

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(21) **202391898** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки  
**2023.12.15**

(22) Дата подачи заявки  
**2017.02.16**

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)  
*A61K 45/06* (2006.01)  
*C07K 16/28* (2006.01)  
*C07K 16/30* (2006.01)

---

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВСМА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ  
НАРУШЕНИЙ**

---

(31) **62/296,594; 62/396,084**

(32) **2016.02.17; 2016.09.16**

(33) **US**

(62) **201891851; 2017.02.16**

(71) Заявитель:  
**СИДЖЕН ИНК. (US)**

(72) Изобретатель:

**Сассман Джанго, Райан Морин,  
Вестендорф Лори, Фельдхаус Майкл  
(US)**

(74) Представитель:

**Медведев В.Н. (RU)**

---

(57) Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, которые специфически связываются с ВСМА. Указанные антитела могут эффективно использоваться для лечения и диагностики различных видов злокачественных новообразований и иммунологических нарушений, а также для выявления ВСМА.

**A1**

**202391898**

**202391898**

**A1**

**АНТИТЕЛА ПРОТИВ ВСМА И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ  
ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ И ИММУНОЛОГИЧЕСКИХ НАРУШЕНИЙ**

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННУЮ ЗАЯВКУ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной заявки США № 62/296,594, поданный 17 февраля 2016 года, и предварительной заявки США № 62/396,084, поданной 16 сентября 2016 года, которые включены в данный документ посредством ссылки в полном объеме для всех целей.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Последовательности, раскрытые в заявке, содержатся в перечне последовательностей, представленном в данном документе.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] В-клеточный антиген созревания (ВСМА, CD269) является членом суперсемейства рецептора ФНО. Экспрессия ВСМА ограничена В-клеточной линией, где он преимущественно экспрессируется в интрафолликулярной области зародышевых центров, а также на дифференцированных плазматических клетках и плазмобластах. ВСМА связывается с двумя различными лигандами, лигандом, индуцирующим пролиферацию (APRIL), и фактором активации В-лимфоцитов (BAFF, также известным как BlyS, TALL-1 и THANK). Лиганды ВСМА связывают два дополнительных рецептора ФНО, трансмембранный активатор и партнер модулятора кальция и лиганда циклофилина (TACI) и рецептор BAFF (BAFF-R, также называющийся BR3). TACI связывает APRIL и BAFF, тогда как BAFF-R демонстрирует ограниченное, но высокоаффинное связывание с BAFF. Вместе ВСМА, TACI, BAFF-R и их соответствующие лиганды регулируют различные аспекты гуморального иммунитета, развития В-клеток и гомеостаза.

[0004] ВСМА практически отсутствует в наивных В-клетках и В-клетках памяти (Novak и соавт., Blood 103, 689-94 (2004 год)), но он избирательно индуцируется в процессе дифференцировки плазматических клеток, где он может поддерживать гуморальный иммунитет, способствуя выживанию нормальных плазматических клеток и плазмобластов (O'Conner и соавт., J. Exp Med. 199, 91-98 (2004 год)). Сообщается, что ВСМА экспрессируется в образцах первичной множественной миеломы (ММ). ВСМА также обнаружен на

клетках Рида-Штернберга (CD30<sup>+</sup>) у пациентов с болезнью Ходжкина. На основании экспериментов с применением нокдауна, сообщается, что ВСМА способствовало как пролиферации, так и выживанию клеточной линии болезни Ходжкина (Chiu и соавт., Blood 109, 729-39 (2007 год)).

#### СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

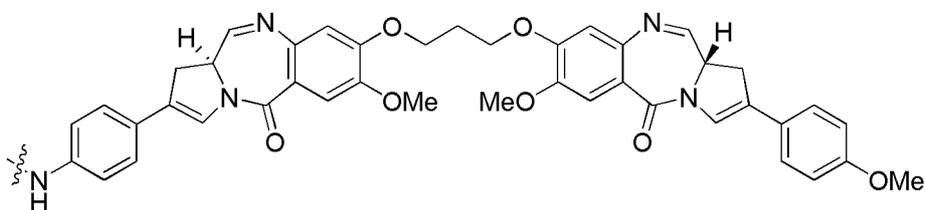
**[0005]** Изобретение относится к гуманизованному, химерному или венированному антителу, которое представляет собой гуманизованную или химерную форму антитела, депонированного как АТСС РТС-6937. Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). Необязательно, антитело, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19) при условии, что положение H58 может быть занято N или K, положение H60 может быть занято A или N, положение H61 может быть занято Q или E, положение H62 может быть занято K или N, положение H64 может быть занято Q или K, положение H65 может быть занято G или T, положение L24 может быть занято R или L и положение L53 может быть занято S или R. Необязательно, антитело содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). Необязательно, положения H58, H60, H61, H62, H64 и H65 заняты N, A, Q, K, Q и G, соответственно, а L24 и L53 заняты R и S, соответственно. Необязательно, положения H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно, а положения L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно. Необязательно, зрелая переменная область

тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19).

**[0006]** Изобретение дополнительно относится к гуманизированному химерному или венерованному антителу, которое представляет собой гуманизированную, химерную или венерованную форму антитела SG16.45 крысы, имеющую последовательности VH (SEQ ID NO:23) и VK (SEQ ID NO:33). Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36). Необязательно, антитело содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31) и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36). Необязательно, содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36) при условии, что положения H50 могут быть заняты A или S, и положение L24 может быть занято R или L, а положение L26 может быть занято S или T. Необязательно, антитело содержит три CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36). Необязательно, положения H30, H93 и H94 занято N, T и S, соответственно. Необязательно, зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36) или зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH1 (SEQ ID NO:27), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK1 (SEQ ID NO:35), или зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH1 (SEQ ID NO:27), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность

hSG16.45 VK3 (SEQ ID NO:37).

[0007] В любом из вышеуказанных антител зрелая переменная область тяжелой цепи может быть слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая переменная область легкой цепи может быть слита с константной областью легкой цепи. Необязательно, константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека, которая имеет ослабленное связывание с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью человека. Необязательно, константная область тяжелой цепи относится к изотипу IgG1. Необязательно, константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:5, и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:3. Необязательно, константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:7 (S239C), и константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:3. Необязательно, антитело представляет собой не конъюгированное антитело. Необязательно, антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом. Необязательно, антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом. Необязательно, цитотоксический агент конъюгирован через линкер, расщепляемый ферментом. Необязательно, цитотоксический агент представляет собой агент связывания по малой бороздке ДНК, например, цитотоксический агент, имеющий формулу



Необязательно, цитотоксический агент представляет собой MMAE или MMAF.

[0008] Изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим любое из описанных выше антител и фармацевтически приемлемый носитель.

[0009] В одном варианте реализации изобретение относится к антителу, содержащему три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). В дополнительном варианте осуществления изобретение относится к антителу, имеющему зрелую переменную область тяжелой цепи с последовательностью из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и зрелую переменную область легкой цепи с последовательностью из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). В другом варианте реализации изобретения зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи. Антитело может быть, например, антителом IgG1. В другом варианте реализации изобретения антитело не фукозилировано фукозой или аналогом фукозы в коре. Антитела могут быть получены в виде фармацевтической композиции, например, с добавлением фармацевтически приемлемого носителя.

[0010] В дополнительном варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция имеет множество антител, имеющих зрелую переменную область тяжелой цепи с последовательностью из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и зрелую переменную область легкой цепи с последовательностью из hSG16,17 VK2 (SEQ ID NO:19). Переменные области этих антител предпочтительно слиты с соответствующими константными областями тяжелой и легкой цепей. В другом варианте реализации изобретения антитела представляют собой антитела IgG1. В дополнительном варианте осуществления изобретения множество антител имеет менее чем около 5% антител, имеющих коровое фукозилирование фукозой или аналогом фукозы. В дополнительном варианте осуществления изобретения множество антител имеет менее чем около 10% антител, имеющих коровое фукозилирование фукозой или аналогом фукозы. В другом варианте реализации изобретения множество антител включает около 2% антител с коровым фукозилированием фукозой или аналогом фукозы. В другом варианте реализации изобретения множество антител включает 2% антител с коровым фукозилированием фукозой или аналогом фукозы.

[0011] Изобретение дополнительно относится к способу лечения

пациента, страдающего злокачественным новообразованием или имеющего риск возникновения злокачественного новообразования, экспрессирующего ВСМА, включающему введение пациенту антител по эффективной схеме лечения, как описано выше. Необязательно злокачественное новообразование представляет собой гематологическую опухоль. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой миелому, лейкемию или лимфому. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой множественную миелому. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ) или лимфому Ходжкина. Необязательно, гематологическая опухоль представляет собой миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС), макроглобулинемию Вальденстрема или лимфому Беркитта.

[0012] Изобретение дополнительно относится к способу лечения пациента, страдающего иммунологическим нарушением или имеющего риск развития иммунологического нарушения, опосредованного иммунными клетками, экспрессирующими ВСМА, включающему введение пациенту антитела по эффективной схеме лечения, как описано выше. Необязательно, нарушение представляет собой опосредуемое В-клеткой нарушение. Необязательно, иммунологическое нарушение представляет собой ревматоидный артрит, системную волчанку Е (SLE), диабет типа I, астму, атопический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина".

#### **КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ**

[0013] На Фиг. 1А изображена структура ВСМА.

[0014] На фиг. 1В изображено структурное взаимодействие внеклеточного домена ВСМА с ВАФФ.

[0015] На Фиг. 2 изображена процедура отбора антител.

[0016] На Фиг. 3 изображены данные связывания клеток и активность блокады лигандов для лунок неклонированной гибридомы.

[0017] На Фиг. 4 изображена активность блокады/процентное ингибирование антител к ВСМА.

[0018] На Фиг. 5 изображен ингибитор блокирования APRIL, титрованный антителами к ВСМА.

[0019] На Фиг. 6 изображено титрование блокирования BAFF с применением антител к ВСМА.

[0020] На Фиг. 7 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VH человека, HV1-2/HJ3. Она изображает крысу SG16.17 vH (SEQ ID NO:8) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:39-41) и CDR IMGT (SEQ ID NO:42 и 43); Человеческое HV1-2/HJ3 (SEQ ID NO:9) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:44 и 45) и IMGT CDR (SEQ ID NO:46 и "AR"); hSG16.17 vH1 (SEQ ID NO:11) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:50-52) и IMGT CDR (SEQ ID NO:53 и 54); hSG16.17 vH2 (SEQ ID NO:12) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:55-57) и IMGT CDR (SEQ ID NO:58 и 59); hSG16.17 vH3 (SEQ ID NO:13) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) и CDR IMGT (SEQ ID NO:63 и 64); и hSG16.17 vH4 (SEQ ID NO:14) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:65-67) и CDR IMGT (SEQ ID NO:68 и 69).

[0021] На Фиг. 8 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VH человека; HV1-46/HJ3. Она изображает последовательности крысы SG16.17 vH (SEQ ID NO:8) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:39-41) и CDR IMGT (SEQ ID NO:42 и 43); Человеческое HV1-46/HJ3 (SEQ ID NO:10) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:47 и 48) и IMGT CDR (SEQ ID NO:49 и "AR"); hSG16.17 vH5 (SEQ ID NO:15) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:70-72) и IMGT CDR (SEQ ID NO:73 и 74); и hSG16.17 vH6 (SEQ ID NO:16) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:75-77) и CDR IMGT (SEQ ID NO:78 и 79).

[0022] На Фиг. 9 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17. Она изображает последовательности hSG16.17 vH1-6 (SEQ ID NO:11-16).

[0023] На Фиг. 10 изображено выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VK человека; KV1-12/KJ5. Она изображает последовательности крысы SG16.17 vK (SEQ ID NO:17) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:80-82) и CDR IMGT (SEQ ID NO:83, "TTS" и SEQ ID NO:84, соответственно); Человеческое KV1-12/KJ5 (SEQ ID NO:18) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:85-87) и IMGT CDR (SEQ ID NO:88, "AAS" и SEQ ID NO:89 соответственно); hSG16.17 vK2 (SEQ ID NO:19) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) и

IMGT CDR (SEQ ID NO:93, "TTS" и SEQ ID NO:94, соответственно); hSG16.17 vK3 (SEQ ID NO:20) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:95-97) и IMGT CDR (SEQ ID NO:98, "TTS" и SEQ ID NO:99, соответственно); hSG16.17 vK4 (SEQ ID NO:21) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:100-102) и IMGT CDR (SEQ ID NO:103, "TTS" и SEQ ID NO:104, соответственно); и hSG16.17 vK5 (SEQ ID NO:22) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:105-107) и CDR IMGT (SEQ ID NO:108, "TTS" и SEQ ID NO:109, соответственно).

[0024] На Фиг. 11 изображено выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17. На фигуре показаны последовательности hSG16.17 vK2, vK3, vK4, vK5 (SEQ ID NO:19-22).

[0025] На Фиг. 12 изображен анализ конкурентного связывания, показывающий связывание химерного SG16.17 с человеческим FcRIIIa.

[0026] На Фиг. 13 изображено, что химерный SG16.17 индуцирует передачу сигнала через FcγRIIIA.

[0027] На Фиг. 14 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью VH HV3-23/HJ3 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vH (SEQ ID NO:23) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:110-112) и CDR IMGT (SEQ ID NO:113-115); человеческое HV3-23/HJ3 (SEQ ID NO:24) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:116 и 117) и IMGT CDR (SEQ ID NO:118 и 119 и "AK", соответственно); hSG16.45 vH1 (SEQ ID NO:27) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:128-130) и CDR IMGT (SEQ ID NO:131-133); hSG16.45 vH2 (SEQ ID NO:28) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:134-136) и CDR IMGT (SEQ ID NO:137-139); hSG16.45 vH3 (SEQ ID NO:29) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:140-142) и CDR IMGT (SEQ ID NO:143-145); и hSG16.45 vH4 (SEQ ID NO:30) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:146-148) и CDR IMGT (SEQ ID NO:149-151).

[0028] На Фиг. 15 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью VH HV3-74/HJ3 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vH (SEQ ID NO:23) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:110-112) и CDR IMGT (SEQ ID NO:113-115); человеческое HV3-74/HJ3 (SEQ ID NO:25) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:120 и 121) и CDR IMGT (SEQ ID NO:122 и

123 и "AR", соответственно); hSG16.45 vH5 (SEQ ID NO:31) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) и CDR IMGT (SEQ ID NO:155-157).

[0029] На Фиг. 16 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью VH HV3-9/HJ3 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vH (SEQ ID NO:23) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:110-112) и CDR IMGT (SEQ ID NO:113-115); человеческое HV3-9/HJ3 (SEQ ID NO:26) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:124 и 125) и IMGT CDR (SEQ ID NO:126 и 127 и "AR", соответственно); hSG16.45 vH6 (SEQ ID NO:32) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:158-160) и IMGT CDR (SEQ ID NO:161-163).

[0030] На Фиг. 17 изображено выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45. На фигуре показаны последовательности hSG16.45 vH1-6 (SEQ ID NO:27-32).

[0031] На Фиг. 18 изображено выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью KV KV3-20/KJ2 человека. На фигуре показаны последовательности крысы SG16.45 vK (SEQ ID NO:33) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:164-166) и CDR IMGT (SEQ ID NO:167, "STS") и SEQ ID NO:168, соответственно); Человеческое KV3-20/KJ2 (SEQ ID NO:34) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:169-171) и IMGT CDR (SEQ ID NO:172, "STS" и SEQ ID NO:173, соответственно); hSG16.45 vK1 (SEQ ID NO:35) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:174-176) и CDR IMGT (SEQ ID NO:177, "STS" и SEQ ID NO:178, соответственно); hSG16.45 vK2 (SEQ ID NO:36) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) и IMGT CDR (SEQ ID NO:182, "STS" и SEQ ID NO:183, соответственно); hSG16.45 vK3 (SEQ ID NO:37) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:184-186) и IMGT CDR (SEQ ID NO:187, "STS" и SEQ ID NO:188, соответственно); и hSG16.45 vK5 (SEQ ID NO:38) с CDR по Кабат (SEQ ID NO:189-191) и IMGT CDR (SEQ ID NO:192, "STS" и SEQ ID NO:193, соответственно).

[0032] На Фиг. 19 изображено выравнивание вариантов hSG16.45 легкой цепи. На фигуре показаны последовательности hSG16.45 vK1, vK2, vK3, vK5 (SEQ ID NO:35-38).

[0033] На Фиг. 20А-С изображена активность *in vivo* мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MM1S у мышей SCID.

[0034] На Фиг. 21А-С изображена активность *in vivo*

однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли EJM у мышей NSG.

[0035] На Фиг. 22 изображена активность *in vivo* мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG.

[0036] На Фиг. 22А-В изображена активность *in vivo* однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG.

[0037] На Фиг. 24 изображена активность *in vivo* однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MOLP-8-люцифераза у мышей SCID.

[0038] На Фиг. 25 изображена активность ADCC антитела SG16.17 SEA на целевые клетки MM1R.

#### **ОПРЕДЕЛЕНИЯ**

[0039] "Выделенное" антитело относится к антителу, которое было идентифицировано и отделено и/или извлечено из компонентов естественной среды, и/или к антителу, которое получено рекомбинантным путем. "Очищенное антитело" представляет собой антитело, которое обычно составляет по меньшей мере 50% масс./масс. чистоты от окружающих белков и других контаминантов, возникающих в результате его выделения или очистки, но не исключает возможности сочетания моноклонального антитела с избытком фармацевтически приемлемого носителя (лей) или другого транспортного средства, предназначенного для облегчения его применения. Интерферирующие белки и другие контаминанты могут включать, например, клеточные компоненты клеток, из которых антитело выделено или получено рекомбинантным путем. Иногда моноклональные антитела представляют собой по меньшей мере 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% мас./мас. Окружающих белков и контаминантов от получения или очистки. Антитела, описанные в настоящем документе, включая крысиные, химерные, венированные и гуманизированные антитела, могут быть представлены в выделенной и/или очищенной форме.

