAb2 Варибельная область тяжелой цепи
23	GGATTCACCTTCAGTAACTATGGC	mAb2 и mAb3 HCDR1
24	GFTFSNYG	mAb2 и mAb3 HCDR1
25	GCGAGAGAGGGGAACTGGAACACTACGGGCATGCTTTT GATATC	mAb2 HCDR3
26	AREGNWNYGHAFDI	mAb2 HCDR3

27	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CCAGTCAGAATATTGGTAACTGGTTGGCCTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATTT ATAAGGCGTCTACTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAAC TTATAACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTCCCACT TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA	mAb2 Вариабельная область легкой цепи
28	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNIGNWLAWYQQ KPGKAPNLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYNCQQYNSYSPTFGQGTKLEIK	mAb2 Вариабельная область легкой цепи
29	CAGAATATTGGTAACTGG	mAb2 LCDR1
30	QNIGNW	mAb2 LCDR1
31	AAGGCGTCT	mAb2 и mAb3 LCDR2
32	KAS	mAb2 и mAb3 LCDR2
33	CAACAGTATAATAGTTATTCTCCCACT	mAb2 LCDR3
34	QQYNSYSPT	mAb2 и mAb3 LCDR3

35	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAAGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAAACTCCAGTCAAGGGACTGGAGTGGGTGA CACTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATA CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACA GCCTGAGATCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGAGAGAGGGGAACTGGAACACTACGGGCATGCTTTTG ATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTT CAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGC GCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGC CCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACC GGTGACGGTGTCTGTGGAACACTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCA GACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT CCAGCAGCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACG TAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAG AGAGTTGAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCC TGCCCAGCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTC TTCTGTTCCCCCAAAACCCAAGGACACTCTCATGA TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACT GGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGA CAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACC GTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACT GGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCA ACAAAGGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCT CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTG TACACCCTGCCCCCATCCCAGGAGGAGATGACCAAG AACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTC TACCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAAT GGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCC GTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCA GGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGG	mAb2 Тяжелая цепь
----	---	----------------------

36	<p>QVQLVESGGGVVQP GKSLRLSCAASGFTFSNYGMHW VRQTPVKGLEWVTLIWYDGSNKYYTDSVKGRFTISR D NSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAREGNWNYGHAFD I IWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG C CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS L LSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKY G GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV V VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNS T TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI S SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYP S SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV D DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK*</p>	<p>mAb2 Тяжелая цепь</p>
37	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG C CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG C CCAGTCAGAATATTGGTAACTGGTTGGCCTGGTATC A AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAACCTCCTGATTT A ATAAGGCGTCTACTTTAGAAAGTGGGGTCCCATCAA G GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTC T TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAAC T TTATAACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTCCCACT T TTTGGCCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAACGAACT G GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG A ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG C CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT A ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA C CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG A ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA G GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT G GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA C CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG</p>	<p>mAb2 Легкая цепь</p>

38	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQNIGNWLAWYQQ KPGKAPNLLIYKASTLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSL QPDDFATYNCQQYNSYSPTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*</p>	<p>mAb2 Легкая цепь</p>
39	<p>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CACTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTTTTTCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGATGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGCGAGAGATGGAGAGCAGCTCGGGCTTCGATCTCT GGGGCCGTGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA</p>	<p>mAb3 Варибельная область тяжелой цепи</p>
40	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWV RQAPGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRADDTAVYYCAREMESSSGFDLWGR GTLVTVSS</p>	<p>mAb3 Варибельная область тяжелой цепи</p>
41	<p>GCGCGAGAGATGGAGAGCAGCTCGGGCTTCGATCTC</p>	<p>mAb3 HCDR3</p>
42	<p>AREMESSSGFDL</p>	<p>mAb3 HCDR3</p>

43	<p>GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCT ATAAGGCGTCTAGTTTACAAAGTGGGGTCCCTTCAA GGTTCAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAAC TTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTCCGACG TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAA</p>	<p>mAb3 Вариабельная область легкой цепи</p>
44	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQISRWLAWYQQ KPGKAPKLLIYKASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNYSPTFGQGTKVEIK</p>	<p>mAb3 Вариабельная область легкой цепи</p>
45	<p>CAGAGTATTAGTAGGTGG</p>	<p>mAb3 LCDR1</p>
46	<p>QISRW</p>	<p>mAb3 LCDR1</p>
47	<p>CAACAGTATAATAGTTATTCTCCGACG</p>	<p>mAb3 LCDR3</p>

48	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTC CAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCG TCTGGATTCACCTTCAGTAACTATGGCATGCACTGGG TCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGG CACTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATG CAGACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAG ACAATTCCAAGAACACGCTTTTTCTGCAAATGAACA GCCTGAGAGCCGATGACACGGCTGTGTATTACTGTG CGCGAGAGATGGAGAGCAGCTCGGGCTTCGATCTCT GGGGCCGTGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCCTC CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGC TCCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCCGCCCTGGGC TGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACG GTGTTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCC GGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA GCTTGGGCACGAAGACCTACACCTGCAACGTAGATC ACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTT GAGTCCAAATATGGTCCCCCATGCCACCCTGCCCA GCACCTGAGTTCCTGGGGGGACCATCAGTCTTCCTGT TCCCCCAAACCCAAGGACACTCTCATGATCTCCC GGACCCCTGAGGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCAGGAAGACCCCGAGGTCCAGTTCAACTGGTACG TGGATGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC CGCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCACGTACCGTGTGG TCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAA GGCCTCCCGTCCTCCATCGAGAAAACCATCTCCAAA GCCAAAGGGCAGCCCCGAGAGCCACAGGTGTACACC CTGCCCCCATCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAG GTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTACCCCA GCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG CCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTG GACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAGGCTCA CCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGGAGGGGAATGTC	mAb3 Тяжелая цепь
----	---	----------------------

49	<p> QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWV RQAPGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRADDTAVYYCAREMESSSGFDLWGR GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK* </p>	<p>mAb3</p> <p>Тяжелая цепь</p>
50	<p> GACATCCAGATGACCCAGTCTCCTTCCACCCTGTCTG CATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGG CCAGTCAGAGTATTAGTAGGTGGTTGGCCTGGTATC AGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCT ATAAGGCGTCTAGTTTACAAAGTGGGGTCCCTTCAA GGTTCAAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAATTCACCTC TCACCATCAGCAGCCTGCAGCCTGATGATTTTGCAAC TTATTACTGCCAACAGTATAATAGTTATTCTCCGACG TTCGGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGAACT GTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTG ATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTG CCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGT ACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAA CTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCA CAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG </p>	<p>mAb3</p> <p>Легкая цепь</p>

51	<p>DIQMTQSPSTLSASVGDRTITCRASQSISRWLAWYQQ KPGKAPKLLIYKASSLQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISL QPDDFATYYCQQYNSYSPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*</p>	<p>mAb3 Легкая цепь</p>
52	<p>QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVAVIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREESSASGVDYWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVK DYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*</p>	<p>mAb1 Тяжелая цепь с модификацией N297Q</p>
53	<p>QVQLVESGGGVVQPGKSLRLSCAASGFTFSNYGMHW VRQTPVKGLEWVTLIWDGSNKYYTDSVKGRFTISRDN NSKNTLYLQMNSLRSEDTAVYYCAREGNWNYGHAFD IWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQS TYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*</p>	<p>mAb2 Тяжелая цепь с модификацией N297Q</p>

54	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSNYGMHWV RQAPGKGLEWVALIWYDGSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMNSLRADDTAVYYCAREMESSSGFDLWGR GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSSSLGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK*	mAb3 Тяжелая цепь с модификацией N297Q
----	--	---

55	MVSWGRFICLVVVTMATLSLARPSFSLVEDTTLEPEEPP TKYQISQPEVYVAAPGESLEVRCLLKDAAVISWTKDGV HLGPNNRTVLIGEYLQIKGATPRDSGLYACTASRTVDS ETWYFMVNVTDAISSGDEDDTDGAEDFVSENSNNKR APYWTNTEKMEKRLHAVPAANTVKFRCPAGGNPMPT MRWLKNGKEFKQEHRIGGYKVRNQHWSLIMESVPS DKGNYTCVVENEYGSINHTYHLDVVERSHPHPILQAGL PANASTVVGGDVEFVCKVYSDAQPHIQWIKHVEKNGS KYGPDGLPYLKVLKHSINSSNAEVLALFNVTEADAGE YICKVSNYIGQANQSAWLTVLPKQQAPGREKEITASPD YLEIAIYCIGVFLIACMVVTVILCRMKNNTTKKPDFSSQP AVHKLTKRIPLRRQVTVSAESSSSMNSNTPLVRITRLS STADTPMLAGVSEYELPEDPKWEFPRDKLTLGKPLGEG CFGQVMAEAVGIDKDKPKEAVTVAVKMLKDDATEK DLSDLVSEMEMMKMIGKHKNIINLLGACTQDGPLYVI VEYASKGNLREYLRARRPPGMEYSYDINRVPEEQMTF KDLVSCTYQLARGMEYLASQKCIHRDLAARNVLVTEN NVMKIADFGLARDINNIDYYKKTNGRLPVKWMAPEA LFDRVYTHQSDVWSFGVLMWEIFTLGGSPYPGIPVEEL FKLLKEGHRMDKPANCTNELYMMMRDCWHA VPSQR PTFKQLVEDLDRILTLTTNEEYLDLSQPLEQYSPSY PDT RSSCSSGDDSVFSPDPMPYEPCLPQYPHINGSVKT	FGFR2b, номер доступа NCBI NP_075259.4
----	---	--

56	<p>RPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQISQPEVYVAAPGESLEV RCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYLQIKGAT PRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTDAISSGDDED DTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPA ANTVKFRCPAGGNPMTMRWLKNGKEFKQEHRIGGY KVRNQHWLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTY HLDVVERSHPRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYS DAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLKHSGINSS NAEVLALFNVTEADAGEYICKVSNYIGQANQSAWLT LPKQQAPGREKEITASPDYLEIEPRGPTIKPCPPCKCPAP NLLGGPSVFIFPPKIKDVL MISLSPIVTCVVVDVSEDDPD VQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQH QDWMSGKEFKCKVNNKDL PAPIERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTD FMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVER NSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK</p>	<p>Внеклеточный домен изоформы рекомбинантно го человеческого FGFR2b (номер доступа NP_075259.4), слитый с мышиним Fc- доменом (номер доступа P01863)</p>
57	<p>RPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQISQPEVYVAAPGESLEV RCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYLQIKGAT PRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTDAISSGDDED DTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPA ANTVKFRCPAGGNPMTMRWLKNGKEFKQEHRIGGY KVRNQHWLIMESVVP SDKGNYTCVVENEYGSINHTY HLDVVERSHPRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYS DAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLKHSGINSS NAEVLALFNVTEADAGEYICKVSNYIGQANQSAWLT LPKQQAPGREKEITASPDYLEIEQKLISEEDLGGEQKLIS EEDLHHHHHH</p>	<p>hFGFR2b- MMH</p>