[0040] Термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции в значительной степени однородных антител, то есть, отдельные антитела в составе

популяции являются идентичными, за исключением мутаций, происходящих по естественным причинам, которые могут присутствовать в небольших количествах. Определение "моноклональное" указывает на то, что антитело получено из практически однородной популяции антител; его не следует интерпретировать как требование о продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Например, моноклональные антитела, которые будут использоваться в настоящем изобретении, могут быть получены с помощью гибридного метода, впервые описанного Kohler и соавт. (1975 год) *Nature* 256:495 или могут быть получены методами рекомбинантных ДНК (см., например, патент США № 4816567). "Моноклональные антитела" также могут быть выделены из фаговых библиотек антител, применяя методы, описанные в Clackson и соавт. (1991 год) *Nature*, 352:624-628 и Marks и соавт. (1991 год) *J. Mol. Biol.*, 222:581-597, например, или могут быть созданы другими способами. Антитела, описанные в данном документе, представляют собой моноклональные антитела.

[0041] Специфическое связывание моноклонального антитела с его целевым антигеном означает аффинность по меньшей мере  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$ ,  $10^9$ , или  $10^{10} \text{ M}^{-1}$ . Специфическое связывание существенно выше по величине и отличается от неспецифического связывания, возникающего, по меньшей мере, с одной несвязанной целью. Специфическое связывание может быть результатом образования связей между конкретными функциональными группами или конкретным пространственным положением (например, по типу "ключа и замка"), тогда как неспецифическое связывание обычно является результатом сил Ван-дер-Ваальса.

[0042] Основная структурная единица антитела представляет собой тетрамер субъединиц. Каждый тетрамер включает две идентичные пары полипептидных цепей, причем каждая пара имеет одну "легкую" (около 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (около 50-70 кДа). Амино-концевая часть каждой цепи включает в себя переменную область от около 100 до 110 или более аминокислот, в основном ответственных за распознавание антигена. Эта переменная область первоначально экспрессируется связанной с расщепляемым сигнальным пептидом. Переменная область без

сигнального пептида иногда упоминается как зрелая переменная область. Таким образом, например, зрелая переменная область легкой цепи означает переменную область легкой цепи без сигнального пептида легкой цепи. Карбокси-концевая часть каждой цепи определяет константную область, в основном ответственную за эффекторную функцию.

[0043] Легкие цепи подразделяются на каппа или лямбда. Тяжелые цепи подразделяются на гамма, мю, альфа, дельта или эпсилон и определяют изотип антитела как IgG, IgM, IgA, IgD и IgE, соответственно. В пределах легкой и тяжелой цепей переменная и константная области соединяются областью "J", содержащей около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также включает область "D", содержащую около 10 или более аминокислот. (См. в общем, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ред., 2-е изд. Raven Press, N.Y., 1989 год, Гл. 7, которая включена в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей).

[0044] Зрелые переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания являются одинаковыми. Все цепи имеют одинаковую общую структуру относительно консервативных каркасных областей (FR), соединенных тремя гиперпеременными областями, также называемыми областями, определяющими комплементарность или CDR. CDR из двух цепей каждой пары, выравниваются каркасными областями, что позволяет связывать их с определенным эпитопом. От N-конца до C-конца, как легкие, так и тяжелые цепи содержат домены FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Назначение аминокислот для каждого домена соответствует определениям Кабата, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, 1987 и 1991), или Чотиа & Леск, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987 год); Chothia и соавт., *Nature* 342:878-883 (1989 год), или комбинации Кабата и Чотиа, или IMGT, АтМ или Контакт или другое общепринятое определение CDR. Кабат также обеспечивает широко используемое соглашение о нумерации (нумерация по Кабат), в

котором соответствующим остаткам между различными тяжелыми цепями или между различными легкими цепями назначается одинаковый номер. Если иное не исходит из контекста, нумерация по Кабат используется для обозначения положения аминокислот в переменных областях. Если из контекста не исходит иначе, нумерация EU используется для обозначения позиций в константных областях.

[0045] Термин "антитело" включает интактные антитела и их связывающие фрагменты. Как правило, фрагменты антител конкурируют с интактным антителом, из которого они были получены по специфическому связыванию с целью, включая отдельные тяжелые цепи, легкие цепи Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>, диатела, Дат, нанотела и Fv. Фрагменты могут быть получены методами рекомбинантной ДНК или путем ферментативного, или химического разделения интактных иммуноглобулинов. Термин "антитело" также подразумевает диатело (гомодимерный Fv-фрагмент) или минитело (V<sub>L</sub>-V<sub>H</sub>-C<sub>H3</sub>), биспецифическое антитело или тому подобное. Биспецифическое или бифункциональное антитело представляет собой искусственное гибридное антитело, имеющее две различные пары тяжелой/легкой цепи и два разных сайта связывания (см., например, Songsivilai и Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990 год); Kostelny и соавт., J. Immunol., 148:1547-53 (1992 год)).

[0046] Термин "антитело" подразумевает само антитело (не конъюгированное антитело) или антитело, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим лекарственным средством.

[0047] Химерное антитело представляет собой антитело, в котором зрелые переменные области легких и тяжелых цепей антитела, отличного от человека (например, мыши), объединены с константными областями легкой и тяжелой цепи человека. Такие антитела по существу или полностью сохраняют специфичность связывания антитела мыши и состоят примерно на две трети из человеческой последовательности.

[0048] Венированное антитело представляет собой тип гуманизированного антитела, который сохраняет некоторые, а обычно, все CDR и некоторые, не относящиеся к человеку, остатки

каркаса переменных областей антитела, отличного от человеческого, но заменяет другие остатки каркаса переменной области, которые могут способствовать эпитопам В- или Т-клеткам, например, подвергшиеся воздействию остатки (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991 год) на остатки из соответствующих положений последовательности человеческого антитела. Результатом является антитело, в котором CDR полностью или в значительной степени происходят из антитела, отличного от человеческого, а каркасы переменной области антитела, отличного от человеческого, создаются более подобными на человеческие путем замещения.

[0049] Термин "эпитоп" относится к сайту антигена, с которым связывается антитело. Эпитоп может быть образован из смежных аминокислот или несмежных аминокислот, сопоставленных третичной укладкой одного или более белков. Эпитопы, образованные из смежных аминокислот, обычно сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные третичной укладкой обычно теряются при обработке денатурирующими растворителями. Эпитоп обычно включает по меньшей мере 3, и более обычно, по меньшей мере 5 или 8-10 аминокислот в уникальной пространственной конформации. Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию и двумерный ядерный магнитный резонанс. См., например, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Т. 66, Glenn E. Morris, Ред. (1996 год).

[0050] Антитела, которые распознают одни и те же или перекрывающиеся эпитопы, могут быть идентифицированы в простом иммунологическом анализе, показывающем способность одного антитела конкурировать со связыванием другого антитела с целевым антигеном. Эпитоп антитела также можно определить с помощью рентгеновской кристаллографии антитела, связанного с его антигеном, для идентификации контактных остатков. В альтернативном варианте, два антитела имеют один и тот же эпитоп, в случае если все аминокислотные мутации в антигене, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого. Два антитела имеют

перекрывающиеся эпитопы, в случае если некоторые аминокислотные мутации, которые уменьшают или устраняют связывание одного антитела, уменьшают или устраняют связывание другого.

[0051] Конкуренция между антителами определяется анализом, в котором тестируемое антитело ингибирует специфическое связывание эталонного антитела с общим антигеном (см., например, Junghans и соавт., *Cancer Res.* 50:1495, 1990 год). Тестируемое антитело конкурирует с эталонным антителом, в случае если избыток тестируемого антитела (например, по меньшей мере, 2х, 5х, 10х, 20х или 100х) ингибирует связывание эталонного антитела по меньшей мере на 50%, но предпочтительно на 75%, 90% или 99%, как измерено в конкурентно-связывающем анализе. Антитела, идентифицированные с помощью конкурентного анализа (конкурирующие антитела), включают антитела, связывающиеся с тем же эпитопом, что и эталонное антитело, а также антитела, связывающиеся с соседним эпитопом, расположенным достаточно проксимально к эпитопу, связанному эталонным антителом для возникновения стерического затруднения. Антитела, которые конкурируют с антителом ч2Н12 для связывания с белком ВСМА человека, включены в данное описание.

[0052] Термин "пациент" включает людей и других млекопитающих, которые получают либо профилактическое, либо терапевтическое лечение.

[0053] Для классификации аминокислотных замещений как консервативных или неконсервативных, аминокислоты сгруппированы следующим образом: Группа I (гидрофобные боковые цепи): met, ala, val, leu, ile; Группа II (нейтральные гидрофильные боковые цепи): cys, ser, thr; Группа III (кислотные боковые цепи): asp, glu; Группа IV (основные боковые цепи): asn, gln, his, lys, arg; Группа V (остатки, влияющие на ориентацию цепи): gly, pro; и Группа VI (ароматические боковые цепи): trp, tyr, phe. Консервативные замещения включают замещения между аминокислотами того же класса. Неконсервативные замещения представляют собой обмен элемента одного из этих классов для элемента другого.

[0054] Идентичность последовательности в процентах определяется последовательностями антител, максимально

выровненных по соглашению нумерации по Кабат. После выравнивания, если область антитела субъекта (например, вся зрелая переменная область тяжелой или легкой цепи) сравнивается с той же областью эталонного антитела, то идентичность последовательности в процентах между областями субъекта и эталонного антитела представляет собой номер положений, занятых той же аминокислотой как в области субъекта так и в области эталонного антитела, деленный на общее количество выровненных положений двух областей, при этом пробелы не учитываются, умноженный на 100 для преобразования в проценты.

[0055] Композиции или способы, "содержащие" один или более изложенных элементов, могут включать в себя другие не указанные конкретно элементы. Например, композиция, которая содержит антитело, может содержать антитело отдельно или в сочетании с другими компонентами.

[0056] Обозначение диапазона значений включает все целые числа внутри или определяющие диапазон.

[0057] Эффекторная функция антитела относится к функции, обеспечиваемой доменом(ами) Fc Ig. Такими функциями могут быть, например, антитело-зависимая клеточная цитотоксичность, антитело-зависимый клеточный фагоцитоз или комплемент-зависимая цитотоксичность. Такая функция может быть осуществлена, например, путем связывания эффекторного домена(нов) Fc с Fc-рецептором иммунной клетки с фагоцитарной или литической активностью, или путем связывания эффекторного домена(нов) Fc с компонентами системы комплемента. Как правило, эффект(ы), опосредуемый Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента, приводит к ингибированию и/или истощению целевой клетки ВСМА. Области Fc антител могут вовлекать клетки экспрессирующие Fc-рецептор (FcR) и сопоставлять их с сенсibilизированной антителами целевой клеткой. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRIII (CD64) могут действовать как эффекторные клетки для разрушения клеток, покрытых IgG. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, естественные

клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Вовлечение FcγR IgG активирует антитело-зависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) или антитело-зависимый клеточный фагоцитоз (ADCP). ADCC опосредуется эффекторными клетками CD16<sup>+</sup> через секрецию мембранных порообразующих белков и протеаз, тогда как фагоцитоз опосредуется эффекторными клетками CD32<sup>+</sup> и CD64<sup>+</sup> (см., *Fundamental Immunology*, 4-е изд., Paul ред., Lippincott-Raven, N.Y., 1997 год, Главы 3, 17 и 30; Uchida и соавт., 2004 год, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlor и соавт., 2001 год, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe и соавт., 1999 год, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207). В дополнение к ADCC и ADCP области Fc антител, связанных с клеткой, также могут активировать классический путь комплемента, чтобы вызвать комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). C1q системы комплемента связываются с областями Fc антител, когда они в комплексе с антигенами. Связывание C1q с клетками, связанными антителами, может инициировать каскад событий, связанных с протеолитической активацией C4 и C2, с образованием конвертазы C3. Расщепление C3-C3b с помощью конвертазы C3 позволяет активировать концевые компоненты комплемента, включая C5b, C6, C7, C8 и C9. В совокупности эти белки образуют поры мембраноатакующего комплекса на клетках, покрытых антителом. Эти поры нарушают целостность клеточной мембраны, убивая целевую клетку (см., *Immunobiology*, 6-е изд., Janeway и соавт., Garland Science, N. Y., 2005 год, Глава 2).

**[0058]** Термин "антитело-зависимая клеточная цитотоксичность" или ADCC описывает механизм индукции гибели клеток, который зависит от взаимодействия покрытых антителом целевых клеток с иммунными клетками, обладающими литической активностью (также называемыми эффекторными клетками). Такие эффекторные клетки включают естественные клетки-киллеры, моноциты/макрофаги и нейтрофилы. Эффекторные клетки присоединяются к эффекторному домену (ам) Fc Ig, связанному с целевыми клетками, через их сайты, связывающие антиген. Гибель покрытой антителом целевой клетки происходит в результате активности эффекторных клеток.

[0059] Термин "антитело-зависимый клеточный фагоцитоз" или ADCP относится к процессу, посредством которого клетки, покрытые антителом, поглощаются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с эффекторным доменом Fc Ig.

[0060] Термин "комплемент-зависимая цитотоксичность" или CDC относится к механизму индуцирования гибели клеток, в котором эффекторный домен(ы) Fc связанного с целью антитела активирует серию ферментативных реакций, кульминацией которых является образование отверстий в мембране целевой клетки. Как правило, комплексы антиген-антитело, такие как целевые клетки, покрытые антителами, связывают и активируют компонент комплемента C1q, который, в свою очередь, активирует каскад комплемента, приводящий к гибели целевых клеток. Активация комплемента может также приводить к отложению компонентов комплемента на поверхности целевой клетки, которые облегчают ADCC путем связывания комплементарных рецепторов (например, CR3) на лейкоцитах.

[0061] "Цитотоксический эффект" относится к истощению, элиминации и/или к гибели целевой клетки. "Цитотоксический агент" относится к агенту, который оказывает цитотоксическое действие на клетку.

[0062] Цитотоксические агенты могут быть конъюгированы с антителом или введены в сочетании с антителом.

[0063] "Цитостатический эффект" относится к ингибированию клеточной пролиферации. "Цитостатический агент" относится к агенту, который оказывает цитостатический эффект на клетку, тем самым ингибируя рост и/или расширение определенной клеточной субпопуляции. Цитостатические агенты могут быть конъюгированы с антителом или введены в сочетании с антителом.

[0064] Термин "фармацевтически приемлемый" обозначает одобренный или одобряемый регуляторным ведомством Федерального правительства или правительства штата, или приведенный в Фармакопее США или другой общепризнанной фармакопее для применения у животных и, более конкретно, у человека. Термин

"фармацевтически совместимый ингредиент" относится к фармацевтически приемлемому разбавителю, адъюванту, эксципиенту или носителю, с которым антитело к ВСМА вводится субъекту.

[0065] Фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям антитела против ВСМА-1 или его конъюгата или вещества, вводимого с антителом к ВСМА-1. Примеры солей включают соли сульфата, цитрата, ацетата, оксалата, хлорида, бромида, йодида, нитрата, бисульфата, фосфата, кислого фосфата, изоникотината, лактата, салицилата, цитрата кислоты, тартрата, олеата, танната, пантотената, битартрата, аскорбата, сукцината, малеата, гентизината, фумарата, глюконата, глюкуроната, сахара, формата, бензоата, глутамата, метансульфоната, этансульфоната, бензолсульфоната, р-толуолсульфоната и памоата (то есть, 1,1'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтаата)). Фармацевтически приемлемая соль может содержать включение другой молекулы, такой как ацетатный ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может представлять собой любой органический или неорганический фрагмент, который стабилизирует заряд на исходном соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. Примеры, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь несколько противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

[0066] Если иное не исходит из контекста, термин "около" охватывает несущественные вариации, не оказывающие существенного влияния на функциональные свойства (например, в пределах погрешности или экспериментальных измерений).

## **ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ**

### **I. Общие сведения**

[0067] Изобретение обеспечивает моноклональные антитела, которые специфически связываются с ВСМА. Антитела полезны для лечения и диагностики различных видов злокачественных новообразований и иммунологических нарушений, а также для выявления ВСМА.

## II. Целевые молекулы

[0068] Если не указано иное, то ВСМА означает ВСМА человека. Характерные последовательности нуклеиновой кислоты человека и аминокислот представлены в SEQ ID NO:1 и 2. Если не указано иное, то контекстная ссылка на ВСМА, подразумевает по меньшей мере внеклеточный домен белка (приблизительно остатки 1-54 SEQ ID NO:2), а иногда и полный белок. Аналогичным образом, если не указано иное, из контекстной ссылки на BAFF и APRIL и их рецепторы, отличные от ВСМА, относятся к человеческим последовательностям дикого типа, например, как указано в базе данных Swiss Prot.

## III. Антитела по изобретению

### A. Специфичность связывания и функциональные свойства

[0069] Антитело SG16.17 представляет собой моноклональное антитело крысы, которое специфически связывается с ВСМА человека, как описано в примерах. Депонирование ATCC было осуществлено 15 августа 2005 года в соответствии с Будапештским договором. ATCC расположен на 10801 University Boulevard, Манассас, штат Виргиния. 20110-2209, США. Депонированию ATCC был присвоен номер доступа PTA-6937. Антитело SG16.17 ингибирует связывание ВСМА с обоими лигандами, APRIL и BAFF. Антитело SG16.17, когда оно связано с IgG1 человека, вызывает ADCC, связывается и вызывает активация сигнального пути через рецепторы Fcγ. Антитело SG16.17 также может быть включено в конъюгат лекарственное средство-антитело для доставки связанного лекарственного средства внутрь клеток, экспрессирующих ВСМА. Антитело SG16.45 представляет собой другое моноклональное антитело крысы, которое специфически связывается с ВСМА человека, ингибирует его связывание с его лигандами и может доставлять связанное лекарственное средство внутрь клеток, которые экспрессируют ВСМА.

[0070] Изобретение относится к гуманизированным, химерным и венированным формам антитела SG16.17 (обозначены как hSG16.17, cSG16.17 или vSG16.17) и SG16.45 (обозначены аналогичным образом). Такие антитела обычно сохраняют некоторые или все

свойства для SG16.17 или SG16.45, отмеченные выше. Для любого данного свойства гуманизированные, химерные или венированные антитела могут проявлять свойство в той же степени в пределах экспериментальной ошибки или больше, или меньше, чем SG16.17 крысы или SG16.45. Аффинность гуманизированной, химерной или венированной формы антитела SG16.17 крысы (то есть,  $K_a$ ) может быть больше, чем у антитела SG16.17 крысы, или в пределах пяти или в двух раз (то есть, больше, чем или меньше, чем), чем у антитела SG16.17 крысы для ВСМА человека. Предпочтительные гуманизированные, химерные или венированные антитела SG16.17 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с антителами SG16.17 крысы за связывание с ВСМА человека. Аффинность гуманизированной, химерной или венированной формы антитела SG16.45 крысы (то есть,  $K_a$ ) может быть больше, чем у антитела SG16.45 крысы, или в пределах пяти или в двух раз (то есть, больше, чем или меньше, чем), чем у антитела SG16.45 крысы для ВСМА человека. Предпочтительные гуманизированные, химерные или венированные антитела SG16.45 связываются с одним и тем же эпитопом и/или конкурируют с антителами SG16.45 крысы за связывание с ВСМА человека.

**[0071]** Предпочтительные гуманизированные, химерные и венированные антитела ингибируют злокачественные новообразования (например, рост клеток, метастазы и/или летальность организма) или опосредуемые В-клетками иммунные нарушения, как показано *in vitro*, в модели на животных или в клинических испытаниях.

#### В. Антитела

**[0072]** Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором CDR из нечеловеческого "донорного" антитела прививают в последовательности "акцепторного" антитела человека (см., например, Queen, США 5530101 и 5585089, Winter, США 5225539, Carter, США 6407213 Adair, США 5859205 и Foote, США 6881557). Последовательности акцепторных антител могут представлять собой, например, зрелую последовательность антител человека, смесь таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей антител человека или последовательность

области зародышевой линии. Для гуманизации SG16.17 предпочтительной акцепторной последовательностью для тяжелой цепи является экзон  $V_H 1-2$  зародышевой линии  $V_H$  и для экзона  $J_H$  ( $J_H$ ), экзон  $J_H-3$ . Для легкой цепи предпочтительной акцепторной последовательностью является экзон  $V_L 1-12$  и  $J$  экзон  $J_K 5$ . Для гуманизации SG16.45 предпочтительной последовательностью акцептора тяжелой цепи является HV3-23/HJ3 (SEQ ID NO:24), и предпочтительной последовательностью акцептора легкой цепи является KV3-20/KJ2 (SEQ ID NO:34).

[0073] Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее по меньшей мере четыре CDR полностью или по существу полученное из нечеловеческого антитела донора, и каркасных последовательностей вариабельной области и константных областей, если они присутствуют, полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере два и обычно все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела и последовательность каркаса вариабельной области тяжелой цепи, и константную область тяжелой цепи, если она присутствует, по существу из последовательностей каркаса вариабельной области тяжелой цепи человека и константной области. Аналогично, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере два и обычно все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела и последовательность каркаса вариабельной области легкой цепи, и константную область легкой цепи, если она присутствует, по существу из последовательностей каркаса вариабельной области легкой цепи человека и константной области. Кроме нанотел и дАт, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном или человеческом антителе по существу является или по существу идентичный соответствующему CDR в нечеловеческом антителе, когда по меньшей мере 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Кабат) идентичны между соответствующими CDR. Последовательности каркаса вариабельной области цепи антитела или константной области цепи антитела происходят по существу из последовательности каркаса

вариабельной области человека или константной области человека, соответственно, когда по меньшей мере 70%, 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Кабат, идентичны.

[0074] Хотя гуманизированные антитела часто включают все шесть CDR (предпочтительно, как определено по Кабат, но, в альтернативном варианте, как определено IMGT, Чотия, соединенным Кабат-Чотия, АТМ или Контактном, или другим общепринятым определением) из антитела мыши, они также могут быть сделаны с меньшим количеством CDR (например, по меньшей мере 4 или 5) из антитела мыши (например, Pascalis и соавт., *J. Immunol.* 169:3076, 2002 год; Vajdos и соавт., *Journal of Molecular Biology*, 320:415-428, 2002 год; Iwahashi и соавт., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999 год; Tamura и соавт., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000 год).

[0075] Определенные аминокислоты из остатков каркаса вариабельной области человека могут быть выбраны для замещения в зависимости от их возможного влияния на конформацию CDR и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний происходит с помощью моделирования, изучения характеристик аминокислот в определенных местах или эмпирического наблюдения эффектов замещения или мутагенеза определенных аминокислот.

[0076] Например, когда аминокислота отличается от остатка каркаса вариабельной области мыши и выбранным остатком каркаса вариабельной области человека, аминокислота каркаса человека может быть замещена эквивалентной аминокислотой каркаса из антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота:

- (1) напрямую нековалентно связывает антиген,
- (2) находится рядом с областью CDR,
- (3) в противном случае взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах около 6 Å области CDR); или
- (4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями.

[0077] Изобретение обеспечивает гуманизированные формы антитела SG16.17 крысы, включая **шесть** характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи (hSG16.17 VH1-6) (SEQ ID NO:11-16) и четыре характерных

гуманизированных зрелых переменных областей легкой цепи (hSG16.17 VK2-5) (SEQ ID NO:19-22). Тяжелая и легкая цепи могут быть объединены в любых пермутациях, причем предпочтительными являются пермутации, включая любые из hSG16.17 VH1, VH3 или VH5. Пермутация, имеющая наилучшую комбинацию аффинности связывания, процентной идентичности последовательности с зародышевой линией человека, экспрессией и процентом мономерного содержимого, представляла собой hSG16.17 VH3 VK2. Это антитело проявляет схожую аффинность в пределах экспериментальной ошибки, как и SG16.17 крысы, более 85% идентичности последовательности с зародышевой линией человека в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепи (таким образом, квалифицируя обозначение "гуманизированный" в соответствии с новой нормой INN), высокую экспрессию в клетках CHO и высокое относительное содержание мономеров. По сравнению с большинством других гуманизированных антител hSG16.17 VH3 VK2 необычен тем, что имеет большое количество мутаций переменной области каркаса, в которых человеческие акцепторные остатки изменяются на соответствующий остаток крысы (13), но также имеют большое количество "прямых" мутаций CDR, в которых остаток крысы в CDR по Кабат заменен на соответствующий остаток в человеческой акцепторной последовательности, так что в целом антитело имеет достаточную идентичность последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, которые классифицируются как гуманизированные согласно нормам INN. Большинство предыдущих гуманизированных антител имели полный CDR по Кабат из донорного антитела.

**[0078]** Изобретение относится к антителам, в которых переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и переменная область легкой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). Некоторые антитела по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности HV3 и по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности VK2. Некоторые такие антитела содержат три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ

ID NO:90-92) из hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19). Некоторые такие антитела содержат три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) hSG16.17 VH3 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19) при условии, что положение H58 может быть занято N или K, положение H60 может быть занято A или N, положение H61 может быть занято Q или E, положение H62 может быть занято K или N, положение H64 может быть занято Q или K, положение H65 может быть занято G или T, положение L24 может быть занято R или L, а положение L53 может быть занято S или R. Предпочтительно положения H58, H60, H61, H62, H64 и H65 заняты N, A, Q, K, Q и G, соответственно, а L24 и L53 заняты R и S, соответственно. Эти перечисленные остатки представляют собой аминокислоты из акцепторной последовательности человека, занимающие положения в CDR по Кабат. Некоторые антитела имеют по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 или 8 крысиных остатков в человеческих CDR по Кабат, замененные соответствующими остатками из акцепторной последовательности человека. В некоторых антителах положения H58, H60, H61, H62, H64 и H65 заняты N, A, Q, K, Q и G, соответственно, а L24 и L53 заняты R и S, соответственно. Некоторые антитела включают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 или 14 обратных мутаций, представляющих замещение остатков последовательности акцепторной последовательности варибельной области человека соответствующими крысиными остатками.

**[0079]** В некоторых антителах занимают по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 или 11 положений H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно. В некоторых антителах по меньшей мере 1, 2 или 3 положений L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно. В некоторых антителах, каждое из положений H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно, и каждое из L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно.

**[0080]** Поскольку гуманизированные антитела демонстрируют любое отклонение от примерного гуманизированного антитела hSG16.17 VH3 VK2, одна из возможностей такого дополнительного

отклонения состоит в дополнительных обратных мутациях в каркасах вариабельной области. Также могут быть сделаны любые или все положения, обратно мутированные в других характерных гуманизированных зрелых вариабельных областях тяжелой или легкой цепи (то есть 1, 2, 3, 4, 5 или все 6) H8, занятый R, H67, занятый A, H78, занятый A, L40, занятый S, L78, занятый M и L85, занятый D, или все 5 H38, занятые N, H40, занятые R, H73, занятые K, H82A, занятые S и H83, занятые T в тяжелой цепи и 1 или оба L3, занятые K, и L20, занятые I в легкой цепи. Однако такие дополнительные обратные мутации не являются предпочтительными, поскольку они в целом не улучшают аффинность и введение большего количества мышиных остатков может дать повышенный риск иммуногенности.

[0081] Другое возможное изменение заключается в замещении большего или меньшего количества остатков в CDR антитела мыши соответствующими остатками последовательностей CDR человека, как правило, из CDR акцепторных последовательностей человека, применяемых при конструировании характерных гуманизированных антител. В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не находящиеся в SDR, могут быть идентифицированы на основании областей CDR по Кабат, лежащих вне CDR, в соответствии с другими определениями, такими как гипервариабельные петли Чотии (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987 год), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически или, как описано в Gonzales и соавт., *Mol. Immunol.* 41:863 (2004 год). В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствует один или более донорных остатков CDR или в которых отсутствует весь донор CDR, аминокислота, занимающая положение, может быть аминокислотой, занимающей соответствующее положение (в соответствии с нумерацией Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замещений акцептора для донорных аминокислот в CDR включает в себя баланс конкурирующих факторов. Такие замещения потенциально выгодны для уменьшения

количества мышинных аминокислот в гуманизированном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замещения также могут вызывать изменения аффинности, а значительного снижения аффинности предпочтительно избегать. Положения для замещения в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически.

**[0082]** Хотя это и не предпочтительно, могут быть получены другие аминокислотные замещения, например, в каркасных остатках, не контактирующих с CDR, или даже некоторые потенциальные CDR-контактные остатки аминокислот в пределах CDR. Часто замены, сделанные в вариантах гуманизированных последовательностей, являются консервативными по отношению к замененной аминокислоте hSG16.17 VH3 VK2. Предпочтительно, замены по отношению к hSG16.17 VH3 VK2 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного мАт, то есть его способность связывать ВСМА человека и ингибировать рост злокачественных клеток.

**[0083]** Варианты обычно отличаются от последовательностей зрелой вариабельной области тяжелой и легкой цепи hSG16.17 VH3 VK2 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5 или 10 в зрелой вариабельной области как в легкой цепи, так и в тяжелой цепи, или в обеих цепях) замен, делеций или вставок.

**[0084]** Другие предпочтительные сочетания гуманизированных тяжелых и легких цепей включают любые из hSG16.17 VH1 VK2, VH1 VK3, VH1 VK4, VH1 VK4, VH3 VK2, VH3 VK3, VH3 VK4 и VH3 VK5, и VH5 VK2, VH5 VK3, VH5 VK4, VH5 VK5, а также гуманизированные антитела, в которых вариабельные области тяжелой и легкой цепей показывают по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с вариабельными областями тяжелой и легкой цепей любого из этих антител.

**[0085]** Изобретение относится к гуманизированным формам антитела SG16.45 крысы, включая шесть характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей тяжелой цепи (hSG16.45 VH1-6) (SEQ ID NO:27-32) и четыре характерных гуманизированных зрелых вариабельных областей легкой цепи

(hSG16.45 VK1, 2, 3 и 5) (SEQ ID NO:35-38). Тяжелая и легкая цепи могут быть объединены в любых пермутациях, причем предпочтительными являются пермутации hSG16.45 VH5 VK2, VH1 VK1 и VH1 VK5. hSG16.45 HV5 VK2 показывает более 85% идентичности последовательности с зародышевой линией человека в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепи (таким образом, квалифицируя обозначение "гуманизированный" в соответствии с новой нормой INN), высокую экспрессию в клетках CHO и высокое относительное содержание мономеров и адекватное связывание, хотя и немного меньшее, чем у крысиного или химерного SG16.45. hSG16.45 VH5 VK2 имеет 3 обратные мутации переменной области (все в тяжелой цепи) и 3 прямых мутации CDR по Кабат, в которых крысиный остаток в CDR по Кабат заменен на соответствующий остаток в человеческой акцепторной последовательности, так что в целом антитело имеет достаточную идентичность последовательности с последовательностями зародышевой линии человека, чтобы классифицироваться как гуманизированные согласно нормам INN.

**[0086]** Изобретение относится к антителам, в которых переменная область тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31) и переменная область легкой цепи по меньшей мере на 90% идентична hSG16.45 VK2. Некоторые антитела по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности hSG16.45 VH5 и по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичны последовательности VK2. Некоторые такие антитела включают три CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36). Некоторые такие антитела включают три CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) из hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO:31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) из hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO:36) при условии, что положение H50 может быть занято A или S, а положение L24 может быть занято R или L, и положение L26 может быть занято S или T. Предпочтительно положения H50 заняты A, а положения L24 и L26 заняты R и S. Эти перечисленные остатки представляют собой аминокислоты из человеческой акцепторной последовательности, занимающей позиции в пределах CDR по Кабат. Некоторые антитела

имеют по меньшей мере 1, 2 или 3 крысиных остатков в человеческих CDR по Кабат, замененные соответствующими остатками из акцепторной последовательности человека. В некоторых антителах положения H50, L24 и L26 заняты A, R и S, соответственно. Некоторые антитела включают по меньшей мере 1, 2 или 3 обратных мутаций, представляющих замещение остатков последовательности акцепторной последовательности вариабельной области человека соответствующими крысиными остатками.

[0087] В некоторых антителах по меньшей мере 1, 2 или 3 положения H30, H93 и H94 заняты N, T и S, соответственно. В некоторых антителах каждое из положений H30, H93 и H94 занято N, T и S, соответственно.

[0088] Поскольку гуманизированные антитела демонстрируют любое отклонение от примерного гуманизированного антитела hSG16.45 VH5 VK2, одна из возможностей такого дополнительного отклонения состоит в дополнительных обратных мутациях в каркасах вариабельной области. Также могут быть сделаны любые или все положения, обратно мутированные в других характерных гуманизированных зрелых вариабельных областях тяжелой или легкой цепи (то есть 1, 2, 3 или 4) H37, H48, H76, H107, занятых I, I, N, и V, соответственно и/или 1, 2, 3, 4, 5, 6 или 7 из L14, L19, L21, L38, L58, L71 и L78, занятых A, V, I, H, V, Y и M, соответственно. Однако такие дополнительные обратные мутации не являются предпочтительными, поскольку они в целом не улучшают аффинность и введение большего количества мышиных остатков может дать повышенный риск иммуногенности.

[0089] Другое возможное изменение заключается в замещении большего или меньшего количества остатков в CDR антитела мыши соответствующими остатками последовательностей CDR человека, как правило, из CDR акцепторных последовательностей человека, применяемых при конструировании характерных гуманизированных антител. В некоторых антителах для сохранения связывания в гуманизированном антителе необходима только часть CDR, а именно подмножество остатков CDR, необходимых для связывания, называемых SDR. Остатки CDR, не контактирующие с антигеном и не находящиеся в SDR, могут быть идентифицированы на основании

областей CDR по Кабат, лежащих вне CDR, в соответствии с другими определениями, такими как гипервариабельные петли Чотии (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987 год), с помощью молекулярного моделирования и/или эмпирически или, как описано в Gonzales и соавт., *Mol. Immunol.* 41:863 (2004 год). В таких гуманизированных антителах в положениях, в которых отсутствует один или более донорных остатков CDR или в которых отсутствует весь донор CDR, аминокислота, занимающая положение, может быть аминокислотой, занимающей соответствующее положение (в соответствии с нумерацией Кабата) в последовательности акцепторного антитела. Количество таких замещений акцептора для донорных аминокислот в CDR включает в себя баланс конкурирующих факторов. Такие замещения потенциально выгодны для уменьшения количества мышинных аминокислот в гуманизированном антителе и, как следствие, уменьшения потенциальной иммуногенности. Однако замещения также могут вызывать изменения аффинности, а значительного снижения аффинности предпочтительно избегать. Положения для замещения в пределах CDR и аминокислоты для замещения также могут быть выбраны эмпирически.

**[0090]** Хотя это и не предпочтительно, могут быть получены другие аминокислотные замещения, например, в каркасных остатках, не контактирующих с CDR, или даже некоторые потенциальные CDR-контактные остатки аминокислот в пределах CDR. Часто замены, сделанные в вариантах гуманизированных последовательностей, являются консервативными по отношению к замененным hSG16.45 VH3 VK2. Предпочтительно, замены по отношению к hSG16.45 VH5 VK2 (независимо от того, консервативны они или нет) не оказывают существенного влияния на аффинность связывания или активность гуманизированного мАт, то есть его способность связывать ВСМА человека и ингибировать рост злокачественных клеток.

**[0091]** Варианты обычно отличаются от последовательностей зрелой вариабельной области тяжелой и легкой цепи SG16.45 VH5 VK2 небольшим числом (например, обычно не более 1, 2, 3, 5 или 10 в зрелой вариабельной области как в легкой цепи, так и в тяжелой цепи, или в обеих цепях) замен, делеций или вставок.

**[0092]** Другие предпочтительные сочетания гуманизированных

тяжелых и легких цепей включают любые из hSG16.45 VH1 VK1 и VH1 VK5, а также гуманизированные антитела, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей показывают по меньшей мере 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности с переменными областями тяжелой и легкой цепей любого из этих антител.