58	RPSFSLVEDTTLEPEEPPTKYQISQPEVYVAAPGESLEV RCLLKDAAVISWTKDGVHLGPNNRTVLIGEYLQIKGAT PRDSGLYACTASRTVDSETWYFMVNVTDAISSGDDED DTDGAEDFVSENSNNKRAPYWTNTEKMEKRLHAVPA ANTVKFRCPAGGNPMTMRWLKNGKEFKQEHRIGGY KVRNQHWSLIMESVVP SDKGNYTCV VENEYGSINHTY HLDVVERSPHRPILQAGLPANASTVVGGDVEFVCKVYS DAQPHIQWIKHVEKNGSKYGPDGLPYLKVLKAAGVNT TDKEIEVLYIRNVTFEDAGEYTCLAGNSIGISFHSAWLT VLPAPGREKEITASPDYLEEQKLISEEDLGGEQKLISEED LHHHHHH	hFGFR2c-MMH
----	---	-------------

[0457] Объем настоящего изобретения не ограничен конкретными вариантами осуществления, описанными в данном документе. Действительно, различные модификации настоящего изобретения, в дополнение к описанным в данном документе, будут очевидны специалистам в данной области техники из вышеизложенного описания и сопутствующих фигур. Предполагается, что такие модификации охватываются объемом прилагаемой формулы изобретения.

Формула изобретения

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые связываются с FGFR2, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют одну или более из следующих характеристик:

(a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $2,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;

(c) селективно связывают hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c и

(d) содержат три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2 или SEQ ID NO: 22 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 28 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

2. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 2 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности варибельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 10 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

3. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент обладают одной или более из следующих характеристик:

(a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $2,5 \times 10^{-8}$ М или меньше, как

измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;

(c) характеризуются периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 10 минут, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, и

(d) селективно связывают hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c.

4. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, содержащую две или меньше аминокислотных замен, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16, содержащую две или меньше аминокислотных замен.

5. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 4; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 8; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 12; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 14, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 16.

6. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2 или

аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей.

7. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

8. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи (HCVR) под SEQ ID NO: 22 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи (LCVR) под SEQ ID NO: 28 или в аминокислотной последовательности, которая на по меньшей мере 90% идентична ей.

9. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент обладают одной или более из следующих характеристик:

(a) представляют собой полностью человеческое моноклональное антитело;

(b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $8,9 \times 10^{-9}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;

(c) характеризуются периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 25 минут, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, и

(d) селективно связывают hFGFR2b по сравнению с hFGFR2c.

10. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR2 содержит аминокислотную

последовательность под SEQ ID NO: 6 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6, содержащую две или меньше аминокислотных замен; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30, содержащую две или меньше аминокислотных замен; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, содержащую две или меньше аминокислотных замен, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34 или аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34, содержащую две или меньше аминокислотных замен.

11. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 24; HCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 6; HCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 26; LCDR1 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 30; LCDR2 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 32, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 34.

12. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28 или аминокислотную последовательность, которая на по меньшей мере 95% идентична ей.

13. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 8, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

14. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически

эффективное количество одного или более выделенных человеческих моноклональных антител или их антигенсвязывающих фрагментов по любому из пп. 1—13 вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми вспомогательными веществами.

15. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая человеческое моноклональное антитело или его фрагмент, которые связываются с FGFR2, по любому из пп. 1—13.

16. Вектор экспрессии, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующую человеческое моноклональное антитело или его фрагмент, которые связываются с FGFR2, по п. 15.

17. Клетка-хозяин, содержащая вектор экспрессии по п. 11.

18. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1—13, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином.

19. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент демонстрируют одну или более из следующих характеристик:

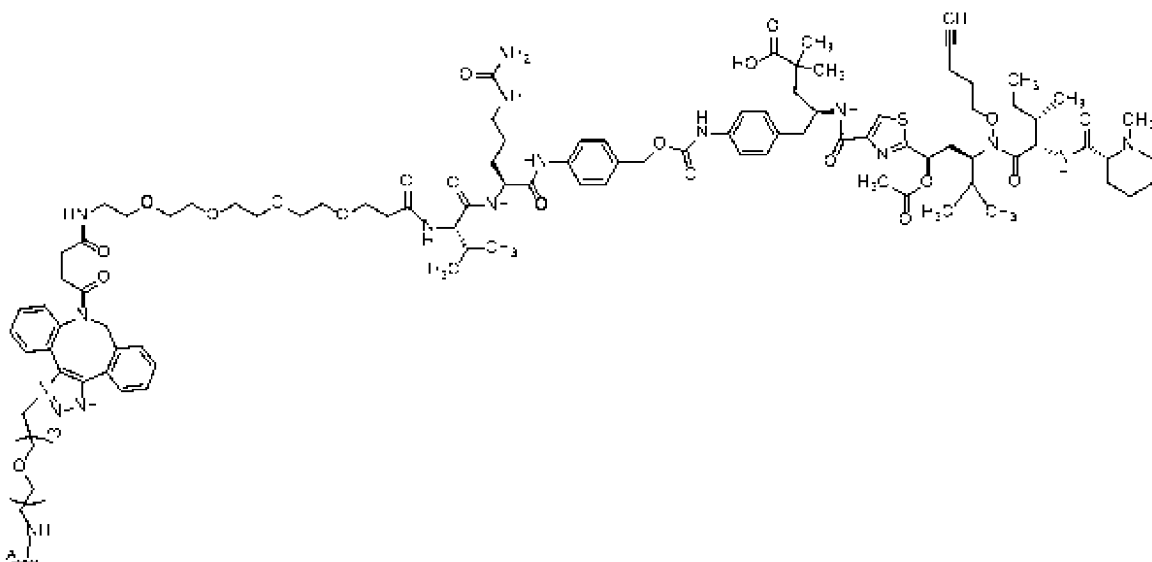
(a) обладают селективной цитотоксичностью по отношению к клеткам, экспрессирующим hFGFR2b, по сравнению с клетками, экспрессирующими hFGFR2c;

(b) связываются с FGFR2b с K_D , равной $4,8 \times 10^{-8}$ М или меньше, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса;

(c) характеризуются периодом полужизни ($t_{1/2}$), составляющим более чем приблизительно 7 минут, как измерено посредством поверхностного плазмонного резонанса, и

(d) индуцируют регрессию FGFR2b-положительных опухолей дозозависимым образом.

20. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 18, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из биотоксинов, химиотерапевтических средств и радиоизотопов.

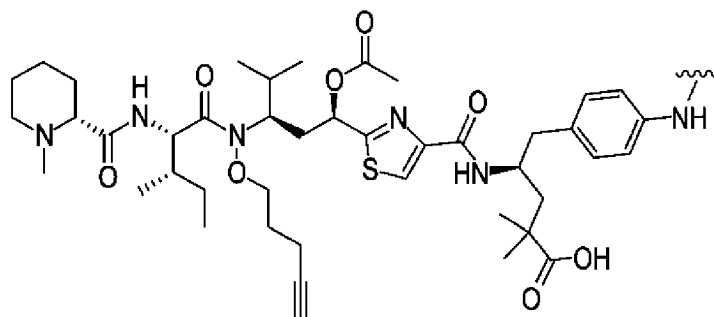


или его региоизомером, где ξ^A представляет собой связь с глутамином тяжелой цепи.

27. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 23, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с тубулизином по Q295.

28. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 27, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат тубулизин, конъюгированный по Q297.

29. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 23, где тубулизин представляет собой



где ξ представляет собой связь с линкером.

30. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29, где

линкер содержит фрагмент валин-цитруллин и PAB-фрагмент.

31. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

32. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

33. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

34. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28.

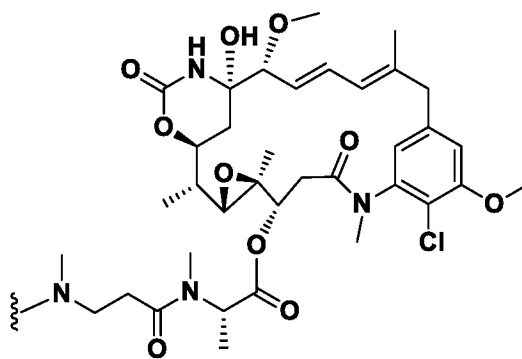
35. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под


SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34.

36. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 29 или п. 30, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

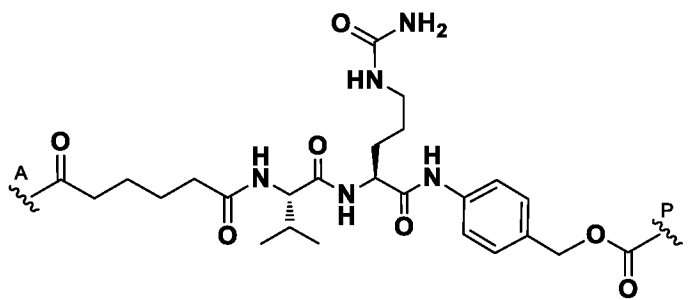
37. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, где цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид.



38. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 37, где майтанзиноид представляет собой



где  представляет собой связь с линкером.

39. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 38, где линкер представляет собой:



где связь, отмеченная с помощью , представляет собой связь с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, а связь, отмеченная с помощью , представляет собой связь с майтанзиноидом.

40. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому

из п. 38 или п. 39, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

41. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 38 или п. 39, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

42. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 38 или п. 39, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

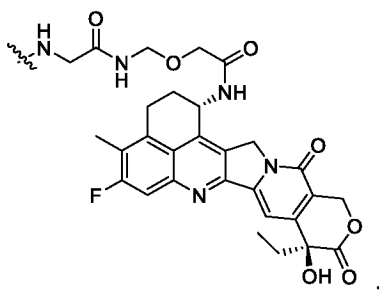
43. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 38 или п. 39, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28.

44. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 38 или п. 39, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34.

45. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из п. 38 или п. 39, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

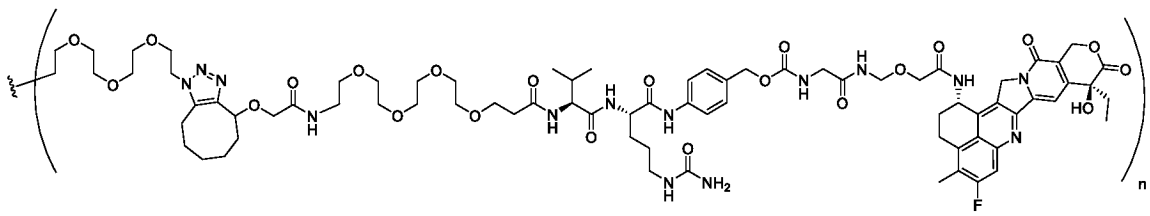
46. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, где цитотоксическое средство представляет собой аналог камптотецина.

47. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 22, где цитотоксическое средство представляет собой



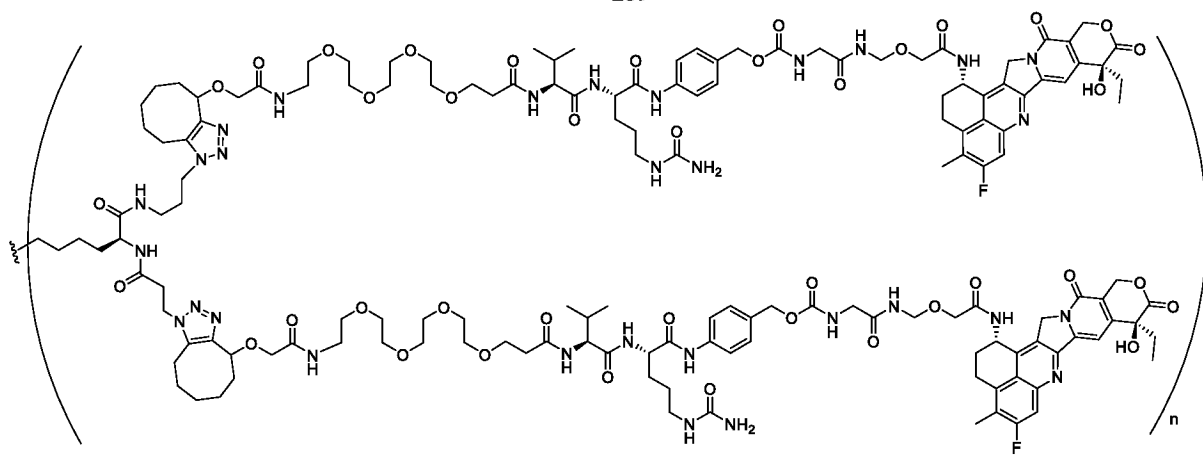
где \sim представляет собой точку присоединения к линкеру.

48. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 46, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



где \sim представляет собой связь с остатком глутамина указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и n равняется 4.

49. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 46, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с:



где \sim представляет собой связь с остатком глутамина указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и n равняется 4.

50. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47—49, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 2, и три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 10.

51. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47—49, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16.

52. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47—49, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

53. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47—49, содержащие три CDR тяжелой цепи (HCDR1, HCDR2 и HCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности HCVR под SEQ ID NO: 22, и

три CDR легкой цепи (LCDR1, LCDR2 и LCDR3), содержащиеся в аминокислотной последовательности LCVR под SEQ ID NO: 28.

54. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47—49, содержащие HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34.

55. Антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 47—49, содержащие HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

56. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 18—55 и фармацевтически приемлемый носитель.

57. Способ лечения рака у субъекта, страдающего опухолью, сверхэкспрессирующей FGFR2, при этом способ включает введение субъекту антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 18—55.

58. Способ по п. 57, где рак выбран из группы, состоящей из инвазивной протоковой карциномы молочной железы, аденокарциномы желудка, аденокарциномы пищевода, аденокарциномы толстой кишки и аденокарциномы желудочно-пищеводного соединения.

59. Способ по п. 57, дополнительно включающий введение субъекту второго противоракового терапевтического средства.

60. Способ лечения рака, снижения скорости роста опухоли и/или инициации регрессии опухоли у субъекта, при этом способ включает введение

субъекту, нуждающемуся в этом, конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC), содержащего антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент и цитотоксин, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат:

(i) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 4; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 8; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 12; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16, или

(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34.

61. Способ по п. 60, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

62. Способ по п. 60, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

63. Способ по любому из пп. 60—62-, где цитотоксин выбран из группы, состоящей из биотоксинов, химиотерапевтических средств и радиоизотопов.

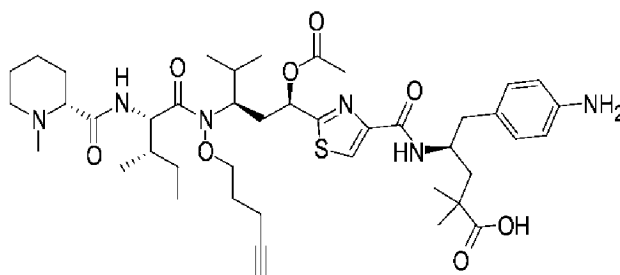
64. Способ по любому из пп. 60—63-, где цитотоксин представляет собой

тубулизин, майтанзиноид или камптотецин.

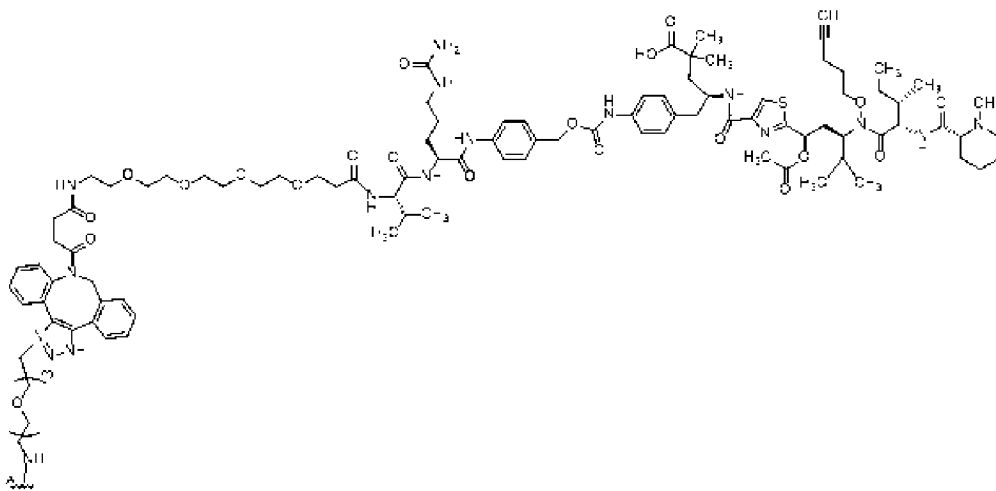
65. Способ по любому из пп. 60—64-, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксином посредством линкера.

66. Способ по п. 65, где цитотоксин представляет собой тубулизин.

67. Способ по п. 66, где тубулизин представляет собой



68. Способ по п. 65, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с



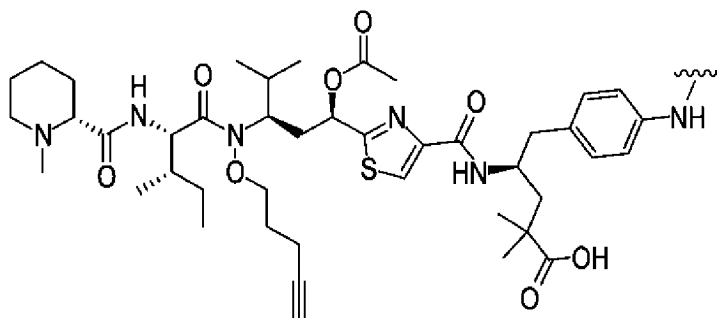
или его региоизомером, где ξ^A представляет собой связь с глутамином тяжелой цепи.

69. Способ по п. 66, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с тубулизином по Q295.

70. Способ по п. 69, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент дополнительно содержат тубулизин, конъюгированный по Q297.

71. Способ по п. 66,

где тубулизин представляет собой



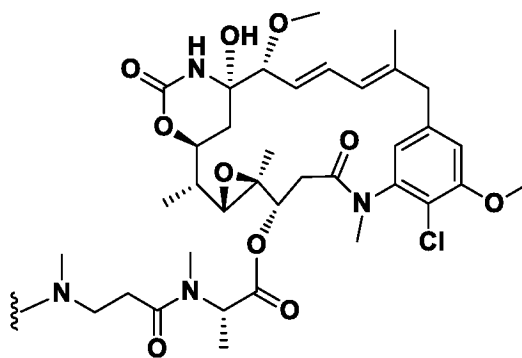
где ξ — представляет собой связь с линкером.

72. Способ по п. 71, где линкер содержит фрагмент валин-цитруллин и PAB-фрагмент.

73. Способ по любому из пп. 66—71-, где тубулизин конъюгирован с антителом к FGFR2 или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера, где линкер представляет собой азидо-PEG₃-амин.

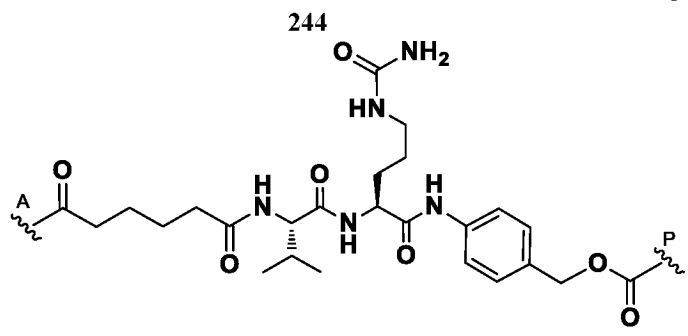
74. Способ по п. 65, где цитотоксическое средство представляет собой майтанзиноид.

75. Способ по п. 74, где майтанзиноид представляет собой:



где ξ — представляет собой связь с линкером.

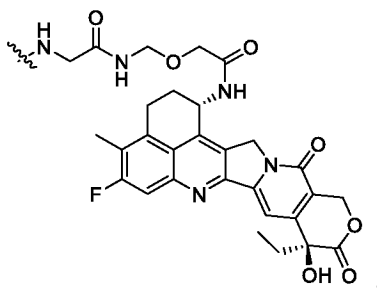
76. Способ по п. 75, где линкер представляет собой



где связь, отмеченная с помощью \sim^A , представляет собой связь с антителом к FGFR2 или его антигенсвязывающим фрагментом, а связь, отмеченная с помощью \sim^P , представляет собой связь с цитотоксином.

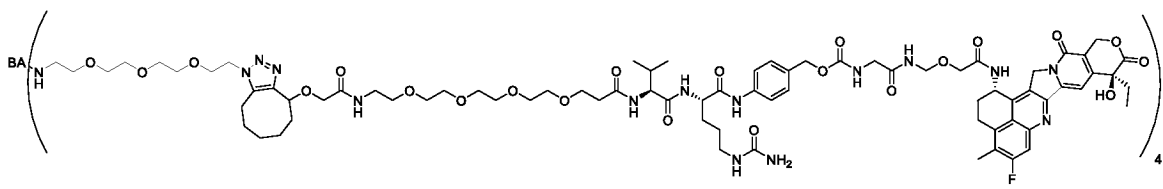
77. Способ по п. 55, где цитотоксин представляет собой аналог камптотецина.