#### С. Выбор константной области

**[0093]** Переменные области тяжелой и легкой цепи гуманизированных антител могут быть связаны, по меньшей мере, с частью константной области человека. Выбор константной области зависит, в частности, от того, требуется ли антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека имеют сильную комплементзависимую цитотоксичность, изотип IgG2 человека имеет низкую комплементзависимую цитотоксичность, а человеческий IgG4 не обладает комплементзависимой цитотоксичностью. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные эффекторные функции, опосредованные клетками, чем IgG2 и IgG4 человека. Константными областями легкой цепи могут быть лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться в виде тетрамеров, содержащих две светлые и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых переменные области тяжелой и легкой цепи связаны спейсером.

**[0094]** Константные области человека показывают аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между разными индивидуумами, то есть константные области могут различаться у разных индивидуумов в одном или более полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или более других изотипов. Характерные человеческие последовательности константной области каппа и IgG1 дикого типа (последние с С-терминальным лизином или без него) представлены в SEQ ID NO:3-5.

**[0095]** Одна или несколько аминокислот на амино или карбоксильном конце легкой и/или тяжелой цепи, такие как С-

концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или дериватизироваться в относительном содержании или во всех молекулах. Замещения могут быть сделаны в константных областях для уменьшения или увеличения эффекторной функции, такой как опосредованная комплементом цитотоксичность или ADCC (см., например, Winter и соавт., патент США № 5624821, Tso и соавт., патент США № 5,834,597; и Lazar и соавт., Proc. Natl. Acad. Sci. США 103:4005, 2006 год), или продления периода полувыведения у людей (см., например, Hinton и соавт., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004 год).

**[0096]** Типовое замещение включает аминокислотное замещение нативной аминокислоты на остаток цистеина, введенный в аминокислотных положениях 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутацию S239C в изоформе IgG1 человека (нумерация соответствует индексу EU (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, 1987 и 1991); см., США 20100158909, который включен в данный документ в качестве ссылки). Последовательности константных областей тяжелой цепи с S239C с C-концевым лизином и без него приведены в SEQ ID NO:6 и 7. Присутствие дополнительного остатка цистеина позволяет образовывать межцепочечные дисульфидные связи. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызвать стерическое несоответствие, тем самым уменьшая аффинность взаимодействия связывания области Fc-FcγR. Остаток(тки) цистеина, введенный в или в непосредственной близости к области Fc константной области IgG, может также служить в качестве сайтов конъюгации с лекарственными средствами (то есть связывание цитотоксических лекарственных средств с применением тиол специфических реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств). Наличие лекарственного средства вызывает стерическое несоответствие, тем самым дополнительно уменьшая аффинность взаимодействия связывания области Fc-FcγR. Другие замещения в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 уменьшают аффинность к рецепторам Fcγ, в частности рецептора FcγRI (см., например, США

6,624,821, США 5,624,821.) Предпочтительной комбинацией мутаций являются S239D, A330L и I332E, что увеличивает аффинность домена Fc для FcγRIIIA и, следовательно, увеличивает ADCC.

[0097] Период полувыведения антитела *in vivo* также может влиять на его эффекторные функции. Период полувыведения антитела можно увеличить или уменьшить для изменения его терапевтической активности. FcRn представляет собой рецептор, который структурно подобен антигену MHC класса I, который нековалентно ассоциируется с β2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз через ткани (Ghetie and Ward, 2000 год, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002 год, *Immunol. Res.* 25:97-113). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6,0 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет вернуть IgG обратно в кровообращение (Ghetie and Ward, 2000 год, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002 год, *Immunol. Res.* 25:97-113). Была картирована область IgG1 человека, участвующая в связывании FcRn (Shields и соавт., 2001 год, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Замещения аланина в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 человеческого IgG1 усиливают связывание FcRn (Shields и соавт., 2001 год, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Молекулы IgG1, несущие эти замещения, имеют более длительный период полувыведения в сыворотке. Следовательно, эти модифицированные молекулы IgG1 могут выполнять свои эффекторные функции и, следовательно, проявлять свои терапевтические эффективности в течение более длительного периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие характерные замещения для увеличения связывания с FcRn включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428. Нумерация EU используется для всех положений в константной области.

[0098] Олигосахариды, ковалентно присоединенные к консервативному Asn297, участвуют в способности области Fc IgG связывать FcγR (Lund и соавт., 1996 год, *J. Immunol.* 157:4963-69; Wright and Morrison, 1997 год, *Trends Biotechnol.* 15:26-31). Конструирование этой гликоформы на IgG может значительно

улучшить, ADCC опосредованную IgG. Добавление биссектирующих модификаций N-ацетилглюкозамина (Umaña и соавт., 1999 год, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180; Davies и соавт., 2001 год, *Biotech. Bioeng.* 74:288-94) к этой гликоформе или удаление фукозы (Shields и соавт., 2002 год, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40; Shinkawa и соавт., 2003 год, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604; Niwa и соавт., 2004 год, *Cancer Res.* 64:2127-33) из этой гликоформы являются двумя примерами конструирования IgG Fc, которое улучшает связывание между IgG Fc и FcγR, тем самым усиливая активность ADCC, опосредованную Ig.

**[0099]** Системное замещение гидрофильных аминокислот в области Fc IgG1 человека образовывало варианты IgG с измененными аффинностями связывания FcγR (Shields и соавт., 2001 год, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). По сравнению с исходным IgG1, подмножество этих вариантов, включающих замещения в Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333/Lys334 на Ala, демонстрирует увеличение как аффинности связывания по отношению к FcγR так и активности ADCC (Shields и соавт., 2001 год, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki и соавт., 2004 год, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49).

**[00100]** Эффективность фиксации комплемента антител (как связывание C1q, так и активность CDC) может быть улучшена путем замещений в Lys326 и Glu333 (Idusogie и соавт., 2001 год, *J. Immunol.* 166:2571-2575). Те же самые замещения на остове IgG2 человека могут изменять изотип антитела, которое плохо связывается с C1q и демонстрирует существенный дефицит активности при активации комплемента на тот, который может связывать C1q и опосредовать CDC (Idusogie и соавт., 2001 год, *J. Immunol.* 166:2571-75). Несколько других способов также были применены для улучшения эффективности фиксации комплемента антител. Например, прививание 18-аминокислотной карбоксильной концевой части IgM карбоксильным концам IgG значительно усиливает их активность CDC. Это наблюдается даже с IgG4, который обычно не демонстрирует активности CDC (Smith и соавт., 1995 год, *J. Immunol.* 154:2226-36). Также, замещение Ser444,

расположенного вблизи карбоксильного конца тяжелой цепи IgG1 на Cys индуцировало димеризацию "хвост к хвосту" IgG1 с 200-кратным увеличением активности CDC по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes и соавт., 1992 год, *J. Immunol.* 148:2918-22). Кроме того, биспецифическая конструкция диатела со специфичностью к C1q также обеспечивает активность CDC (Kontermann и соавт., 1997 год, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

**[00101]** Активность комплемента может быть уменьшена путем мутирования по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи на остаток, имеющий другую боковую цепь, такой как Ala. Другие алкилзамещенные неионогенные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки как Phe, Tyr, Trp и Pro на месте любого из трех остатков также уменьшают или устраняют связывание C1q. Ser, Thr, Cys и Met могут применяться в остатках 320 и 322, но не 318, с целью уменьшения или устранения активности связывания C1q. Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может изменять, но не устранять активность связывания C1q. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к удалению литической активности, но лишь незначительно уменьшает (примерно в три раза слабее) аффинность к C1q. Это изменение разрушает сайт гликозилирования и сводит к нулю присутствие углевода, которое требуется для активации комплемента. Любое другое замещение в этом сайте также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также уменьшают связывание C1q: D270A, K322A, R329A и R311S (см., WO 06/036291).

**[00102]** Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую пермутацию остатков, занимающих полиморфные положения в естественных аллотипах. Кроме того, может присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций по сравнению с природной константной области человека, такой как указанные выше, для уменьшения связывания рецептора Fcγ или увеличения связывания с FcRN.

D. Экспрессия рекомбинантных антител

**[00103]** Гуманизированные, химерные или венированные антитела

обычно продуцируются в результате рекомбинантной экспрессии. Рекомбинантные полинуклеотидные конструкции обычно включают в себя последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антител, включая естественно-ассоциированные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно, последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в векторах, способных трансформировать или трансфицировать клетки эукариотических хозяев. Как только вектор встраивается в соответствующего хозяина, хозяин поддерживается в условиях, подходящих для экспрессии нуклеотидных последовательностей на высоком уровне, а также для сбора и очистки перекрестнореагирующих антител.

**[00104]** Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См., Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, Нью-Йорк, 1987 год). Ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, был разработан в данной области техники и включает в себя клеточные линии CHO (например, DG44), различные клеточные линии COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и миеломы, не продуцирующие антитела, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно клетки представляют собой нечеловеческие клетки. Экспрессионные векторы для этих клеток могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор, энхансер (Queen и соавт., *Immunol. Rev.* 89:49, 1986 год) и необходимые сайты процессинга информации, такие как сайты связывания рибосом, сплайс-сайты РНК, сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, бычьего папилломавируса и тому подобного. См., Co и соавт., *J. Immunol.* 148:1149 (1992 год).

**[00105]** После экспрессии антитела могут быть очищены в соответствии со стандартными процедурами данной области техники,

включая очистку с помощью ВЭЖХ, колоночную хроматографию, гель-электрофорез и тому подобное (см., в общем, Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, Нью-Йорк, 1982 год)).

#### Е. Варианты гликозилирования

[00106] Антитела могут быть гликозилированы в консервативных положениях в их константных областях (Jefferis and Lund, (1997 год) *Chem. Immunol.* 65:111-128; Wright and Morrison, (1997 год) *TibTECH* 15:26-32). Олигосахаридные боковые цепи иммуноглобулинов влияют на функцию белка (Boyd и соавт., (1996 год) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318; Wittwe and Howard, (1990 год) *Biochem.* 29:4175-4180) и внутримолекулярное взаимодействие между частями гликопротеина, которое может влиять на конформацию и представляет собой трехмерную поверхность гликопротеина (Jefferis and Lund, *выше*; Wyss and Wagner, (1996 год) *Current Opin. Biotech.* 7:409-416). Олигосахариды могут также применяться для нацеливания данного гликопротеина на определенные молекулы на основе конкретных распознающих структур. Например, было сообщено, что в агалактозилированном IgG олигосахаридный фрагмент "переворачивается" из пространства между CH2 и концевые остатки N-ацетилглюкозамина становятся доступным для связывания манноза-связывающего белка (Malhotra и соавт., (1995 год) *Nature Med.* 1:237-243). Удаление гликопептидазой олигосахаридов из САМРАТН-1Н (рекомбинантное гуманизированное мышинное моноклональное антитело IgG1, которое распознает антиген CDw52 лимфоцитов человека), продуцируемого в клетках яичника китайского хомячка (CHO), привело к полному снижению лизиса, опосредованного комплементом (CMCL) (Boyd и соавт., (1996 год) *Mol. Immunol.* 32:1311-1318), в то время как выборочное удаление остатков сиаловой кислоты с применением нейраминидазы не приводило к потере DMCL. Сообщалось также, что гликозилирование антител влияет на антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В частности, клетки CHO с регулируемой тетрациклином экспрессией  $\beta(1,4)$ -N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII), катализирующие гликозилтрансферазой образование биссектирующего N-ацетилглюкозамина (GlcNAc), как сообщается, улучшают

активность ADCC (Umana и соавт. (1999 год) Mature Biotech. 17:176-180).

**[00107]** Гликозилирование антител обычно является либо N-связанным, либо O-связанным. N-связанное относится к присоединению углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагинового остатка. Трипептидные последовательности аспарагин-Х-серин и аспарагин-Х-треонин, где Х представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина, являются последовательностями распознавания для ферментативного присоединения углеводного фрагмента к боковой цепи аспарагина. Таким образом, присутствие любой из этих трипептидных последовательностей в полипептиде создает потенциальный сайт гликозилирования. O-связанное гликозилирование относится к присоединению одного из сахаров N-ацеилгалактозамина, галактозы или ксилозы к гидроксикаминокислоте, чаще всего к серину или треонину, хотя также могут быть применены 5-гидроксипролин или 5-гидроксилизин.

**[00108]** Варианты гликозилирования антител представляют собой варианты, в которых изменен профиль гликозилирования антитела. Под изменением подразумевается удаление одного или более углеводных фрагментов, обнаруженных в антителе, добавление к антителу одного или более углеводных фрагментов, изменение состава гликозилирования (профиля гликозилирования), степени гликозилирования и тому подобное.

**[00109]** Добавление сайтов гликозилирования к антителу может быть осуществлено путем изменения аминокислотной последовательности таким образом, чтобы она содержала одну или более описанных выше трипептидных последовательностей (для сайтов N-связанных сайтов гликозилирования). Изменение может также быть сделано добавлением, или замещением, одного или более остатков серина или треонина в последовательность исходного антитела (для сайтов с O-связанным гликозилированием). Аналогичным образом удаление сайтов гликозилирования может быть осуществлено путем изменения аминокислот в естественных сайтах гликозилирования антитела.

**[00110]** Аминокислотную последовательность обычно изменяют

путем изменения лежащей в ее основе последовательности нуклеиновой кислоты. Эти способы включают выделение из природного источника (в случае вариантов аминокислотных последовательностей естественного происхождения) или получение олигонуклеотид-опосредованным (или сайт-направленным) мутагенезом, ПЦР-мутагенезом и кассетным мутагенезом ранее приготовленного варианта или не-вариантной версии антитела.

[00111] Гликозилирование (включая профиль гликозилирования) антител также может быть изменено без изменения аминокислотной последовательности или лежащей в ее основе нуклеотидной последовательности. Гликозилирование во многом зависит от клетки-хозяина, применяемой для экспрессии антитела. Поскольку тип клеток, применяемый для экспрессии рекомбинантных гликопротеинов, *например*, антител, в качестве потенциальной терапии редко является нативной клеткой, можно ожидать значительных изменений в профиле гликозилирования антител. См., *например*, Hse и соавт., (1997 год) J. Biol. Chem. 272:9062-9070. В дополнение к выбору клеток-хозяев факторы, которые влияют на гликозилирование при рекомбинантном продуцировании антител, включают в себя режим роста, состав культуральной среды, плотность культуры, оксигенацию, pH, схемы очистки и тому подобное. Предложены различные способы изменения профиля гликозилирования, достигнутого в конкретном организме-хозяине, включая введение или сверхэкспрессирование определенных ферментов, участвующих в производстве олигосахаридов (патенты США № 5047335, 5510261, 5278299). Гликозилирование или определенные типы гликозилирования могут быть ферментативно удалены из гликопротеина, *например*, с использованием эндогликозидазы Н (Эндо Н). Кроме того, рекомбинантная клетка-хозяин может быть генетически сконструированной, *например*, дефектной при производстве некоторых типов полисахаридов. Эти и подобные методы хорошо известны в данной области техники.

[00112] Структуру гликозилирования антител можно легко проанализировать с помощью обычных методов анализа углеводов, включая лектиновую хроматографию, ЯМР, масс-спектрометрию, ВЭЖХ, гель-проникающая хроматография (GPC), композиционный анализ



правило, с помощью связи  $\alpha 1,6$  (6-положение GlcNAc связано с 1-положением фукозы). "Gal" относится к галактозе, а "Man" относится к маннозе.

[00115] "Комплекс N-гликозид-связанная цепь сахара" включает 1) комплексный тип, в котором сторона невосстанавливающего конца первичной структуры имеет одну или более ветвей галактозы-N-ацетилглюкозамина (также называемой "gal-GlcNAc"), а сторона невосстанавливающего конца Gal-GlcNAc необязательно имеет сиаловую кислоту, бисектирующую N-ацетилглюкозамин или тому подобное; или 2) гибридный тип, в котором сторона невосстанавливающего конца первичной структуры имеет обе ветви цепи, связанной с N-гликозид-сахаром с высоким содержанием маннозы и комплексную цепь, связанную с N-гликозид-сахаром.

[00116] В некоторых вариантах осуществления изобретения "комплекс N-гликозид-связанная цепь сахара" включает комплексный тип, в котором невосстанавливающая концевая сторона первичной структуры имеет ноль, одну или более ветвей галактозы-N-ацетилглюкозамина (также называемой "gal-GlcNAc"), а невосстанавливающая концевая сторона Gal-GlcNAc необязательно дополнительно имеет такую структуру, как сиаловая кислота, бисектирующая N-ацетилглюкозамин или тому подобное.

[00117] В соответствии с данными способами, как правило, только незначительное количество фукозы вводится в комплекс N-гликозид-связанная цепь (пи) сахара или гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17 или SG16.45. Например, в различных вариантах реализации изобретения менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% молекул антитела имеют коровое фукозилирование фукозой. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 2% молекул антитела имеют коровое фукозилирование фукозой.

[00118] В некоторых вариантах осуществления изобретения только незначительное количество аналога фукозы (или метаболита или продукта аналога фукозы) вводят в комплекс N-гликозид-

связанная цепь (пи) сахара. Например, в различных вариантах реализации изобретения менее чем около 60%, менее чем около 50%, менее чем около 40%, менее чем около 30%, менее чем около 20%, менее чем около 15%, менее чем около 10%, менее чем около 5% или менее чем около 3% гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17 или SG16.45 имеют коровое фукозилирование аналогам фукозы или метаболитом или продуктом аналога фукозы. В некоторых вариантах осуществления изобретения около 2% гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17 имеют коровое фукозилирование с помощью аналога фукозы или метаболита или продукта аналога фукозы.

[00119] Способы получения нефукозилированных антител путем инкубации продуцирующих антитела клеток с аналогом фукозы описаны, например, в WO2009/135181. Кратко, клетки, которые были сконструированы для экспрессии гуманизированных, химерных или венированных антител SG16.17, инкубируют в присутствии аналога фукозы или внутриклеточного метаболита или продукта аналога фукозы. Внутриклеточный метаболит может быть, например, GDP-модифицированным аналогом или полностью, или частично деэтерифицированным аналогом. Продуктом может быть, например, полностью или частично деэтерифицированный аналог. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы может ингибировать фермент(ы) в реутилизационном пути фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фукокиназы или GDP-фукозо-пирофосфорилазы. В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) ингибирует фукозилтрансферазу (предпочтительно 1,6-фукозилтрансферазу, например, белок FUT8). В некоторых вариантах осуществления изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность фермента *de novo* синтетическом пути для фукозы. Например, аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать активность GDP-маннозо-4,6-дегидратазы или/или GDP-фукозо-синтетазы. В некоторых вариантах осуществления

изобретения аналог фукозы (или внутриклеточный метаболит или продукт аналога фукозы) может ингибировать транспортер фукозы (например, транспортер GDP-фукозы).

[00120] В одном варианте реализации изобретения аналог фукозы представляет собой 2-фторофукозу. Способы применения аналогов фукозы в среде для выращивания и других аналогах фукозы описаны, например, в WO/2009/135181, который включен в данном документе в качестве ссылки.

[00121] Другие способы конструирования клеточных линий для уменьшения корового фукозилирования включали нокаут генов, нокин генов и РНК-интерференцию (РНКи). В нокаутах гена инактивируется ген, кодирующий FUT8 (фермент альфа-1,6-фукозилтрансфераза). FUT8 катализирует перенос фукозильного остатка из GDP-фукозы в положение 6 Asn-связанного (N-связанного) GlcNac N-гликана. FUT8, как сообщается, является единственным ферментом, ответственным за добавление фукозы в N-связанный двухантенарный углевод в Asn297. Нокины генов добавляют гены, кодирующие ферменты, такие как GNTIII или гольджи альфа маннозидазу II. Увеличение уровней таких ферментов в клетках отклоняет моноклональные антитела от пути фукозилирования (что приводит к уменьшению корового фукозилирования) и имеет увеличенное количество бисектирующих N-ацетилглюкозаминов. РНКи обычно также нацеливается на экспрессию гена FUT8, приводя к снижению уровня транскрипции мРНК или полностью инактивируя экспрессию гена. Любой из этих способов может быть применен для производства клеточной линии, которая могла бы продуцировать нефукозилированное антитело, например, гуманизованное, химерное или венированное антитело SG16.17.

[00122] Существует множество способов определения количества фукозилирования на антителе. Способы включают, например, ЖК-МС через хроматографию PLRP-S и квадрупольную время-пролетную масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией (TOF MS).

#### **IV. Нуклеиновые кислоты**

[00123] Изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любую из гуманизованных тяжелых и легких цепей, описанных выше. Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют

сигнальный пептид, слитый со зрелыми тяжелыми и легкими цепями. Кодированные последовательности на нуклеиновых кислотах могут находиться в функциональной связи с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодируемых последовательностей, таких как промотор, энхансер, сайт связывания рибосом, сигнал терминации транскрипции и тому подобное. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут встречаться в выделенной форме или могут быть клонированы в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты могут быть синтезированы, например, с помощью твердофазного синтеза или ПЦР перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут быть соединены в виде одной непрерывной нуклеиновой кислоты, например, внутри экспрессионного вектора или могут быть отдельными, например, каждая клонирована в свой собственный экспрессионный вектор.

#### **V. Конъюгаты антитело-лекарственное средство**

[00124] Антитела против МСМА могут быть конъюгированы с цитотоксическими фрагментами с образованием конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC). Особенно подходящими фрагментами для конъюгации с антителами являются цитотоксические вещества (например, химиотерапевтические вещества), ферменты, конвертирующие пролекарство, радиоактивные изотопы или соединения, или токсины (эти фрагменты в совокупности называются терапевтическими агентами или лекарственными средствами). Например, антитело к ВСМА может быть конъюгировано с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент или токсином (например, цитостатический или цитоцидный агент, такой как, например, абрин, рицин А, экзотоксин синегнойной палочки или дифтерийный токсин). Примеры полезных классов цитотоксических агентов включают, например, белки, связывающиеся по малой бороздке ДНК, алкилирующие ДНК агенты и ингибиторы тубулина. Характерные цитотоксические агенты включают, например, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтанзины и майтансиноиды (например, DM1 и DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло [1,4] бензодиазепины (ПВД), индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины) и алкалоиды

барвинка. Хорошо известны методы конъюгирования терапевтических агентов с белками и, в частности, с антителами. (См., например, Alley и соавт., *Current Opinion in Chemical Biology* 2010 год 14:1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008 год, 14(3):154-169.)

[00125] Терапевтический агент (например, цитотоксический агент) может быть конъюгирован с антителом таким образом, чтобы уменьшить его активность, если оно не отделено от антитела (например, путем гидролиза, деградацией антител или расщепляющим средством). Такой терапевтический агент может быть присоединен к антителу через линкер. Терапевтический агент, конъюгированный с линкером, также упоминается в данном документе как линкер для лекарственных средств. Природа линкера может сильно различаться. Компоненты, составляющие линкер, выбираются исходя из их характеристик, которые могут быть продиктованы, в частности, условиями на сайте, куда доставляется конъюгат.

[00126] Терапевтический агент может быть присоединен к антителу с расщепляемым линкером, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточной среде злокачественных клеток, экспрессирующих антитела против ВСМА, но не по существу чувствительным к внеклеточной среде, так что конъюгат отщепляется от антитела когда он интернализуется злокачественной клеткой, экспрессирующей антитела против ВСМА (например, в эндосомальной или, например, в силу рН-чувствительности или чувствительности к протеазе, в лизосомальной среде или в среде кавеолоры). Терапевтический агент также может быть присоединен к антителу с нерасщепляемым линкером.

[00127] Как указано, линкер может содержать расщепляемую единицу. В некоторых таких вариантах реализации изобретения структура и/или последовательность расщепляемой единицы выбрана так, что он расщепляется действием ферментов, присутствующих на целевом сайте (например, целевой клетке). В других вариантах реализации изобретения можно также применять расщепляемые единицы, которые могут быть расщепляемыми посредством изменения рН (например, лабильного или щелочно-лабильного), температуры или при облучении (например, фото-лабильного).

[00128] В некоторых вариантах осуществления изобретения

расщепляемая единица может содержать одну аминокислоту или непрерывную последовательность аминокислот. Аминокислотная последовательность может быть целевым субстратом для фермента.

[00129] В некоторых аспектах расщепляемая единица представляет собой пептидильную единицу и имеет длину по меньшей мере в две аминокислоты. Расщепляемые вещества могут включать катепсины В и D, и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999 год, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Наиболее типичными являются расщепляемые единицы, расщепляемые ферментами, которые присутствуют в клетках, экспрессирующих антитела против ВСМА, то есть расщепляемым ферментом линкер. Соответственно, линкер может быть расщеплен внутриклеточной пептидазой или протеазным ферментом, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Например, можно применять линкер, который расщепляется тиолозависимой протеазой катепсин-В, которая экспрессируется на высоком уровне в злокачественной ткани. (например, линкером, содержащим пептид Phe-Leu или Val-Cit, или пептид Val-Ala).

[00130] В некоторых вариантах осуществления изобретения линкер будет содержать расщепляемую единицу (например, пептидильную единицу), и расщепляемая единица будет непосредственно конъюгирована с терапевтическим агентом. В других вариантах реализации изобретения расщепляемая единица будет конъюгирована с терапевтическим агентом через дополнительную функциональную единицу, например, саморасщепляющуюся или самонерасщепляющуюся спейсерную единицу. Самонерасщепляющаяся спейсерная единица представляет собой единицу, в которой часть или вся спейсерная единица остается связанной с единицей лекарственного средства после расщепления расщепляемой единицы (например, аминокислоты) от конъюгата лекарственного средства антитела. Для высвобождения лекарственного средства в целевой клетке протекает независимая реакция гидролиза для расщепления спейсерной единицы от лекарственного средства.

[00131] При наличии саморасщепляющейся спейсерной единицы лекарственное средство высвобождается без необходимости для лекарственного средства в отдельной стадии гидролиза. В одном

варианте реализации изобретения, в котором линкер содержит расщепляемую единицу и саморасщепляющуюся группу, расщепляемая единица расщепляется действием фермента и после расщепления расщепляемой единицы, саморасщепляющаяся группа (группы) высвобождает терапевтический агент. В некоторых вариантах осуществления изобретения расщепляемая единица линкера будет прямо или опосредованно конъюгирована с терапевтическим агентом на одном конце, а на другом конце будет прямо или опосредованно конъюгирована с антителом. В некоторых таких вариантах реализации изобретения расщепляемая единица будет прямо или опосредованно (например, через саморасщепляющуюся или самонерасщепляющуюся спейсерную единицу) конъюгирована с терапевтическим агентом на одном конце, а на другом конце будет конъюгирована с антителом через единицу для удлинения. Единица для удлинения связывает антитело с остальной частью лекарственного средства и/или линкера лекарственного средства. В одном варианте реализации изобретения связь между антителом и остальной частью лекарственного средства или линкера лекарственного средства осуществляется через малеимидную группу, например, с помощью малеимидокапроильного линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело будет связано с лекарственным средством через дисульфид, например, дисульфидсвязанные конъюгаты майтанзиноида SPDB-DM4 и SPP-DM1.

**[00132]** Связь между антителом и линкером может осуществляться с помощью нескольких различных путей, например, через тиоэфирную связь, через дисульфидную связь, через амидную связь или через сложноэфирную связь. В одном варианте реализации изобретения связь между антителом к ВСМА и линкером образуется между тиольной группой цистеинового остатка антитела и малеимидной группой линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения межцепочечные связи антитела превращаются в свободные тиольные группы до реакции с функциональной группой линкера. В некоторых вариантах осуществления изобретения остаток цистеина вводится в тяжелую или легкую цепь антитела и реагирует с линкером. Положения для введения цистеина путем замещения в тяжелых или легких цепях антитела включают положения, описанные

в опубликованной заявке на патент США № 2007-0092940 и международной патентной публикации WO2008070593, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки в полном объеме и для всех целей.

[00133] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгаты антитело-лекарственное средство имеют следующую формулу I:



где L представляет собой антитело к ВСМА, LU представляет собой линкерную единицу, а D представляет собой единицу лекарственного средства (то есть терапевтический агент). Обозначение p варьируется от 1 до 20. Такие конъюгаты содержат антитело к ВСМА, ковалентно связанное, по меньшей мере, с одним лекарственным средством через линкер. Линкерная единица соединена на одном конце с антителом, а на другом конце с лекарственным средством.

[00134] Содержание лекарственного средства представлено p, количеством молекул лекарственного средства на антитело. Содержание лекарственного средства может составлять от 1 до 20 единиц лекарственного средства (D) на антитело. В некоторых аспектах обозначение p будет находиться в диапазоне от 1 до 20 (то есть, как целые, так и нецелые значения от 1 до 20). В некоторых аспектах обозначение p будет целым числом от 1 до 20 и будет представлять количество лекарственных средств-линкеров на одном антителе. В других аспектах p представляет собой среднее число молекул лекарственного средство-линкер на антитело, например, среднее число лекарственных средств-линкеров на антитело в реакционной смеси или композиции (например, фармацевтическая композиция) и может быть целым или нецелым значением. Соответственно, в некоторых аспектах, для композиций (например, фармацевтических композиций) p представляет собой среднее содержание лекарственного средства конъюгатов антитело-лекарственное средство в композиции, а p варьируется от 1 до 20.

[00135] В некоторых вариантах осуществления изобретения p составляет от около 1 до около 8 лекарственных средств на

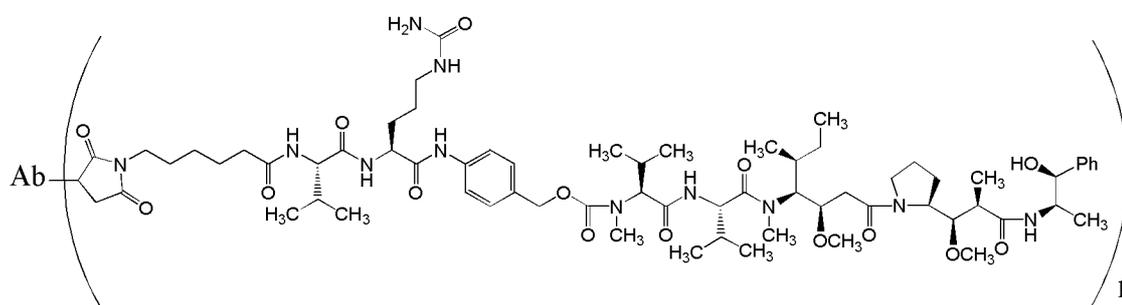
антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $r$  равно 1. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $r$  равно 2. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $r$  составляет от около 2 до около 8 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $r$  составляет от около 2 до около 6, от 2 до около 5 или от 2 до около 4 лекарственных средств на антитело. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $r$  составляет около 2, около 4, около 6 или около 8 лекарственных средств на антитело.

**[00136]** Среднее количество молекул лекарственных средств на антитело в препарате из реакции конъюгирования можно охарактеризовать обычными средствами, например, масс-спектроскопией, ИФА, хроматографией с гидрофобным взаимодействием (HIC) и ВЭЖХ. Количественное распределение конъюгатов относительно  $r$  также может быть определено.

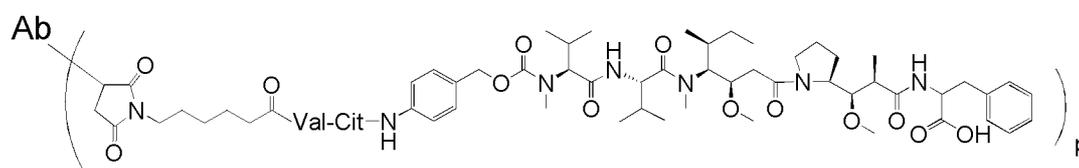
**[00137]** Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатиона, то есть, конъюгаты, в которых компонентом лекарственного средства является лекарственное средство ауристин. Показано, что ауристатины, связывающие тубулин, влияют на динамику микротрубочек и ядерное и клеточное деление, и обладают противоопухолевой активностью. Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатиона содержит линкер между лекарственным средством ауристатиона и антителом к ВСМА. Ауристатины могут быть связаны с антителом к ВСМА в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Линкером может быть, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый путем дегградации антитела). Ауристин может быть ауристатином E или его производным. Ауристин может представлять собой, например, сложный эфир, образованный между ауристатином E и кетокислотой. Например, ауристин E можно подвергнуть взаимодействию с парацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой для получения AEB и AEBV, соответственно. Другие типичные ауристатины включают MMAF (монометил ауристин F) и MMAE (монометил ауристин E). Синтез

и структура типовых ауристатинов описаны в публикациях США № 7,659,241, 7,498,298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7,968, 687, каждая из которых включена в данное описание посредством ссылки во всей полноте и для всех целей.

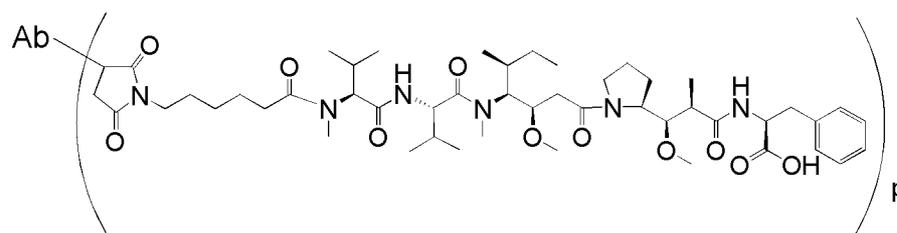
[00138] Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина включают конъюгаты антитело-лекарственные средства vcMMAE, vcMMAF и mcMMAF, как показано ниже, при этом Ат представляет собой антитело, как описано в данном документе, а val-cit представляет собой дипептид валин-цитруллин:



Ат-vcMMAE



Ат-vcMMAF



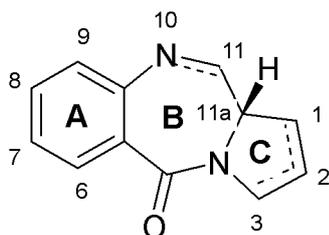
Ат-mcMMAF

или его фармацевтически приемлемую соль. Содержание лекарственного средства представлено  $p$ , количеством молекул лекарственное средство-линкер на антитело. В зависимости от контекста  $p$  может представлять собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело, также относящееся к среднему содержанию лекарственного средства. Величина  $p$  находится в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно составляет от

1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения, когда  $r$  представляет собой среднее содержание лекарственного средства,  $r$  составляет от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $r$  составляет около 2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых аспектах антитело конъюгирует с линкером через атом серы остатка цистеина. В некоторых аспектах остаток цистеина представляет собой такой, который сконструирован в антителе. В других аспектах остаток цистеина представляет собой межцепочечный дисульфидный остаток цистеина.

**[00139]** Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе PBD; *то есть*, конъюгаты антитело-лекарственное средство, в которых лекарственным средством является лекарственное средство PBD.

**[00140]** PBD имеют общую структуру:



**[00141]** Они различаются по количеству, типу и положению заместителей как в их ароматических кольцах А, так и в пирроло кольцах С и в степени насыщения кольца С. В кольце В присутствует либо имин ( $N=C$ ), карбиноламин ( $NH-CH(OH)$ ), либо метиловый эфир карбиноламина ( $NH-CH(OMe)$ ) в положении N10-C11, который представляет собой электрофильный центр, ответственный за алкилирование ДНК. Все известные природные вещества имеют (S)-конфигурацию в хиральном положении C11a, что дает им правосторонний поворот, если смотреть с кольца С на кольцо А. Это дает им подходящую трехмерную форму для изоспиральности малой бороздки В-формы ДНК, что приводит к плотному прилеганию в сайте связывания. Способность PBD образовывать аддукт в малой бороздке позволяет им взаимодействовать с процессингом ДНК, из этого следует их применение в качестве противоопухолевых

средств.