78. Способ по п. 77, где аналог камптотецина представляет собой



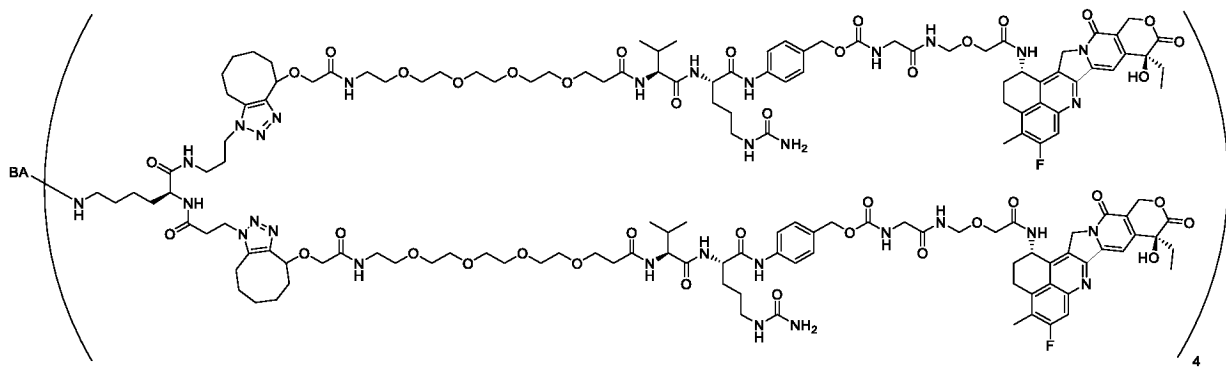
где \sim представляет собой точку присоединения к линкеру.

79. Способ по п. 76, где ADC представляет собой:



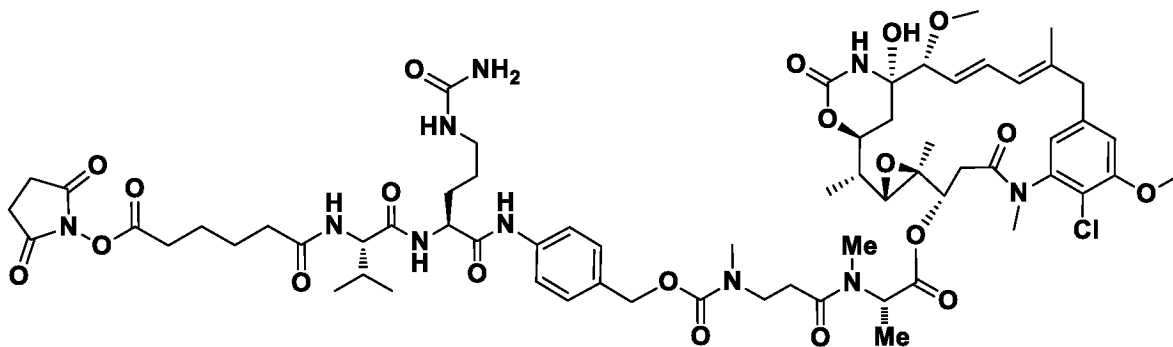
где BA представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

80. Способ по п. 76, где ADC представляет собой:



где BA представляет собой антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

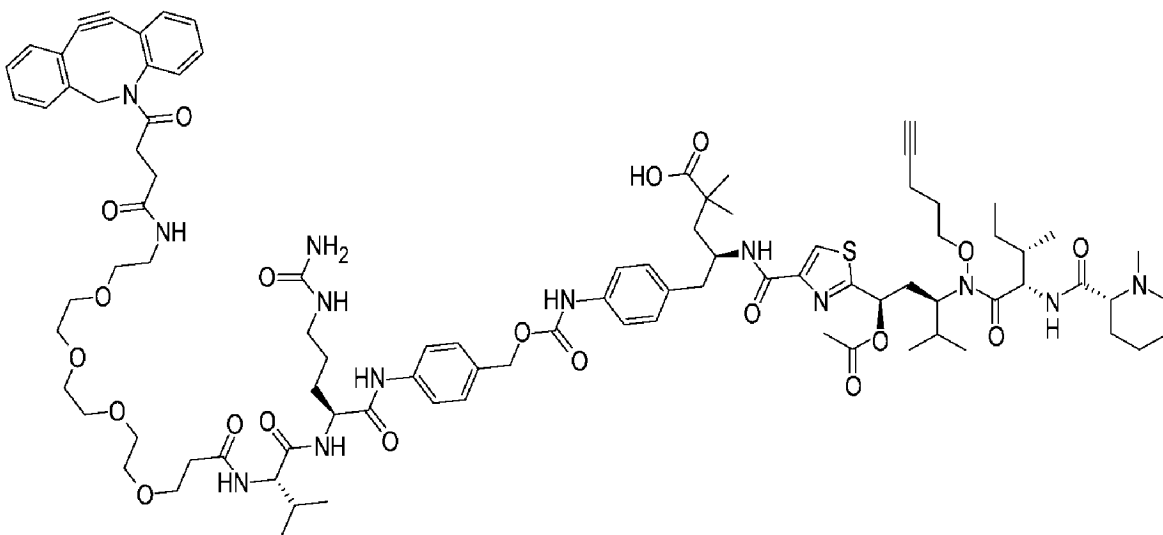
81. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой B¹:



B¹,

и водным разбавителем.

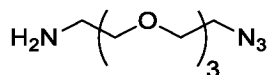
82. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента в контакт с соединением, характеризующимся следующей структурой:



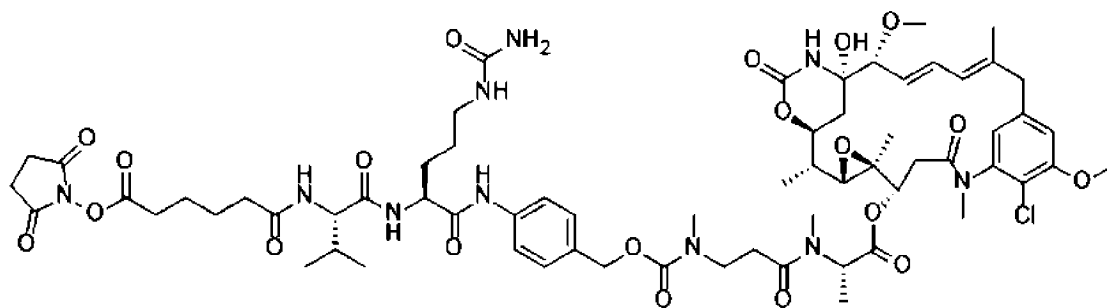
где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент функционализированы азидогруппой.

83. Способ по п. 80, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент, которые функционализированы азидогруппой, получают путем приведения антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента в контакт с трансглутаминазой и соединением, содержащим первичный амин, PEG-группу и азидогруппу.

84. Способ по п. 81, где соединение, содержащее первичный амин, PEG-группу и азидогруппу, представляет собой:



85. Способ получения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающий приведение антитела к FGFR2 или его антигенсвязывающего фрагмента в контакт с соединением, характеризующимся следующей формулой:



и водным разбавителем.

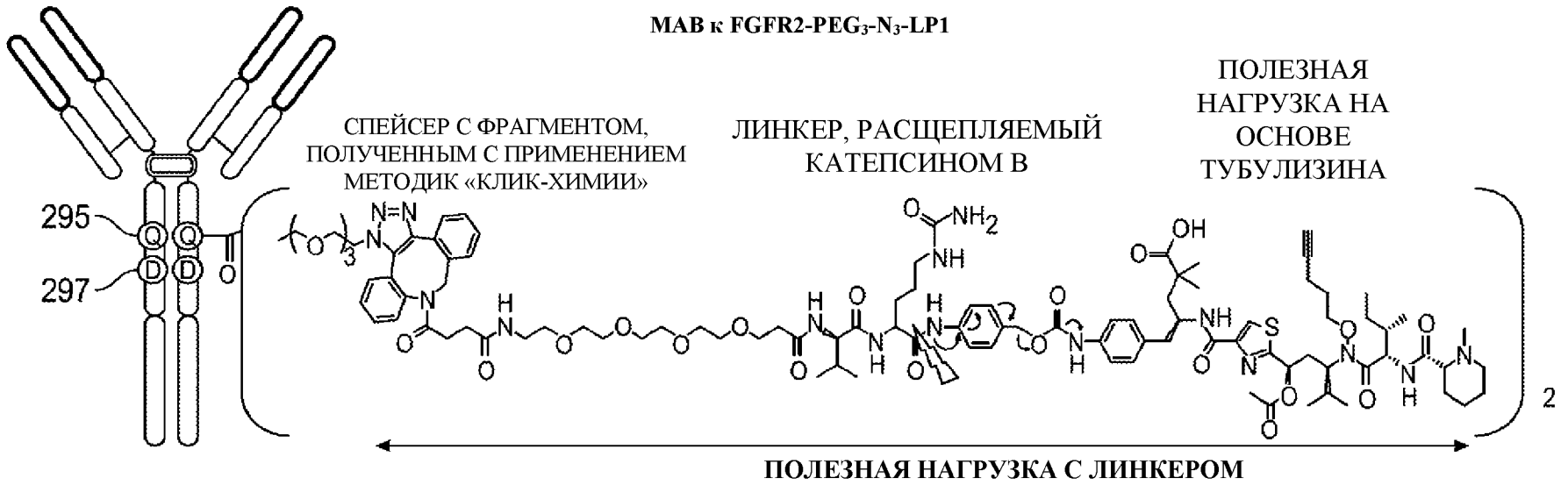
характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 14, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 16, или

(ii) HCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 24; HCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 6; HCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 26; LCDR1, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 30; LCDR2, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 32, и LCDR3, характеризующуюся аминокислотной последовательностью под SEQ ID NO: 34.