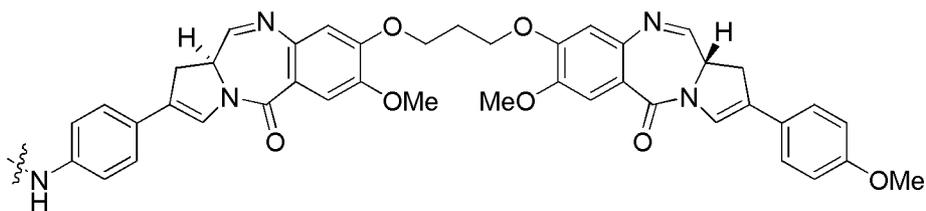
[00142] Биологическую активность этих молекул можно усиливать путем соединения двух единиц PBD вместе через их C8/C'-гидроксильные функциональные группы посредством гибкого алкиленового линкера. Считается, что димеры PBD образуют повреждения основываясь на определенных последовательностях ДНК, такие повреждения как палиндромическая межцепочечная поперечная сшивка 5'-Pu-GATC-Pu-3', которая, как считается, в основном отвечает за их биологическую активность.

[00143] В некоторых вариантах осуществления изобретения конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе PBD содержат димер PBD, связанный с антителом к ВСМА. Мономеры, которые образуют димер PBD, могут быть одинаковыми или разными, то есть, симметричными или несимметричными. Димер PBD может быть связан с антителом к ВСМА в любом положении, подходящем для конъюгации с линкером. Например, в некоторых вариантах осуществления изобретения димер PBD будет иметь заместитель в положении C2, который обеспечивает точку привязки для связывания соединения с антителом к ВСМА. В альтернативных вариантах реализации изобретения положение N10 димера PBD обеспечит точку привязки для связывания соединения с антителом к ВСМА.

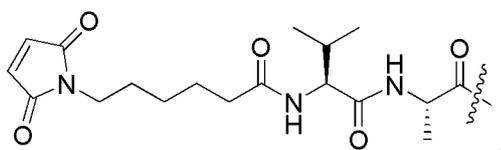
[00144] Обычно конъюгат антитело-лекарственное средство на основе PBD содержит линкер между лекарственным средством PBD и антителом к ВСМА. Линкер может содержать расщепляемую единицу (например, аминокислоту или смежную последовательность аминокислот, которая является целевым субстратом для фермента) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый путем деградации антитела). Линкер может дополнительно содержать малеимидную группу для связывания с антителом, например, малеимидокапроил. Линкер может, в некоторых вариантах осуществления изобретения, дополнительно содержать саморасщепляющуюся группу, такую как, например, единица р-аминобензилового спирта (PAB).

[00145] Характерный PBD для применения в качестве конъюгата описан в международной заявке № WO 2011/130613 и выглядит следующим образом, при этом волнистая линия указывает сайт

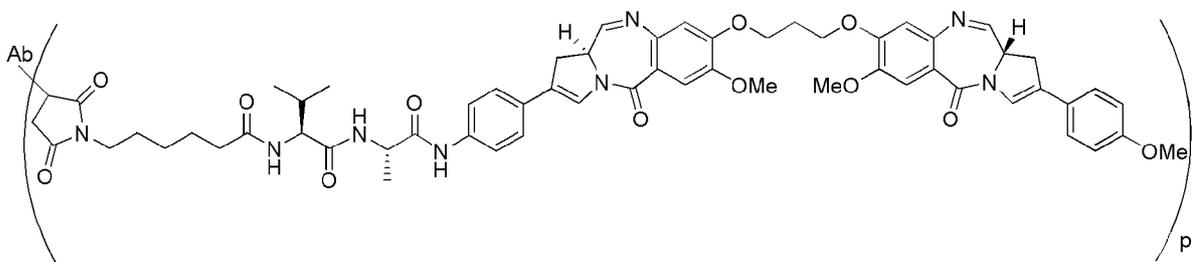
прикрепления к линкеру:



или его фармацевтически приемлемую соль. Характерный линкер выглядит следующим образом, при этом волнистая линия указывает сайт присоединения к лекарственному средству, а антитело связано через малеимидную группу.



[00146] Характерные конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе PBD включают конъюгаты антитело-лекарственное средство, как показано ниже, при этом Ат представляет собой антитело, как описано в данном документе:



или его фармацевтически приемлемую соль. Содержание лекарственного средства представлено  $p$ , количеством молекул лекарственное средство-линкер на антитело. В зависимости от контекста  $p$  может представлять собой среднее число молекул лекарственное средство-линкер на антитело, также относящееся к среднему содержанию лекарственного средства. Величина  $p$  находится в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно составляет от 1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах реализации изобретения, когда  $p$  представляет собой среднее содержание лекарственного средства,  $p$  составляет от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления изобретения  $p$  составляет около

2, около 3, около 4 или около 5. В некоторых аспектах антитело конъюгирует с линкером лекарственного средства через атом серы остатка цистеина, который сконструирован в антителе. В некоторых аспектах остаток цистеина сконструирован в антителе в положении 239 (IgG1), согласно индексу EU (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Бетесда, штат Мэриленд, 1987 и 1991).

#### **VI. Животные модели иммунологических нарушений или злокачественных новообразований, экспрессирующих ВСМА**

[00147] Антитела или производные к ВСМА можно тестировать или валидизировать на животных моделях иммунологических нарушений или злокачественных новообразований, экспрессирующих ВСМА. Примеры для животных моделей системных и органоспецифических аутоиммунных заболеваний, включая диабет, волчанку, системный склероз, синдром Шегрена, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит (рассеянный склероз), тиреоидит, миастению гравис, артрит, увеит, воспалительную болезнь кишечника были описаны Bigazzi, "Animal Models of Autoimmunity: Spontaneous and Induced," в *The Autoimmune Diseases* (Rose and Mackay ред., Academic Press, 1998 год) и в "Animal Models for Autoimmune and Inflammatory Disease," в *Current Protocols in Immunology* (Coligan и соавт., ред., Wiley and Sons, 1997 год).

[00148] Аллергические состояния, например, астма и дерматит, также могут быть смоделированы у грызунов. Гиперчувствительность дыхательных путей может быть индуцирована у мышей овальбумином (Tomkinson и соавт., 2001 год, *J. Immunol.* 166:5792-800) или антигеном яйца *Sistosoma mansoni* (Tesciuba и соавт., 2001 год, *J. Immunol.* 167:1996-2003). Штамм Nc/Nga мышей проявляет заметное увеличение сывороточного IgE и спонтанно развивает поражения, подобные атопическому дерматиту (Vestergaard и соавт., 2000 год, *Mol. Med. Today* 6:209-10; Watanabe и соавт., 1997 год, *Int. Immunol.* 9:461-66; Saskawa и соавт., 2001 год, *Int. Arch. Allergy Immunol.* 126:239-47).

[00149] Инъекция иммунокомпетентных донорных лимфоцитов в летально облученного гисто-несовместимого хозяина является классическим подходом индуцирования РТПХ (реакции "трансплантат

против хозяина") у мышей. В альтернативном варианте, исходная модель мыши B6D2F1 обеспечивает систему, индуцирующую как острую, так и хроническую РТПХ. В этой модели мыши B6D2F1 являются потомством F1 от скрещивания между исходными линиями мышей C57BL/6 и DBA/2. Перенос лимфоидных клеток DBA/2 на необлученные мыши B6D2F1 вызывает хроническую РТПХ, принимая во внимание перенос C57BL/6, C57BL/10 или B10. Лимфоидные клетки D2 вызывают острую РТПХ (Slayback и соавт., 2000, *Transm.* 26:931-938; Kataoka и соавт., 2001 год, *Immunology* 103:310-318).

[00150] Кроме того, как человеческие гемопоэтические стволовые клетки, так и зрелые лимфоидные клетки периферической крови могут быть привиты мышам SCID, и эти человеческие лимфогемопоэтические клетки сохраняют активность у мышей SCID (McCune и соавт., 1988 год, *Science* 241:1632-1639; Kamel-Reid and Dick, 1988 год, *Science* 242:1706-1709; Mosier и соавт., 1988 год, *Nature* 335:256-259). Это обеспечило систему модели на небольших животных для прямого тестирования потенциальных терапевтических агентов на лимфоидных клетках человека. (См., например, Tournou и соавт., 2001 год, *J. Immunol.* 166:6982-6991).

[00151] Кроме того, модели на небольших животных для изучения *in vivo* эффективности антител или производных к ВСМА могут быть созданы путем имплантации линий опухолевых клеток человека, экспрессирующих ВСМА, в подходящие иммунодефицитные линии грызунов, например, бестимусные мыши или мыши SCID. Примеры клеточных линий лимфомы человека, экспрессирующих ВСМА, включают, например, Daudi (Ghetie и соавт., 1994 год, *Blood* 83:1329-36; Ghetie и соавт., 1990 год, *Int. J. Cancer* 15:481-85; de Mont и соавт., 2001 год, *Cancer Res.* 61:7654-59), Ramos (Ma и соавт., 2002 год, *Leukemia* 16:60-6; Press и соавт., 2001 год, *Blood* 98:2535-43), HS-Sultan (Cattan and Maung, 1996 год, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 38:548-52; Cattan and Douglas, 1994 год, *Leuk. Res.* 18:513-22), Raji (Ochakovskaya и соавт., 2001 год, *Clin. Cancer Res.* 7:1505-10; Breisto и соавт., 1999 год, *Cancer Res.* 59:2944-49) и CA46 (Kreitman и соавт., 1999 год, *Int. J. Cancer* 81:148-55). Неограничивающим примером линии лимфомы

Ходжкина, экспрессирующей ВСМА, является L540cy (Barth и соавт., 2000 год, Blood 95:3909-14, Wahl и соавт., 2002 год, Cancer Res., 62:3736-42). Неограничивающие примеры клеточных линий карциномы почек человека, экспрессирующих ВСМА, включают 786-О (Ananth и соавт., 1999 год, Cancer Res. 59:2210-16; Datta и соавт., 2001 год, Cancer Res. 61:1768-75), ACHN (Hara и соавт., 2001 год, J. Urol. 166:2491-94; Miyake и соавт., 2002 год, J. Urol. 167:2203-08), Caki-1 (Prewett и соавт., 1998 год, Clin. Cancer Res. 4:2957-66; Shi and Siemann, 2002 год, Br. J. Cancer 87:119-26) и Caki-2 (Zellweger и соавт., 2001 год, Neoplasia 3:360-67). Неограничивающие примеры клеточных линий носоглоточной карциномы, экспрессирующих ВСМА, включают C15 и C17 (Busson и соавт., 1988 год, Int. J. Cancer 42:599-606; Bernheim и соавт., 1993 год, Cancer Genet. Cytogenet. 66:11-5). Неограничивающие примеры клеточных линий глиомы человека, экспрессирующих ВСМА, включают U373 (Palma и соавт., 2000 год, Br. J. Cancer 82:480-7) и U87MG (Johns и соавт., 2002 год, Int. J. Cancer 98:398-408). Эти линии опухолевых клеток могут быть внесены в иммунодефицитные грызуны хозяева в виде солидной опухоли подкожными инъекциями, либо в виде диссеминированных опухолей путем внутривенных инъекций. После внесения внутрь хозяина эти опухолевые модели могут применяться для оценки терапевтической эффективности антитела или производных к ВСМА, как описано в данном документе, для модулирования роста опухоли *in vivo*.

#### **VII. Применения в терапевтических целях**

[00152] Антитела против ВСМА по изобретению могут использоваться для лечения злокачественных новообразования. Некоторые из таких видов злокачественных новообразований показывают обнаруживаемые уровни ВСМА, измеренные как на уровне белка (например, путем иммуноанализа с применением одного из характерных антител), так и мРНК. Некоторые из таких злокачественных новообразований показывают повышенные уровни ВСМА относительно незлокачественной ткани того же типа, предпочтительно у одного и того же пациента. Характерный уровень ВСМА для злокачественных клеток, подходящих для лечения,

составляет 5000–150000 молекул ВСМА на клетку, хотя можно также проводить лечение более высокими или более низкими уровнями. Не обязательно, уровень ВСМА при злокачественном новообразовании измеряется перед проведением лечения.

**[00153]** Злокачественное новообразование, лечение которого антителами по изобретению является эффективным, включает солидные опухоли и гематологические виды опухолей, такие как лейкозы и лимфомы. Эти антитела особенно хорошо подходят для В-клеточных опухолей. Примеры злокачественных новообразований, для которых лечение антителами является эффективным: острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) у взрослых и детей, хронический миелоидный лейкоз (ХМЛ), острая лимфоцитарная лейкемия (ОЛЛ), хроническая лимфоцитарная лейкемия (ХЛЛ) и вторичный лейкоз; Неходжкинская лимфома (НХЛ) и болезнь Ходжкина; миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС) множественной миеломы, макроглобулинемия Вальденстрема или лимфома Беркитта, злокачественные новообразования плазматических клеток, ВСМА+лимфома высокой степени злокачественности, болезнь Калера и миеломатоз; плазмноклеточный лейкоз; плазмоцитома; В-клеточный пролимфоцитарный лейкоз; лейкоз ворсистых клеток; фолликулярная лимфома (включая типы фолликулярной неходжкинской лимфомы); лимфома Беркитта (эндемическая лимфома Беркитта; спорадическая лимфома Беркитта): лимфома маргинальной зоны (лимфоидная ткань слизистых оболочек: MALT 1 MALToma; моноцитоподобная В-клеточная лимфома; селезеночная лимфома с ворсинчатыми лейкоцитами); мантийноклеточная лимфома; крупноклеточная лимфома (диффузная крупноклеточная; диффузная смешанно-клеточная; иммунобластная лимфома; первичная медиастинальная В-клеточная лимфома; лимфангиома пульмональных В-клеток): мелкоклеточная лимфоцитарная лимфома (МЛЛ); В-лимфобластный лейкоз из клеток-предшественников; миелоидная лейкемия (гранулоцитарная; миелогенная; острый миелоидный лейкоз; хронический миелоидный лейкоз; подострый миелоидный лейкоз; остеобластокластома; хлорома; гранулоцитарная саркома; острый промиелоцитарный лейкоз; острый миеломоноцитарный лейкоз); макроглобулинемия

Вальденстрема или другой В-клеточный лейкоз или лимфома.

**[00154]** Антитела по изобретению также эффективны при иммунологических нарушениях, опосредованных иммунными клетками, экспрессирующими ВСМА, в частности, нарушениями, опосредованными В-клетками. Примеры таких заболеваний включают ревматоидный артрит, системную волчанку E (SLE), диабет типа I, астму, атопический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина", иммуноопосредованную тромбоцитопению, гемолитическую анемию, буллезный пемфигоид, миастению гравис, болезнь Грейвса, болезнь Аддисона, эксфолиативную пузырчатку, псориаз, псориатический артрит и анкилозирующий спондилит.

**[00155]** Антитела против ВСМА отдельно или в виде их конъюгатов лекарственных средств вводят в эффективном режиме, что означает дозировку, путь введения и частоту введения, которая задерживает начало, уменьшает тяжесть, ингибирует дальнейшее ухудшение и/или улучшает по меньшей мере один показатель или симптомом злокачественных новообразований. Если пациент уже страдает злокачественным новообразованием, то режим может указываться как терапевтически эффективный режим. Если у пациента повышен риск злокачественного новообразования по сравнению с общей популяцией, но он еще не испытывает симптомов, режим может упоминаться в качестве профилактически эффективного режима. В некоторых случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может наблюдаться у отдельного пациента по сравнению с ретроспективным контролем или прошлым опытом у того же пациента. В других случаях терапевтическая или профилактическая эффективность может быть продемонстрирована в доклиническом или клиническом исследовании в популяции пациентов, получавших лечение, по сравнению с контрольной популяцией пациентов, не получавших лечение.

**[00156]** Характерные дозы для моноклонального антитела составляют от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента, обычно от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 1 мг/кг до 15

мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг, или от 1 мг/кг до 10 мг/кг, или от 2 мг/кг до 30 мг/кг, от 2 мг/кг до 20 мг/кг, от 2 мг/кг до 15 мг/кг, от 2 мг/кг до 12 мг/кг, или от 2 мг/кг до 10 мг/кг, или от 3 мг/кг до 30 мг/кг, от 3 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг, от 3 мг/кг до 12 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг. Характерные дозы для активных конъюгатов моноклональное антитело лекарственное средство, например, ауристатинов, составляют от 1 мг/кг до 7,5 мг/кг или от 2 мг/кг до 7,5 мг/кг, или от 3 мг/кг до 7,5 мг/кг массы тела субъекта, или 0,1-20 или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 мг/кг) или 10-1500 или 200-1500 мг в виде фиксированной дозы. Характерные дозы для высокоактивных конъюгатов моноклональное антитело лекарственное средство, например, PBD, составляют от 1,0 мкг/кг до 1,0 мг/кг или от 1,0 мкг/кг до 500,0 мкг/кг массы тела субъекта. В некоторых способах пациенту вводят антитело или ADC каждые две, три или четыре недели. Среди других факторов, дозировка зависит от частоты введения, состояния пациента и реакции на предшествующий курс лечения, если таковой имелся, является ли лечение профилактическим или терапевтическим и является ли заболевание острым или хроническим.

[00157] Введение может быть парентеральным, внутривенным, оральным, подкожным, внутриартериальным, внутричерепным, интратекальным, внутрибрюшинным, местным, интраназальным или внутримышечным. Введение также может быть осуществлено непосредственно в опухоль. Предпочтительным является введение в системный кровоток путем внутривенного или подкожного введения. Внутривенное введение может осуществляться, например, путем инфузии в течение периода времени, такого как 30-90 мин или однократной болюсной инъекции.

[00158] Частота введения зависит от периода полувыведения антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство в системный кровоток, состояния пациента и пути введения среди других факторов. Частота может быть ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирования злокачественного новообразования, для которого лечение

эффективно. Характерная частота внутривенного введения составляет два раза в неделю и ежеквартально в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможна более или менее частая дозировка. Другие характерные частоты для внутривенного введения находятся между одним разом в неделю или одним разом в месяц в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможна более или менее частая дозировка. Для подкожного введения характерная частота дозирования является от ежедневной до ежемесячной, хотя также возможна более или менее частая дозировка.

**[00159]** Количество вводимых доз зависит от природы злокачественного новообразования или аутоиммунного заболевания (например, будь то острые или хронические симптомы) и реакции нарушения на лечение. Для острых нарушений или острых приступов хронического нарушения обычно бывает достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одна болюсная доза, необязательно в виде разделенной формы, является достаточной для острого нарушения или острого приступа хронического нарушения. Лечение может повторяться для рецидива острого нарушения или острого приступа. При хронических нарушениях антитело можно вводить через регулярные промежутки времени, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по крайней мере 1, 5 или 10 лет или в течение жизни пациента.

**[00160]** Фармацевтические композиции для парентерального введения предпочтительно являются стерильными и, по существу, изотоническими и производятся в условиях GMP. Фармацевтические композиции могут быть представлены в единичной лекарственной форме (то есть в дозировке для однократного введения). Фармацевтические композиции могут быть составлены с применением одного или более физиологически приемлемых носителей, разбавителей, наполнителей или вспомогательных веществ. Состав зависит от выбранного пути введения. Для инъекций, антитела могут быть получены в водных растворах, предпочтительно в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера или физиологический раствор или ацетатный буфер (с целью уменьшить дискомфорт в месте инъекции). Раствор может

содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие вещества. В альтернативном варианте, антитела могут находиться в лиофилизированной форме для разбавления с подходящим носителем, например, стерильной апиrogenной водой, перед применением. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 0,1-10 мг/мл, например, 1,0 мг/мл.

[00161] Лечение антителами по изобретению можно сочетать с химиотерапией, лучевой терапией, лечением стволовыми клетками, другими способами лечения, эффективными против расстройства, которое лечится. Полезные классы других средств, которые могут быть введены с антителами к ВСМА, включают, например, антитела против другим рецепторам, экспрессируемым на злокачественных клетках, антитубулиновые средства (например, ауристатины), белки, связывающиеся по малой бороздке ДНК (например, PBD), ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие агенты (например, комплексы платины, такие как цис-платин, моно(платина), бис(платина) и триядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, ингибиторы обмена веществ, сенсбилизаторы химиотерапии, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, соединения предварительного формирования, пуриновые ингибиторы обмена веществ, пуромицины, радиосенсбилизаторы, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и тому подобное. Те же дополнительные лечения, которые были упомянуты только для лечения злокачественных новообразований, также могут быть применены для иммуно-обусловленных нарушений. Дополнительные средства для иммуно-обусловленных нарушений включают иммунные супрессоры, такие как ингибиторы дегрануляции тучных клеток, антигистамины, кортикостероиды, НПВС (нестероидные противовоспалительные средства), азатиоприн, циклофосфамид, лейкеран и циклоспорин и биологические противовоспалительные средства, такие как Tysabri® или Humira®.

[00162] Лечение антителами к ВСМА, необязательно в сочетании

с любым из других средств или режимов, описанных выше отдельно или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может увеличить медианную выживаемость без прогрессирования заболевания или общее время выживания пациентов, страдающих злокачественными новообразованиями, особенно в случае рецидивирующих или рефрактерных, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% или дольше по сравнению с аналогичным лечением (например, химиотерапией), но без антитела против ВСМА. Кроме того, или в альтернативном варианте, лечение (например, стандартная химиотерапия), включающее антитело к ВСМА, отдельно или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может увеличить процент пациентов с полным объективным ответом, процент пациентов с частичным объективным ответом или процент пациентов с объективным ответом (полный+частичный) пациентов с опухолями, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно на 50%, от 60% до 70% или даже на 100% по сравнению с аналогичным лечением (например, химиотерапией), но без антитела против ВСМА.

**[00163]** Как правило, в клиническом исследовании (например, в фазе II, в фазе II/III или в фазе III) вышеупомянутое увеличивает медианную выживаемость без прогрессирования заболевания и/или уровень ответа пациентов, получавших стандартную терапию, плюс антитело к ВСМА, по сравнению с контрольной группой пациентов, получающих стандартную терапию отдельно (или плюс плацебо) и является статистически значимым, например, на уровне  $p=0,05$  или  $0,01$  или даже  $0,001$ . Процент пациентов с полным или частичным объективным ответом определяется объективными критериями, обычно применяемыми в клинических испытаниях для лечения злокачественного новообразования, например, перечисленными или принятыми Национальным институтом рака и/или Управлением по контролю продуктов питания и лекарственных средств.

#### **VIII. Другие применения**

**[00164]** Антитела против ВСМА, описанные в данном документе, могут применяться для выявления ВСМА в контексте клинической диагностики или лечения, или в исследованиях. Экспрессия ВСМА

при злокачественном новообразовании указывает на то, что лечение злокачественного новообразования антителами по данному изобретению является эффективным. Антитела также могут быть проданы в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований в области выявления клеток, несущих ВСМА, и их реакции на различные раздражители. В таких применениях моноклональные антитела могут быть помечены флуоресцентными молекулами, спин-мечеными молекулами, ферментами или радиоизотопами и могут быть представлены в виде набора со всеми необходимыми реагентами для проведения анализа для ВСМА. Антитела также могут быть применены для очистки белка ВСМА, например, с помощью аффинной хроматографии.

[00165] Любая особенность, этап, элемент, вариант реализации изобретения или аспект изобретения могут применяться в сочетании с любым другим, если специально не указано иное. Несмотря на то, что настоящее изобретение было подробно описано в качестве иллюстрации и примера в целях ясности и понимания, будет очевидно, что некоторые изменения и модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения.

#### **ПРИМЕРЫ**

##### **Пример 1: Создание антител**

***Получение рекомбинантного внеклеточного домена ВСМА (ECD ВСМА)***

[00166] Внеклеточный домен (ECD) человека (аминокислоты 1-51) и мыши ВСМА (аминокислоты 1-46) клонировали и экспрессировали в виде слитого белка GST (pGEX4T1, Amersham Biosciences). Очищенный ECD ВСМА был получен путем захвата слитого белка ВСМА глутатион-сефарозой и высвобождения ECD ВСМА путем расщепления протеазой с тромбином. Затем тромбин удаляли бензамидиновой сефарозой.

***Идентификация экспрессии ВСМА на линиях злокачественных В-клеток***

[00167] Количественную проточную цитометрию проводили на клеточных линиях множественной миеломы с применением Vicky-1, коммерческого антитела против ВСМА (Alexis Biotechnology). Результаты показали, что ВСМА распространена среди тестируемых

линий миеломы. NCI H929 показала положительное окрашивание поверхности клеток для ВСМА, но не имела экспрессии как BR3, так и TACI. Поскольку NCI H929 экспрессировала ВСМА, но не BR3 или TACI, она применялась для скрининга гибридных форм ВСМА на основе клеток.

***Разработка трансфицированной ВСМА клеточной линии.***

[00168] Стабильные клеточные линии были созданы путем трансфекции клеток НЕК 293 либо полноразмерным клоном ВСМА, либо пустым вектором. Проточная цитометрия подтвердила положительную экспрессию ВСМА на поверхности ВСМА-трансфицированного (293: ВСМА), но не контрольной плазмиды пустого вектора (293: вектор). Эти клеточные линии впоследствии применяли в качестве инструмента для подтверждения специфичности клонированных ВСМА антител.

**Пример 2. Иммунизация и скрининг лунок неклонированной гибридомы**

***Иммунизация и скрининг антисыворотки***

[00169] В нашей стратегии иммунизации применялись аминокислоты 1-50 из ECD ВСМА, так что эпитопы, внутренние и внешние по отношению к лиганд-связывающему домену, могли служить целью для антител (Фиг. 1А и 1В). КЛН-конъюгированный ECD ВСМА был получен из коммерческого источника (Alexis Biochemicals). Крыс иммунизировали КЛН-конъюгированным ВСМА с применением адъюванта Titermax до тех пор, пока иммунный ответ не выявлялся с помощью ИФА. Сыворотку иммунизированных крыс также проверяли на способность блокировать связывание APRIL в анализе на основе планшетов. Крыса 2-3 была выбрана для слияния, потому что антисыворотка имела значительный титр антител ВСМА человека и проявляла сильную блокирующую активность.

[00170] Клетки селезенки крысы 2-3 собирали, сливали с X-63. Клетки Ag8.653.3.12.11 миеломы мыши выбирали, как описано (Goding, 1989 год). Супернатанты культуры из полученных гибридом скринировали с помощью ИФА с применением очищенного чВСМА-GST (см. блок-схему на Фиг. 2). Восемьдесят положительных лунок были идентифицированы и отобраны для расширения. Шестьдесят из восьми положительных лунок продолжали демонстрировать ОП > 0,5 с

помощью ИФА после расширения. Эти шестьдесят лунок неклонированной гибридомы затем подвергали скринингу во вторичных анализах на связывание на основе клеток, активность блокады лигандов и перекрестную специфичность с ВСМА мыши. Это привело к идентификации двенадцати ведущих лунок гибридомы ВСМА. Данные связывания клеток и активность блокады лигандов из этих двенадцати ведущих лунок суммированы на Фиг. 3. Лунка гибридомы 17 показала активность связывания клеток и блокады лигандов, которые заменяют коммерческий моноклональный Vicky-1 (Alexis Biochemicals). Восемь лунок (обозначенных красной звездочкой на Фиг. 3) были перенесены для клонирования на основе их способности связывать ВСМА-позитивные клетки или блокировать связывания лиганда.

**Пример 3: Характеристика клональных гибридом**

***Связывание клеток и активность блокады лигандов.***

[00171] Лунки гибридомы 11, 17, 20, 29, 40, 45 и 70 были взяты через 2 раунда клонирования, ограниченного разбавлением. С этого момента антитела будут обозначаться формальным идентификатором клона, приведенным в Таблице 1. Специфическое связывание антител с клетками 293: ВСМА, но не с контрольными клетками 293: вектор, подтверждает, что антитела связываются с ВСМА.

**Таблица 1: Формальные идентификаторы клонов.**

Обозначение неклонированного	Идентификатор клонированного
11	SG16.11
17	SG16.17
20	SG16.20
29	SG16.29
40	SG16.40
45	SG16.45
70	SG16.70

[00172] Активность блокады лигандов новых антител ВСМА сравнивали, используя супернатант из неклонированной основной лунки, супернатант из клонированной лунки и очищенное антитело

из клонированной лунки (Фиг. 4). В качестве положительного контроля использовали коммерческое антитело. SG-16.17 дало значительное блокирование связывания APRIL с применением супернатанта культуры из лунки с клонированной гибридомы. Титрование SG16.17-блокады связывания APRIL проводили в отдельном эксперименте с применением очищенного SG16.17 и коммерческого антитела (Фиг. 5). Очищенное SG16.17 показало улучшенную блокирующую активность в аналогичных концентрациях по сравнению с коммерческим антителом. SG-16.45 показало дозозависимое ингибирование связывания April, хотя и не столь сильно, как SG-16.17. Активность блокады лигандов для остальных антител ВСМА (SG-16.11, SG16.20, SG16.29, SG16.40 и SG16.70) была меньшей. Определенные блокирующие антитела ВСМА показали >75% ингибирования связывания APRIL, как это наблюдалось с SG-16.17. Более "умеренные" блокирующие антитела, включая SG-16.11, SG-16.20, SG-16.29, SG-16.40 и SG-16.70, показали около 30% ингибирования APRIL (Фиг. 4).

[00173] Способность BAFF связывать иммобилизованный ВСМА также анализировали в присутствии и отсутствии очищенных антител ВСМА. Предварительная обработка антителами ВСМА SG16.17, SG16.40, SG16.20 и SG17.70 приводила к титруемому ингибированию связывания BAFF с ВСМА (Фиг. 6). Относительное ингибирование определяли связыванием BAFF с иммобилизованным ВСМА в отсутствие обработки антителом (Фиг. 6, отмечено звездочкой). Взятые вместе данные на Фиг. 5 и 6 изображают, что антитела ВСМА могут блокировать связывание лиганда APRIL и BAFF с ВСМА и тем самым взаимодействовать с сигналами выживаемости В-клеток.

#### **Пример 4. Испытание антител SG16.17 и SG16.45 на ADCC и цитотоксичность в качестве ADC**

[00174] Антитело SG16.17 превращали в химерный (крыса-человек) IgG путем слияния крысиных доменов  $V_H$  и  $V_L$  с константными доменами тяжелой и легкой цепи IgG1 дикого типа человека, соответственно. Химеризованное антитело, обозначенное сSG16.17 дикого типа, показало подобные антигенсвязывающие свойства по сравнению с исходным антителом SG16.17. Затем авторы установили мутации Fc, S239D:A330L:I332E, которые как известно

усиливают ADCC, для производства мутанта cSG16.17. Подобно cSG16.17 дикого типа, производство тройного мутанта Fc не изменяло антигенсвязывающие свойства мутанта cSG16.17. Оценка cSG16.17 дикого типа и мутанта cSG16.17 в анализе ADCC с очищенными естественными клетками-киллерами приводила к дозозависимому лизису клеток JLN3 и U266, тогда как не наблюдалось существенного лизиса с несвязывающим контролем IgG человека. Антитело дикого типа cSG16.17 проявляло ограниченную активность ADCC на клетках JLN3, которая была увеличена в ~ 100 раз по активности и в >2 раза по эффективности (максимальный лизис) мутантом cSG16.17. Аналогичным образом, для клеток U266 активность ADCC мутанта cSG16.17 была увеличена в 100 раз по эффективности и в 2 раза по эффективности по сравнению с исходным химерным антителом. Концентрация мутанта cSG16.17, необходимая для максимального лизиса как клеток JLN3 так и U266, составляла ~ 100 пмоль/л. В противоположность этому, константу диссоциации ( $K_d$ ) cSG16.17 на клетках JLN3 и U266 оценивали как 15 и 10 нмоль/л, соответственно. Таким образом, максимальный лизис мутантом cSG16.17 был достигнут при концентрациях, значительно меньших, чем требуется для достижения насыщения связывания.

[00175] Авторы оценили способность SG16.17 и SG16.45 индуцировать цитотоксичность в качестве ADC с применением vcMMAF с стехиометрией восьми лекарственных средств на антитело. SG16.17 или SG16.45-vcMMAF8 было сильно цитотоксично по отношению к клеткам H929. С применением неперехватывающего АЦП или неконъюгированных антител снижение жизнеспособности клеток не наблюдалось. Авторы также исследовали эффективность ADC SG16.17 среди других линий клеток MM, включая клеточные линии JLN3 и U266. SG16.17-vcMMAF8 показало стабильную и высокую эффективность (значения  $IC_{50} \leq 130$  пмоль/л) среди всех троих клеточных линий MM, тогда как SG16.45-vcMMAF8 показало большую изменчивость и меньшую общую эффективность.

**Пример 5. Исследование антитела SG16.17 на связывание с Fc $\gamma$ RIIIa и передачу сигналов через Fc $\gamma$ RIIIa**

[00176] Для анализа связывания, CHO клетки трансфецировали

FcγRIIIa (hCD16) и связывание меченого антитела h00 измеряли при конкуренции с химерным SG16.17 за связывание с IgG1 дикого типа и IgG1 с генотипом S239D, A330L, I332E, а также с различными контрольными антителами IgG1. На Фиг.12 показано, что химерный SG16.17 конкурировал сильнее, чем два контрольных антитела, ритуксимаб и сОКТ9. Мутантная форма SG16.17 конкурировала сильнее, чем форма IgG1 дикого типа. В анализе передачи сигнала использовали целевые клетки U266, экспрессирующие BCMA, эффекторные клетки Jurkat, экспрессирующие FcγRIIIa, и сконструированные для экспрессии репортентного белка люциферазы из элемента ответа NFAT и индикатора Bio-Glo. Все сSG16.17 G1 WT & S239D, A330L, I332E индуцировали сингальный путь FcγRIIIa, причем форма S239D, A330L, I332E была сильнее (Фиг. 13).

#### Пример 6: Гуманизация SG16.17

Таблица 2: Гуманизированные мутации в вариантах тяжелой цепи hSG16.17

Вариант vH	Акцепторная последовательность экзона HV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hvH1	HV1-2/HJ3	H8, H20, H48, H67, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	нет
hvH2	HV1-2/HJ3	H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	H34, H50, H58, H60, H61, H62, H64, H65
hvH3	HV1-2/HJ3	H20, H48, H67, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	H58, H60, H61, H62, H64, H65
hvH4	HV1-2/HJ3	H48, H67, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91, H93	H34, H50, H58, H60, H61, H62, H64, H65
hvH5	HV1-46/HJ3	H48, H67, H71, H73, H76, H78, H80, H91, H93	нет
hvH6	HV1-46/HJ3	H8, H20, H48, H71, H73, H76, H78, H80, H91, H93	нет

Таблица 3: Гуманизированные мутации в вариантах легкой цепи каппа hSG16.17

Вариант vK	Акцепторная последовательность экзона KV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hVK2	KV1-12/KJ5	L46, L48, L87	L53

hVK3	KV1-12/KJ5	L46, L48, L87	L24, L53
hVK4	KV1-12/KJ5	L46, L48, L78, L85, L87	нет
hVK5	KV1-12/KJ5	L40, L46, L48, L87	L24, L53

**Таблица 4: Специфические мутации каркаса в вариантах тяжелой цепи hSG16.17**

Вариант	H8	H20	H48	H67	H69	H71	H73	H76	H78	H80	H88	H91	H93	% человеческие
hVH1	R*	L*	I*	A*	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	79,6
hVH2	G	L*	I*	V	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	88,8
hVH3	G	L*	I*	A*	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	86,7
hVH4	G	V	I*	A*	M*	A*	K*	N*	A	V*	A*	F*	T*	88,8
hVH5	G	V	I*	A*	M	A*	K*	N*	A*	V*	A	F*	T*	78,6
hVH6	R*	L*	I*	V	M	A*	K*	N*	A*	V*	A	F*	T*	85,7

\* Крысиные остатки

**Таблица 5: Специфические мутации каркаса в вариантах легкой цепи каппа hSG16.17**

Вариант	L40	L46	L48	L78	L85	L87	% человеческие
hVK2	P	V*	V*	L	T	F*	86,3
hVK3	P	V*	V*	L	T	F*	87,4
hVK4	P	V*	V*	M*	D*	F*	83,2
hVK5	S*	V*	V*	L	T	F*	86,3

\* Крысиные остатки

[00177] Были секвенированы переменные области тяжелой и легкой цепи крысы гибридомы крысы, экспрессирующей SG16.17. HV1-2/HJ3 (SEQ ID NO:9) или HV1-46/HJ3 (SEQ ID NO:10) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для тяжелой цепи, а KV1-12/KJ5 (SEQ ID NO:18) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для легкой цепи.