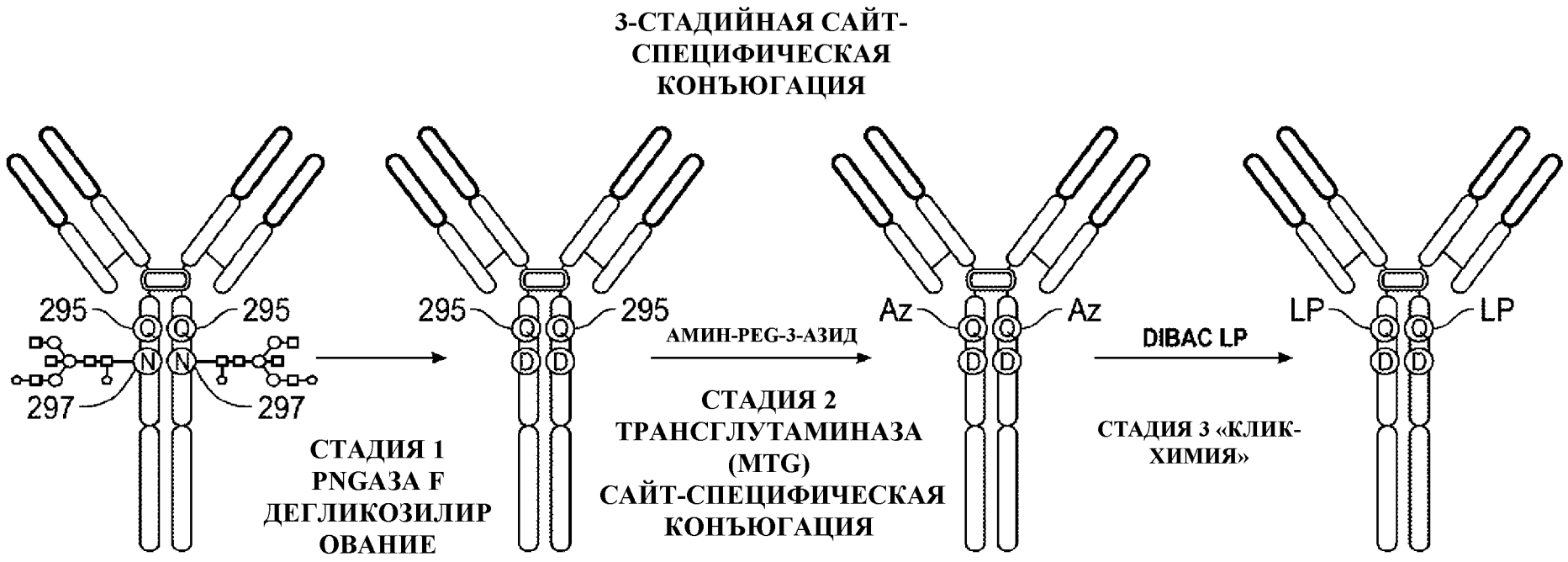
90. Способ по любому из пп. 81—89, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 2, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 10.

91. Способ по любому из пп. 81—89, где антитело к FGFR2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат HCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 22, и LCVR, содержащую аминокислотную последовательность под SEQ ID NO: 28.

92. Продукт, полученный посредством способа по любому из пп. 81—91.

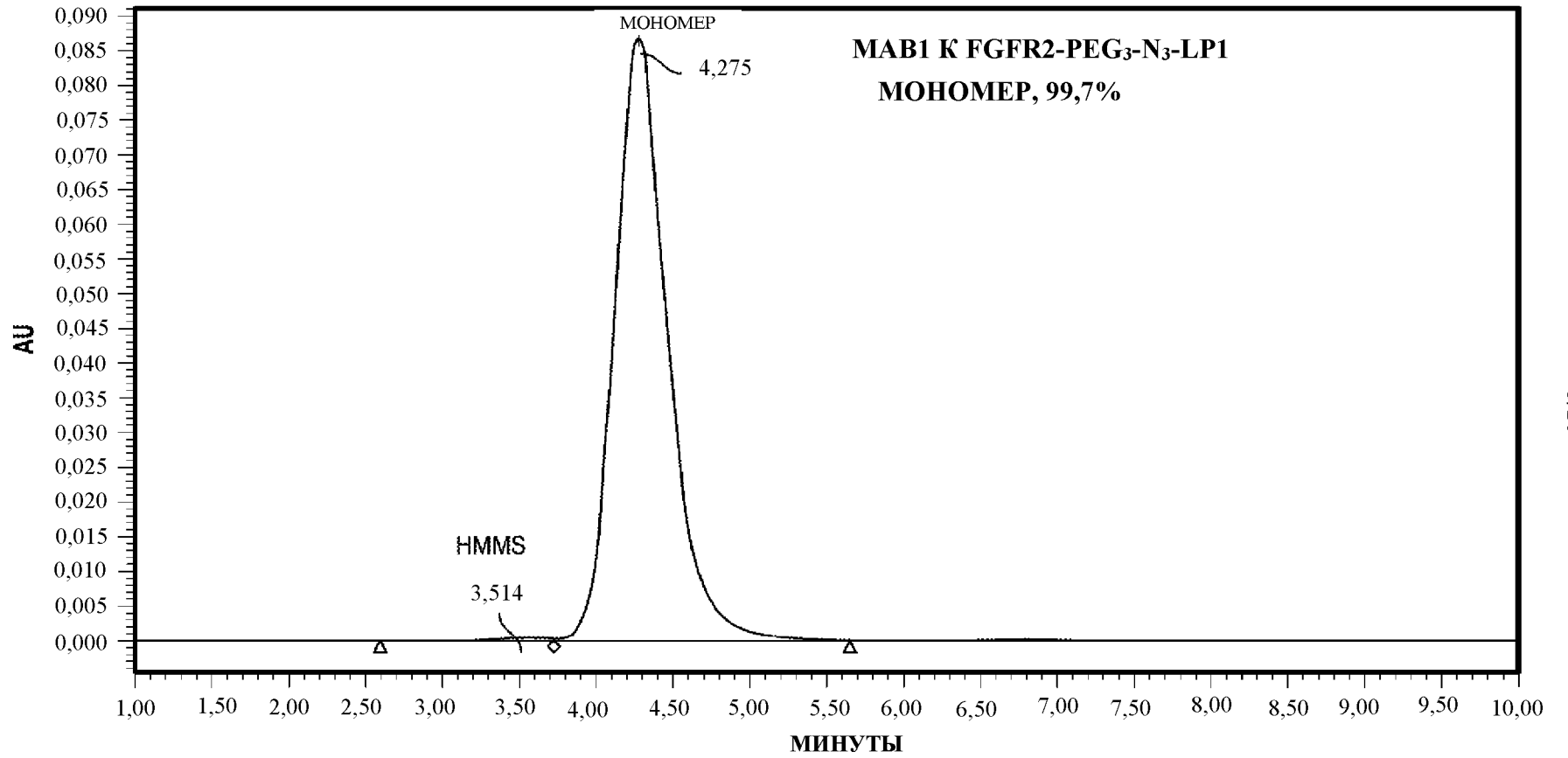


Фиг. 1А



Фиг. 1В

АНАЛИЗ ЧИСТОТЫ МОНОМЕРА ПОСРЕДСТВОМ SEC-HPLC



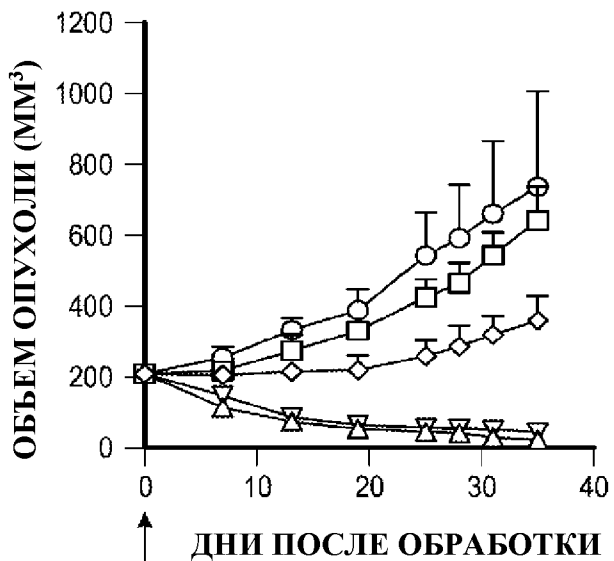
MAV1 К FGFR2-PEG₃-N₃-LP1
МОНОМЕР, 99,7%

МИНУТЫ

Фиг. 2

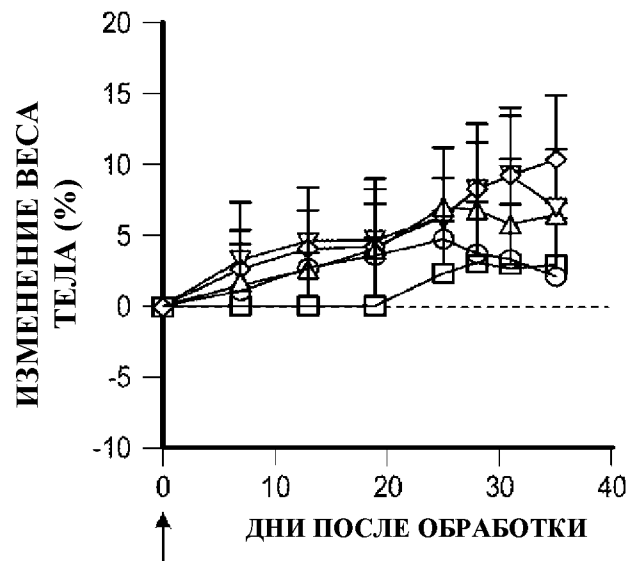
**ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2, С ТУБУЛИЗИНОМ, ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛ
 ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ
 КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU-16**

SNU-16, РАК ЖЕЛУДКА С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2



- КОНТРОЛЬНЫЙ ADC С ТУБУЛИЗИНОМ (3,0 МГ/КГ)
- ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (0,1 МГ/КГ)
- ◇ ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (0,3 МГ/КГ)
- ▽ ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (1,0 МГ/КГ)
- △ ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (3,0 МГ/КГ)

SNU-16, МЫШИ, НЕСУЩИЕ ОПУХОЛИ

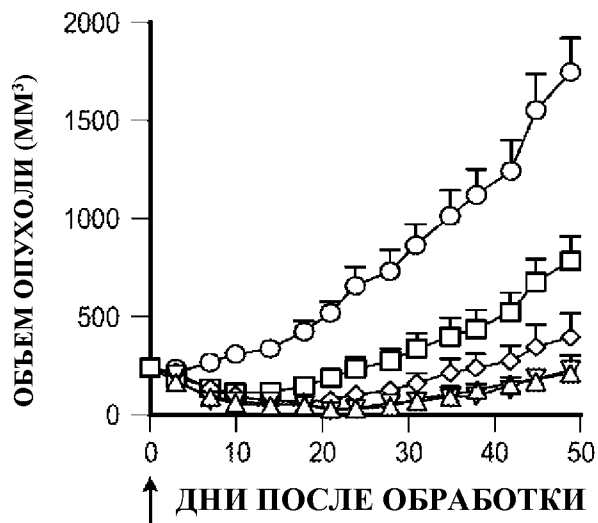


- КОНТРОЛЬНЫЙ ADC С ТУБУЛИЗИНОМ (3,0 МГ/КГ)
- ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (0,1 МГ/КГ)
- ◇ ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (0,3 МГ/КГ)
- ▽ ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (1,0 МГ/КГ)
- △ ADC МАВ1-ТУБУЛИЗИН (3,0 МГ/КГ)

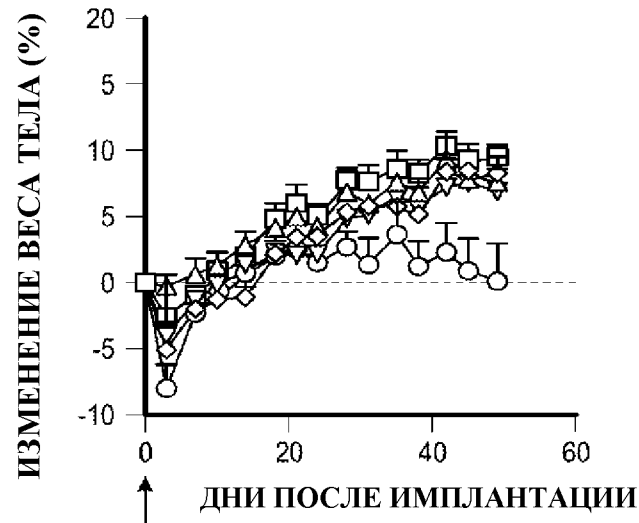
Фиг. 3

ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2, С МАЙТАНЗИНОИДОМ, ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU-16

SNU-16, РАК ЖЕЛУДКА С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2



SNU16, МЫШИ, НЕСУЩИЕ ОПУХОЛИ



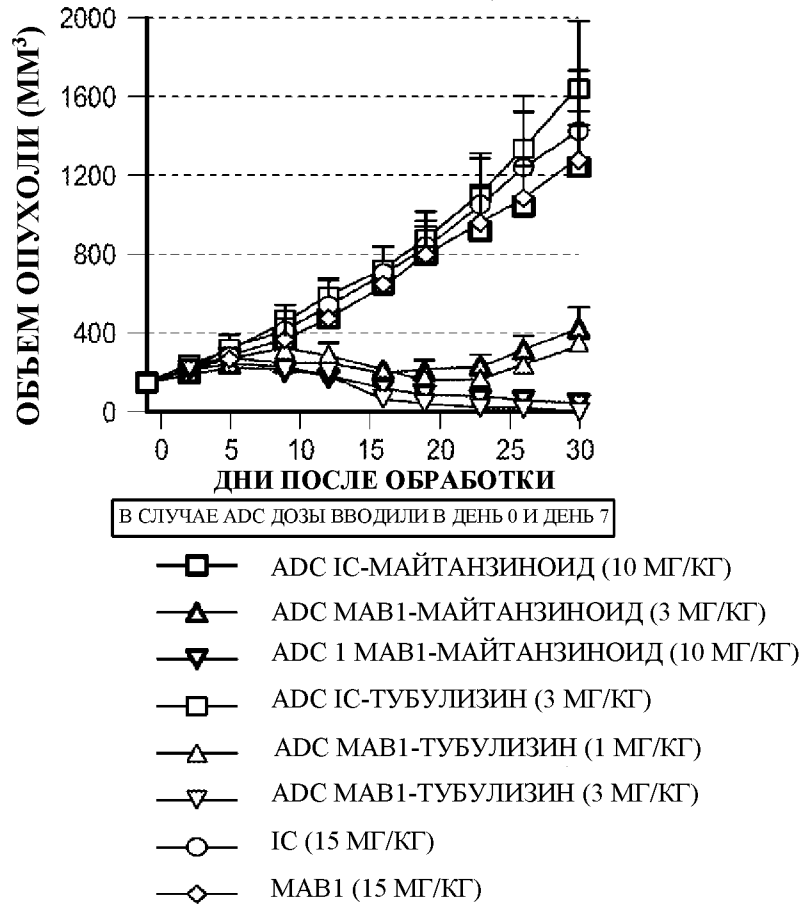
- КОНТРОЛЬНЫЙ ADC С МАЙТАНЗИНОИДОМ (15 МГ/КГ)
- ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (1,0 МГ/КГ)
- ◇ ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (3,0 МГ/КГ)
- ▽ ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (10 МГ/КГ)
- △ ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (15 МГ/КГ)

- КОНТРОЛЬНЫЙ ADC С МАЙТАНЗИНОИДОМ (15 МГ/КГ)
- ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (1,0 МГ/КГ)
- ◇ ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (3,0 МГ/КГ)
- ▽ ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (10 МГ/КГ)
- △ ADC МАВ2-МАЙТАНЗИНОИД (15 МГ/КГ)

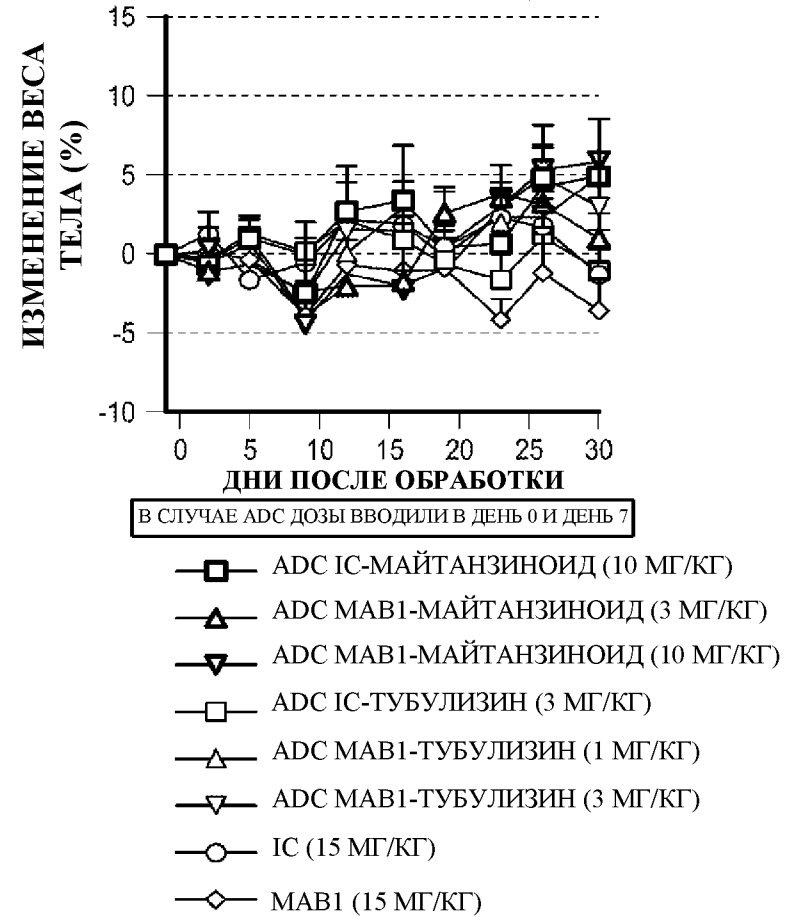
Фиг. 4

ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЕ FGFR2В, ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛИ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ ОПУХОЛЕЙ PDX GA0033 РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА

**GA0033, РАК PDX ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА
С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2**



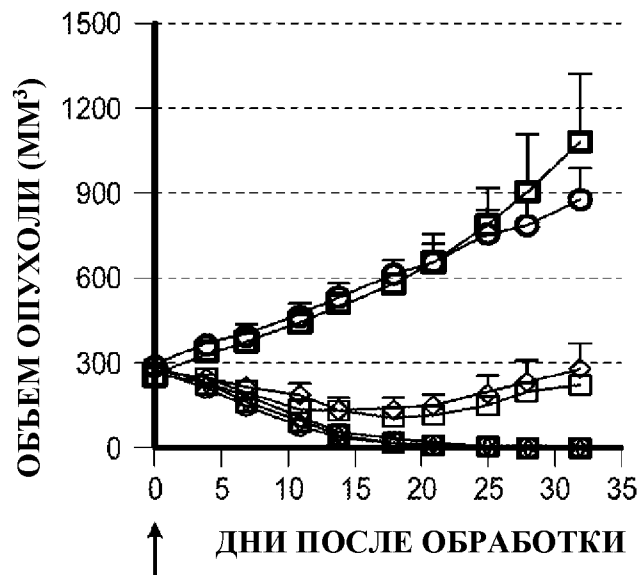
**GA0033, РАК PDX ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА
С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2**



Фиг. 5

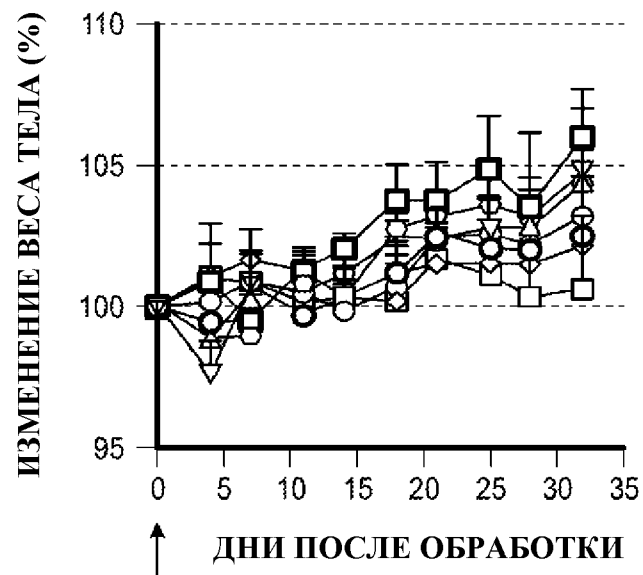
**ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЕ FGFR2В, С КАМПТОТЕЦИНОМ (КАМПТОТЕЦИН-LP1, DAR8),
ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛИ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В
ОТНОШЕНИИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU-16**

SNU-16, РАК ЖЕЛУДКА С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2



- ADC MAB2-КАПТОТЕЦИН-LP1 (1 МГ/КГ)
- ▽— ADC MAB2-КАПТОТЕЦИН-LP1 (3 МГ/КГ)
- △— ADC MAB2-КАПТОТЕЦИН-LP1 (10 МГ/КГ)
- ◇— ADC MAB1-КАПТОТЕЦИН-LP1 (1 МГ/КГ)
- ADC MAB1-КАПТОТЕЦИН-LP1 (3 МГ/КГ)
- ADC MAB1-КАПТОТЕЦИН-LP1 (10 МГ/КГ)
- IC-КАПТОТЕЦИН-LP1 (10 МГ/КГ)
- КОНТРОЛЬ СО СРЕДОЙ-НОСИТЕЛЕМ

МЫШИ, НЕСУЩИЕ ОПУХОЛИ SNU-16



- ADC MAB2-КАПТОТЕЦИН-LP1 (1 МГ/КГ)
- ▽— ADC MAB2-КАПТОТЕЦИН-LP1 (3 МГ/КГ)
- △— ADC MAB2-КАПТОТЕЦИН-LP1 (10 МГ/КГ)
- ◇— ADC MAB1-КАПТОТЕЦИН-LP1 (1 МГ/КГ)
- ADC MAB1-КАПТОТЕЦИН-LP1 (3 МГ/КГ)
- ADC MAB1-КАПТОТЕЦИН-LP1 (10 МГ/КГ)
- IC-КАПТОТЕЦИН-LP1 (10 МГ/КГ)
- КОНТРОЛЬ СО СРЕДОЙ-НОСИТЕЛЕМ

Фиг. 6

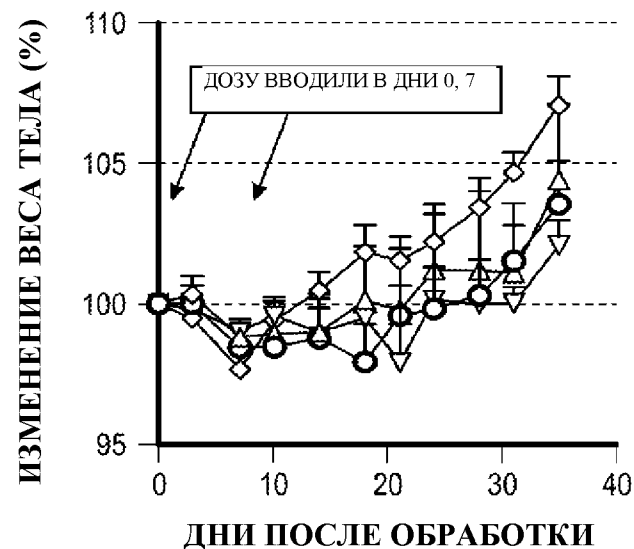
ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЕ FGFR2B, С КАМПТОТЕЦИНОМ (КАМПТОТЕЦИН-LP2, DAR4), ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛИ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU-16

SNU-16, РАК ЖЕЛУДКА С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2



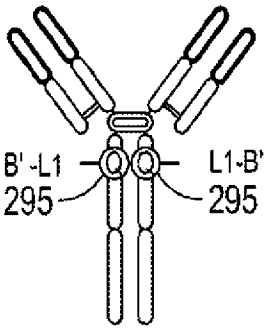
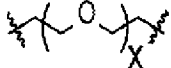
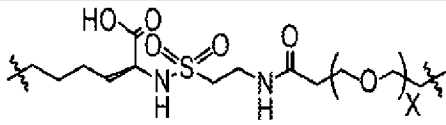
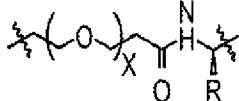
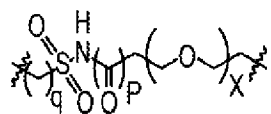
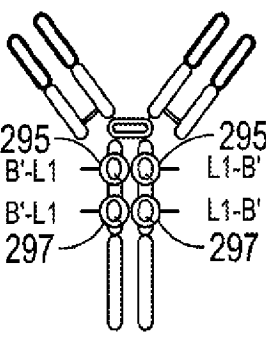
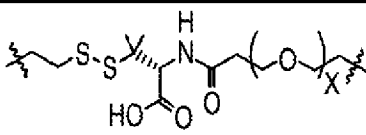
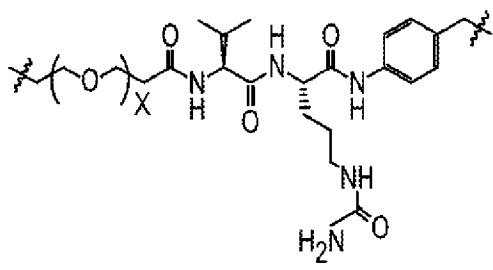
- △— ADC МАВ1-КАМПТОТОЦИН-LP2 (0,3 МГ/КГ)
- ▽— ADC МАВ1-КАМПТОТОЦИН-LP2 (1 МГ/КГ)
- ◇— ADC МАВ1-КАМПТОТОЦИН-LP2 (3 МГ/КГ)
- ADC IC-КАМПТОТОЦИН-LP2 (3 МГ/КГ)

SNU-16, МЫШИ, НЕСУЩИЕ ОПУХОЛИ

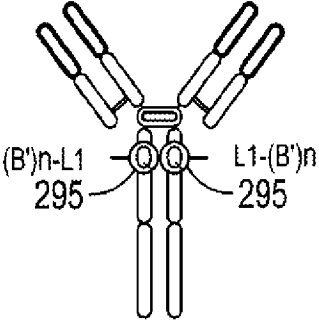
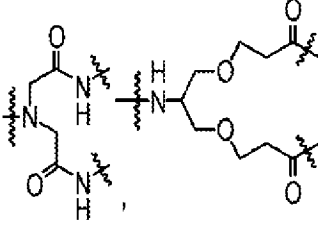
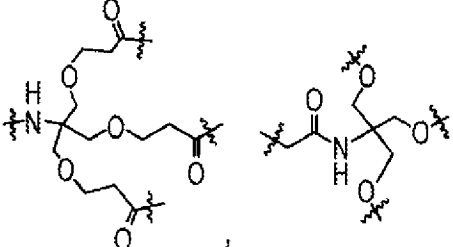
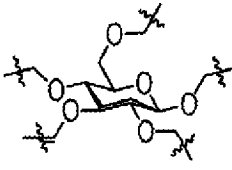
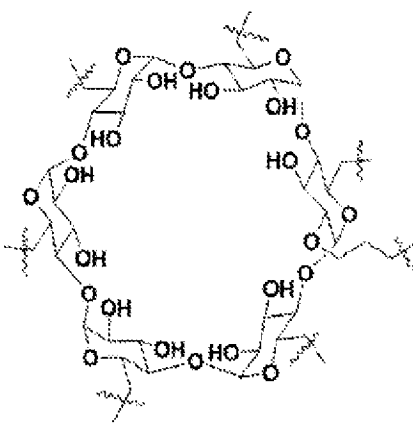
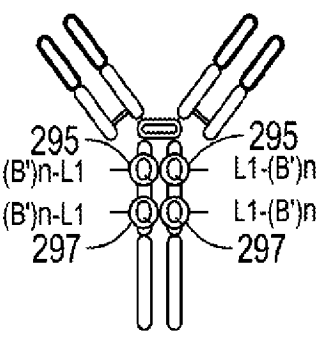
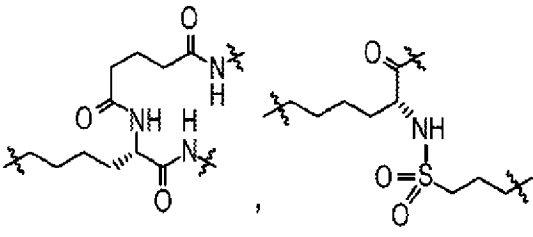


- △— ADC МАВ1-КАМПТОТОЦИН-LP2 (0,3 МГ/КГ)
- ▽— ADC МАВ1-КАМПТОТОЦИН-LP2 (1 МГ/КГ)
- ◇— ADC МАВ1-КАМПТОТОЦИН-LP2 (3 МГ/КГ)
- ADC IC-КАМПТОТОЦИН-LP2 (3 МГ/КГ)

Фиг. 7

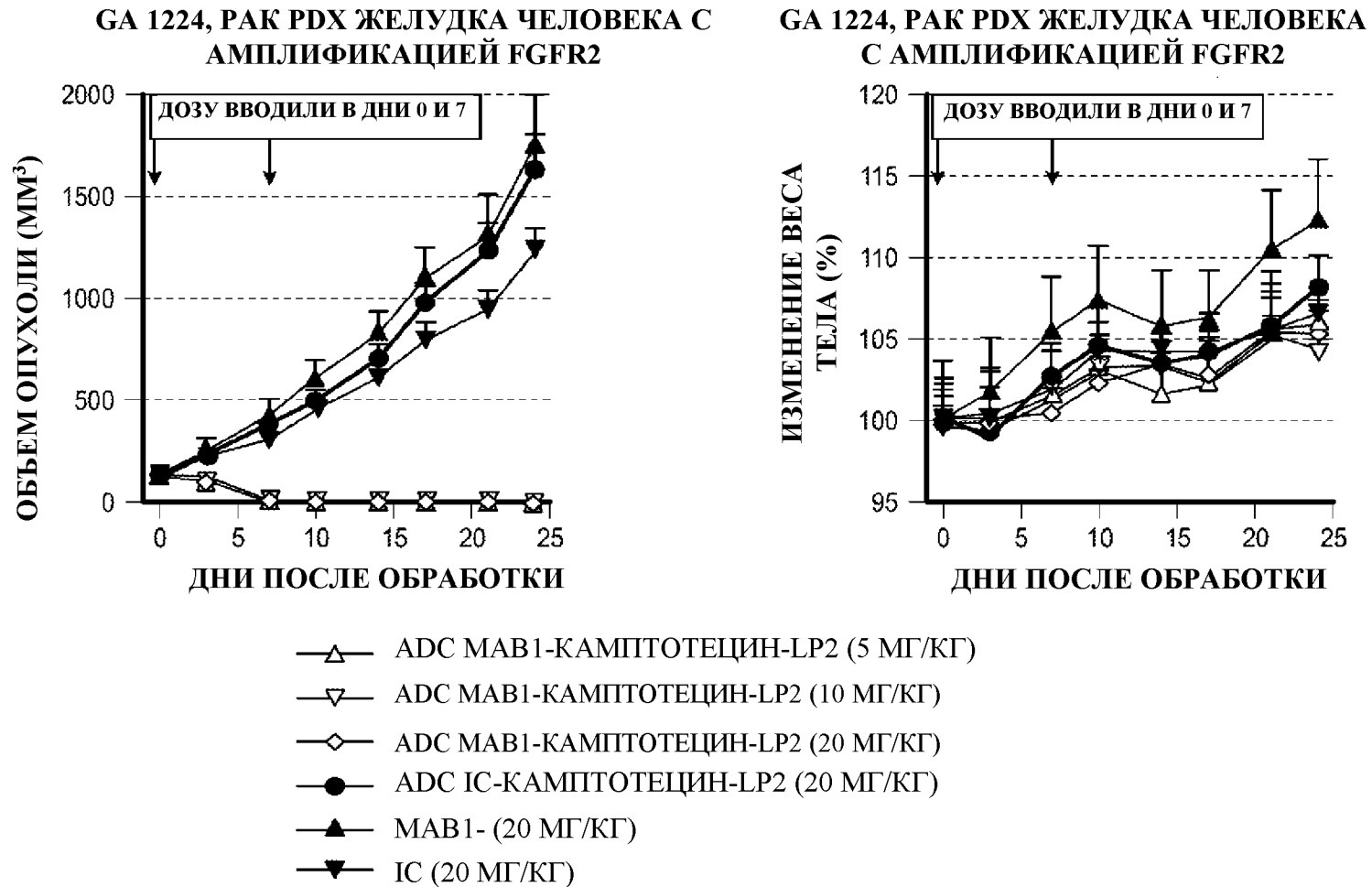
ОБЩАЯ СТРУКТУРА	DAR	L1-B'	
		(NH ₂ -L1-B' может быть выбран из таблицы 1)	B'
	2	ПЕПТИДЫ	-N ₃
			
			
			
			
	4		-N ₃
			

Фиг. 8

ОБЩАЯ СТРУКТУРА	ГРУППА	n	L1
	A	2	
	B	3	
	C	4	
	D	6	
	E		

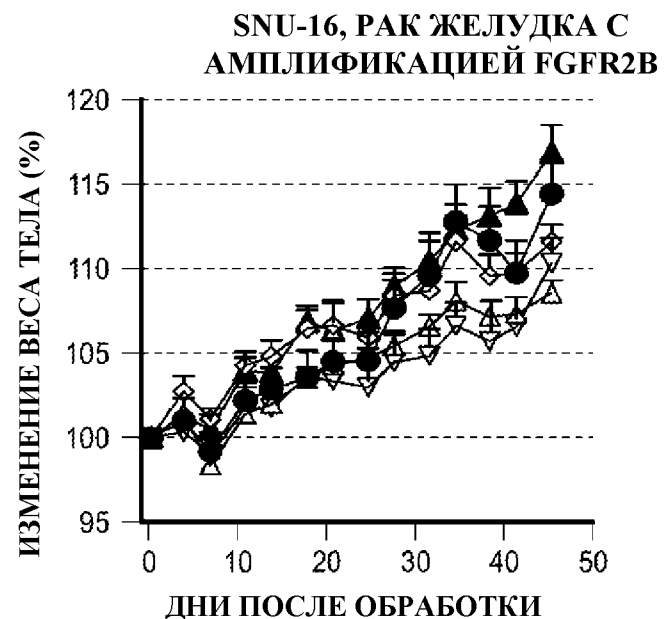
Фиг. 9

**ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЕ FGFR2B, С КАМПТОТЕЦИНОМ (DAR4), ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛИ
ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ
ОПУХОЛЕЙ PDX РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА GA1224**



Фиг. 10

КАК ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2B, С КАМПТОТЕЦИНОМ, ТАК И ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2B, С МАЙТАНЗИНОИДОМ, ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛИ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU16 SNU-16, РАК ЖЕЛУДКА С АМПЛИФИКАЦИЕЙ FGFR2



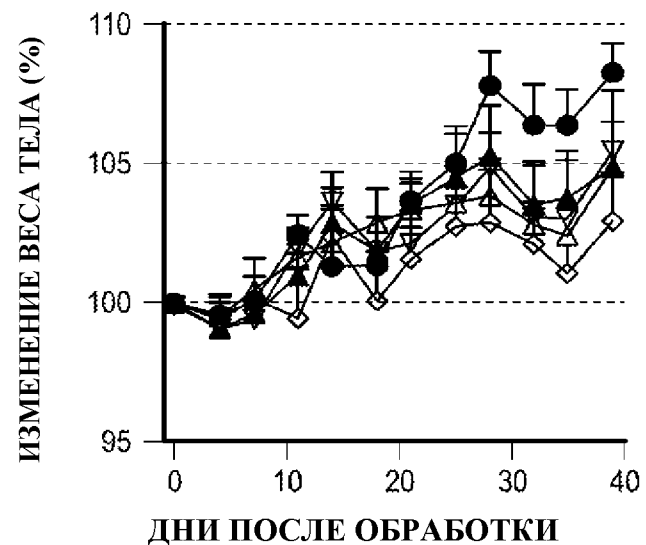
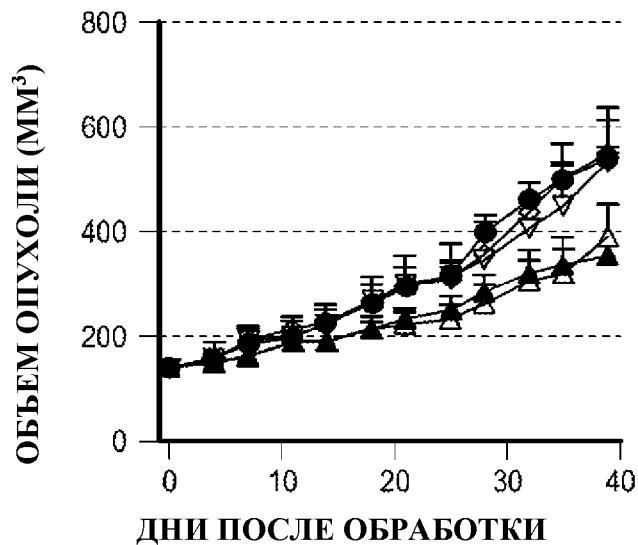
- ▲ ADC МАВ1-КАМПТОТЕЦИН-LP2 (10 МГ/КГ)
- ADC МАВ1-МАЙТАНЗИНОИД 1ALP (10 МГ/КГ)
- △ ADC IC-КАМПТОТЕЦИН-LP2 (10 МГ/КГ)
- ▽ IC-МАЙТАНЗИНОИД-1ALP (10 МГ/КГ)
- ◇ IC (10 МГ/КГ)

Фиг. 11

КАК ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2B, С КАМПТОТЕЦИНОМ, ТАК И ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2B, С МАЙТАНЗИНОИДОМ, ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛИ ОТСУТСТВИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ ЭФФЕКТИВНОСТИ В ОТНОШЕНИИ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU5

SNU-5, FGFR2-ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РАК ЖЕЛУДКА

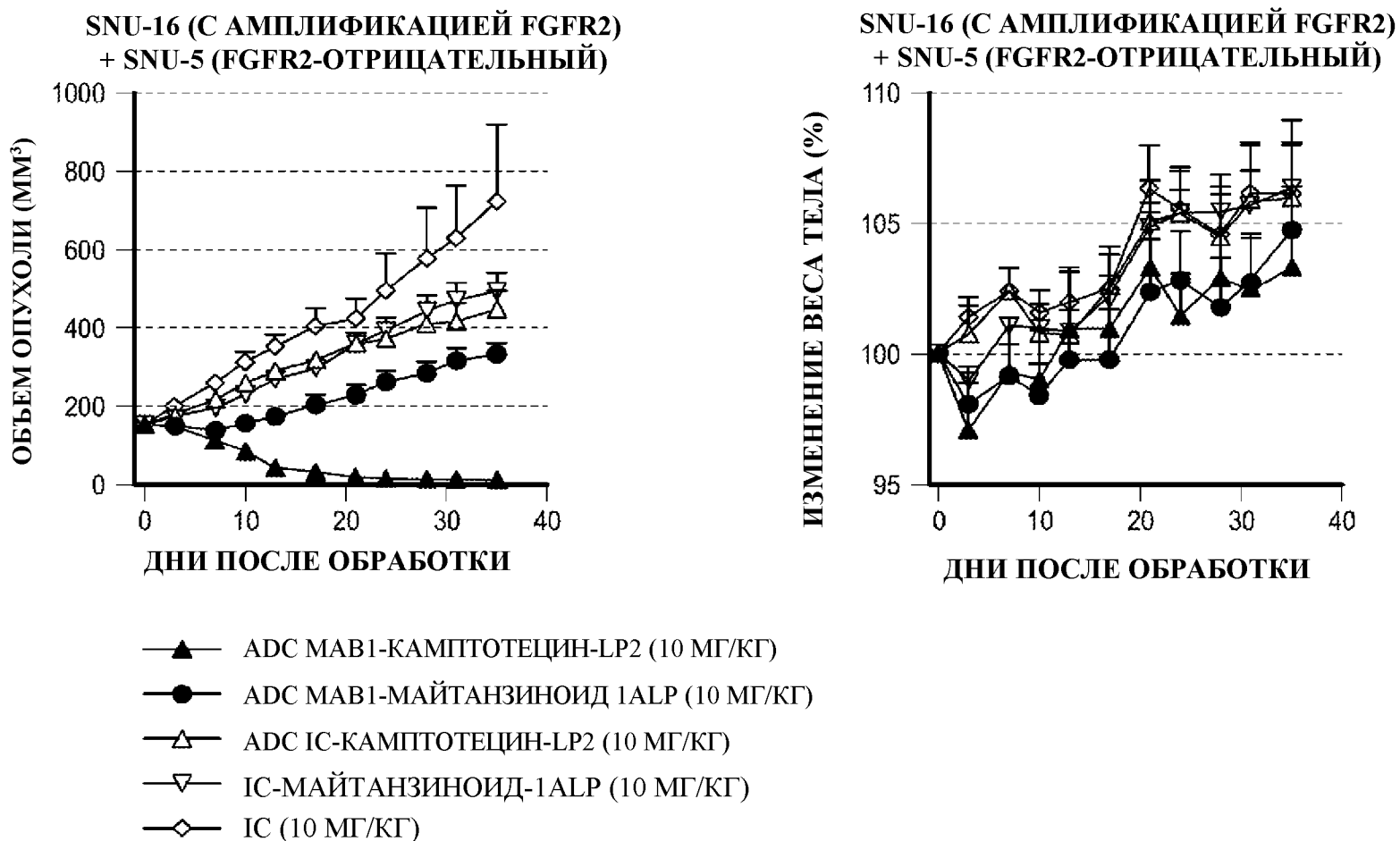
SNU-5, FGFR2-ОТРИЦАТЕЛЬНЫЙ РАК ЖЕЛУДКА



- ▲ ADC MAВ1-КАМПТОТЕЦИН-LP2 (10 МГ/КГ)
- ADC MAВ1-МАЙТАНЗИНОИД 1ALP (10 МГ/КГ)
- △ ADC IC-КАМПТОТЕЦИН-LP2 (10 МГ/КГ)
- ▽ IC-МАЙТАНЗИНОИД-1ALP (10 МГ/КГ)
- ◇ IC (10 МГ/КГ)

Фиг. 12

ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2В, С КАМПТОТЕЦИНОМ, НО НЕ ADC, СВЯЗЫВАЮЩИЙ FGFR2В, С М114, ПРОДЕМОНСТРИРОВАЛ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВУЮ ЭФФЕКТИВНОСТЬ В ОТНОШЕНИИ СОВМЕСТНО ИНОКУЛИРОВАННЫХ КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РАКА ЖЕЛУДКА ЧЕЛОВЕКА SNU-16 + SNU-5



Фиг. 13