[00178] Положения, отличающиеся между донорами крысы и акцепторными последовательностями человека, включают H8, H20, H48, H67, H69, H71, H76, H78, H80, H88, H91, H93, L40, L46, L48, L78, L85 и L87. Различные пермутации этих остатков были включены как обратные мутации в разные последовательности гуманизированной тяжелой цепи и легкой цепи. Несколько остатков крыс в CDR по Кабат также испытывали на замещение

соответствующими остатками акцепторных последовательностей человека. Положениями этих остатков были H34, H50, H58, H60, H61, H62, H64 и H65, и L24 и L53. Были разработаны и экспрессированы шесть вариантов гуманизированной тяжелой цепи и четыре варианта гуманизированной легкой цепи. В Таблицах 2 и 3 показана акцепторная последовательность человека, обратные мутации (остатки донорного каркаса) и замещения CDR (акцепторные остатки CDR) в каждом гуманизированном варианте цепи. В Таблицах 4 и 5 указаны аминокислоты, занимающие каждое из положений, которые рассматриваются для обратной мутации в каждом из гуманизированных вариантов цепи. В этих таблицах также указывается процент остатков, идентичных последовательности ближайших человеческих зародышевых линий. Согласно недавней нормы INN, только антитела с по меньшей мере на 85% идентичные последовательности зародышевой линии человека как в тяжелых, так и в легких цепях можно считать гуманизированными. На Фиг. 7-9 изображены выравнивания переменных областей гуманизированной тяжелой цепи с переменной областью крысы и акцепторными последовательностями человека. На Фиг. 10 и 11 изображено выравнивание переменных областей гуманизированной легкой цепи с переменной областью крысы и акцепторными последовательностями человека. С-концевой аргинин (R) переменных легких цепей в альтернативном варианте можно рассматривать как N-концевой аргинин константной области легкой цепи.

**[00179]** Шесть гуманизированных тяжелых цепей и четыре гуманизированные легкие цепи были испытаны во всех 24 возможных пермутациях на связывание с ВСМА, экспрессируемым на клетках NCI-H929, которые экспрессируют около 50 000 молекул ВСМА на клетку. Результаты приведены в Таблице 6 ниже. Коротко, все гуманизированные легкие цепи показали хорошее связывание. Из гуманизированных тяжелых цепей варианты VH1, VH3 и VH5 показали улучшенное связывание по сравнению с химерным или крысиным антителом SG16.17.

**Таблица 6: Связывание гуманизированных антител hSG16.17 с ВСМА, экспрессируемым на клетках NCI-H929**

hSG16.17	vH	vK	Анализ 3-пт NCI-H929
1	vH1	vK2	++++
2	vH1	vK3	++++
3	vH1	vK4	++++
4	vH1	vK5	++++
5	vH2	vK2	-
6	vH2	vK3	-
7	vH2	vK4	-
8	vH2	vK5	-
9	vH3	vK2	++++
10	vH3	vK3	++++
11	vH3	vK4	++++
12	vH3	vK5	++++
13	vH4	vK2	-
14	vH4	vK3	-
15	vH4	vK4	-
16	vH4	vK5	-
17	vH5	vK2	++++
18	vH5	vK3	++++
19	vH5	vK4	++++
20	vH5	vK5	++++
21	vH6	vK2	++
22	vH6	vK3	++
23	vH6	vK4	++
24	vH6	vK5	++
cSG16.17			+++
rSG16.17			+++

[00180] Гуманизированные антитела, демонстрирующие лучшие

результаты в анализе NCI-H929 (то есть, те, которые содержат тяжелые цепи VH1, VH3 или VH5), дополнительно испытывали на связывание с клетками U266 во всем диапазоне концентраций. В этом анализе гуманизированные антитела, содержащие тяжелые цепи VH1 (независимо от того, какой вариант гуманизированной легкой цепи был включен), показали улучшенное связывание относительно крысиного или химерного SG16.17. Гуманизированные антитела, содержащие тяжелые цепи VH3 или VH5 (независимо от того, какой вариант гуманизированной легкой цепи был включен), показали такое же связывание в пределах экспериментальной ошибки, что и связывание крысиного или химерного SG16.17. Гуманизированные антитела, содержащие переменные области VH2 или VH6, показали снижение связывания относительно крысиного или химерного SG16.17 независимо от того, какой вариант гуманизированной легкой цепи был включен.

[00181] Гуманизированные антитела, демонстрирующие лучшие результаты в анализе NCI-H929, также сравнивали на уровень экспрессии белка, уровень мономера и процентную идентичность последовательности с зародышевой линией человека, как показано в Таблице 7 ниже.

Таблица 7:

hSG 16. 17	vH	vK	Связывание чВСМА	Преходящий титр (мг/л)	aSEC (% мономера)	≥ 85% человеческие (vH, vK) и обозначение INN			Выбор ведущих
1	vH1	vK2	++++	139	90,4	79,6	86,3	Смешанный	Y
2	vH1	vK3	++++	126	89,6	79,6	87,4	Смешанный	Y
3	vH1	vK4	++++	80	94,6	79,6	83,2	Химерное	N
4	vH1	vK5	++++	119	89,5	79,6	86,3	Смешанный	N
9	vH3	vK2	++++	129	94,1	86,7	86,3	Гуманизованное	Y
10	vH3	vK3	++++	116	94,1	86,7	87,4	Гуманизованное	Y
11	vH3	vK4	++++	82	95,2	86,7	83,2	Смешанный	Y
12	vH3	vK5	++++	117	93,5	86,7	86,3	Гуманизованное	Y
17	vH5	vK2	++++	97	96,2	78,6	86,3	Смешанный	Y
18	vH5	vK3	++++	86	96,1	78,6	87,4	Смешанный	Y

19	vH5	vK4	++++	65	96,5	78,6	83,2	Химерное	N
20	vH5	vK5	++++	73	95,0	78,6	86,3	Смешанный	Y

[00182] Гуманизированное антитело VH3 VK2 было выбрано в качестве ведущего гуманизированного антитела на основе наличия у него такой же аффинности связывания с ВСМА человека, что и у антител SG16.17 крысы и мыши (в пределах экспериментальной ошибки); более 85% идентичности с последовательностью зародышевой линии человека в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепи, хорошей экспрессия и высокого процента мономеров.

#### Пример 7: Гуманизация SG16.45

Таблица 8: Гуманизированные мутации в вариантах тяжелой цепи hSG16.45

Вариант vH	Акцепторная последовательность экзона HV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hvH1	HV3-23/HJ3	H30, H37, H48, H93, H94, H107	нет
hvH2	HV3-23/HJ3	H30, H37, H48, H93, H94, H107	H50, H60
hvH3	HV3-23/HJ3	H30, H37, H48, H76, H93, H94, H107	H50, H60
hvH4	HV3-23/HJ3	H30, H48, H76, H93, H94	H50
hvH5	HV3-74/HJ3	H30, H93, H94	H50
hvH6	HV3-9/HJ3	H30, H93, H94	H50, H60

Таблица 9: Гуманизированные мутации в вариантах легкой цепи каппа hSG16.45

Вариант vK	Акцепторная последовательность экзона KV	Остатки донорного каркаса	Остатки акцептора CDR
hvK1	KV3-20/KJ2	L14, L19, L21, L38, L58, L71, L78	L24, L26
hvK2	KV3-20/KJ2	нет	L24, L26
hvK3	KV3-20/KJ2	L21, L38, L58, L71	L24, L26
hvK5	KV3-20/KJ2	L38, L71	нет

Таблица 10: Специфические мутации каркаса в вариантах тяжелой цепи hSG16.45

Вариант	H30	H37	H48	H76	H93	H94	H107	% человеческие
hvH1	N*	I*	I*	N	T*	S*	V*	86,5
hvH2	N*	I*	I*	N	T*	S*	V*	88,5
hvH3	N*	I*	I*	S*	T*	S*	V*	87,5

hVH4	N*	V	I*	S*	T*	S*	T	87,5
hVH5	N*	V	V	N	T*	S*	T	88,5
hVH6	N*	V	V	N	T*	S*	T	88,5

\* Крысиные остатки

**Таблица 11: Специфические мутации каркаса в вариантах легкой цепи каппа hSG16.45**

Вариант	L14	L19	L21	L38	L58	L71	L78	% человеческие
hVК1	A*	V*	I*	H*	V*	Y*	M*	79,2
hVК2	L	A	L	Q	I	F	L	86,5
hVК3	L	A	I*	H*	V*	Y*	L	82,3
hVК5	L	A	L	H*	I	Y*	L	82,3

\* Крысиные остатки

**[00183]** Были секвенированы переменные области тяжелой и легкой цепи крысы гибридомы крысы, экспрессирующей SG16.45. HV3-23/HJ3 (SEQ ID NO:24) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для тяжелой цепи, а KV3-20/KJ2 (SEQ ID NO:34) применяли в качестве акцепторной последовательности человека для легкой цепи.

**[00184]** Каркасные положения переменной области, отличающиеся от крысиных донорных и человеческих акцепторных последовательностей, включают H30, H37, H48, H67, H93, H94 и H107 и положения L14, L19, L21, L38, L58, L71 и L78. Различные пермутации этих остатков были включены как обратные мутации в разные последовательности гуманизированной тяжелой цепи и легкой цепи. Несколько остатков крыс в CDR по Кабат также испытывали на замещение соответствующими остатками акцепторных последовательностей человека. Положениями этих остатков были H50, H60, L24 и L26. Были разработаны и экспрессированы шесть вариантов гуманизированной тяжелой цепи и четыре варианта гуманизированной легкой цепи. В Таблицах 8 и 9 показана акцепторная последовательность человека, обратные мутации (остатки донорного каркаса) и замещения CDR (акцепторные остатки CDR) в каждом гуманизированном варианте цепи. В Таблицах 10 и 11 указаны аминокислоты, занимающие каждое из положений, которые рассматриваются для обратной мутации в каждом из

гуманизированных вариантов цепи. В этих таблицах также указывается процент остатков, идентичных последовательности ближайших человеческих зародышевых линий. Согласно недавней нормы INN, только антитела с по меньшей мере на 85% идентичные последовательности зародышевой линии человека как в тяжелых, так и в легких цепях можно считать гуманизированными. На Фиг. 14-17 изображено выравнивание переменных областей гуманизированной тяжелой цепи с переменной областью крысы и акцепторными последовательностями человека. На Фиг. 18 и 19 изображены выравнивания переменных областей легкой цепи. С-концевой аргинин (R) переменных легких цепей в альтернативном варианте можно рассматривать как N-концевой аргинин константной области легкой цепи.

**[00185]** Шесть гуманизированных тяжелых цепей и четыре гуманизированные легкие цепи были испытаны во всех 24 возможных пермутациях на связывание с ВСМА, экспрессируемым на клетках NCI-H929, которые экспрессируют около 50 000 молекул ВСМА на клетку. Результаты приведены в Таблице 12 ниже.

**Таблица 6: Связывание гуманизированных антител hSG16.45 с ВСМА, экспрессируемым на клетках NCI-H929**

hSG16.45	vH	vK	Анализ 3-pt NCI-H929
1	vH1	vK1	+++
2	vH1	vK2	+++
3	vH1	vK3	+++
4	vH1	vK5	+++
5	vH2	vK1	-
6	vH2	vK2	-
7	vH2	vK3	-
8	vH2	vK5	-
9	vH3	vK1	-
10	vH3	vK2	-
11	vH3	vK3	-
12	vH3	vK5	++
13	vH4	vK1	+

14	vH4	vK2	+
15	vH4	vK3	+
16	vH4	vK5	++
17	vH5	vK1	++
18	vH5	vK2	++
19	vH5	vK3	++
20	vH5	vK5	++
21	vH6	vK1	+
22	vH6	vK2	+
23	vH6	vK3	+
24	vH6	vK5	++
cSG16.45			+++
rSG16.45			+++

[00186] Гуманизированные антитела, демонстрирующие лучшие результаты в анализе NCI-H929, дополнительно тестировали на связывание с клетками U266 в полном диапазоне точек концентрации, а также на экспрессию и содержание мономера, а также на идентичность последовательности с зародышевой линией человека (Таблица 13).

**Таблица 13:**

hSG16.45	VH	VK	чBCMA	IgG мг	aSEC %	VH %	VK %	INN
1	VH1	VK1	+++	0,67	94,5	86,5	79,2	Смешанный
3	VH1	VK3	+++	0,54	94,6	86,5	82,3	Смешанный
4	VH1	VK5	+++	0,16	76,0	86,5	82,3	Смешанный
17	VH5	VK1	++	0,64	94,4	88,5	79,2	Смешанный
18	VH5	VK2	++	0,65	93,7	88,5	86,5	Чел
19	VH5	VK3	++	0,64	94,1	88,5	82,3	Смешанный

[00187] VH5 VK2, VH1 VK1 и VH1 VK3 были лучшими антителами в целом на основе аффинности связывания для человека,

идентичности последовательности с последовательностью зародышевой линии человека в переменных областях как тяжелой, так и легкой цепи, хорошей экспрессии и высокого процента мономеров, VH1 VK1 и VH1 VK3 имели несколько более высокое связывание (такое же, как крысиное или химерное в пределах экспериментальной ошибки), но более низкую идентичность последовательности с зародышевой линией человека.

**Пример 8: Синтез восстановленного фукозилированного антитела hSG16.17 или hSG16.45**

[00188] Антитело hSG16.17 VH3 VK2 или hSG16.45 VH5 VK2 экспрессировали в клетках CHO. Ингибитор фукозилирования, 2-фторфукоза, был включен в среды для выращивания культур клеток во время продуцирования антител, что приводило к получению нефукозилированного антитела. См., например, Okeley и соавт., *Proc. Nat'l Acad. Sci.* 110:5404-55409 (2013 год). Основная среда для роста клеток, свободная от фукозы и 2-фторфукозы, была добавлена в среду с целью ингибирования фукозилирования белка. *Ibid.* Встраивание фукозы в антитела измеряли с помощью ЖК-МС через хроматографию PLRP-S и квадрупольную время-пролетную масс-спектрометрию с электрораспылительной ионизацией (TOF MS). *Ibid.*

**Пример 9: Активность in vivo hSG16.17-SEA у мышей SCID или NSG**

[00189] На Фиг. 20А-С изображена активность in vivo мультидозированного чSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MM1S у мышей SCID. Животным в/в имплантировали клетки MM1S, а введение антител начинали через 9 дней после имплантации. За выживанием животных следили в течении времени. N=8 животных на группу. Копия ВСМА#=7000, копия CD38#=14000. А) 1 мг/кг еженедельно внутрибрюшинно в течение 5 недель В) 3 мг/кг еженедельно внутрибрюшинно в течение 5 недель и С) 10 мг/кг еженедельно внутрибрюшинно в течение 5 недель. Животные SCID содержат эффекторные клетки для опосредования ADCC и ADCP. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA улучшает выживаемость, по сравнению с даратумумабом (целевое Ат CD38). Несвязывающий контроль h00 не показал активности.

[00190] На Фиг. 21А-С изображена активность *in vivo* однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли EJM у мышей NSG. Животные NSG не содержат клеток NK и минимально активных макрофагов. Животным в/в имплантировали клетки EJM, а однократную дозу антитела вводили внутривентриально через 5 дней после имплантации. За выживанием животных следили в течении времени. N=8 животных на группу. Копия ВСМА #=45000. Копия CD38 #=47000. Копия CS1 #=14000. А) доза 1 мг/кг В) 3 мг/кг доза С) доза 10 мг/кг. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA увеличивает выживаемость в равной или большей степени, чем даратумумаб (целевое Ат CD38) и элотузумаб (целевое Ат CS1). SG16.17 ДТ также может вызывать увеличение выживаемости. Несвязывающий контроль h00 не показал активности при максимальной дозе. Поскольку у этих животных присутствовали минимальные эффекторные клетки, активность антител hSG16.17 SEA и ДТ, вероятно, связана с блокировкой сигналов пролиферации APRIL и BAFF.

[00191] На Фиг. 22 изображена *in vivo* активность мультидозированного чSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG. Животным NSG имплантировали клетки NCI-H929 люцифераза. Введение антител начинали через 21 день после имплантации, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируются внутривентриально еженедельно в общем количестве 5 доз. N=5 животных на группу. Копия ВСМА #=25000. Копия CD38 #=45000. Копия CS1 #=3000. Среднее значение люминесценции составлено с течением времени по сравнению с необработанными и здоровыми животными. hSG16.17 SEA проявляло гораздо лучшую активность по сравнению с даратумумабом (целевое Ат CD38) и элотузумабом (целевое Ат CS1). Повышенная люминесценция, наблюдаемая в группе hSG16.17-SEA 10 мг/кг, наблюдалась у одного животного.

[00192] На Фиг. 23А и 23В изображена активность *in vivo* однократного дозированного чSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG. Животным NSG имплантировали клетки NCI-H929 люцифераза. Введение антител начинали через 21 день после инъекции, когда

биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируется раз внутрибрюшинно. N=5 животных на группу. А) 3 мг/кг антител ДТ против SEA. В) Диапазон дозы hSG16.17 SEA. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA может быть активным при однократной дозе 0,3 мг/кг, а hSG16.17SEA может быть более активным, чем его (фукозилированный) аналог ДТ.

**[00193]** На Фиг. 23А и 23В изображена активность *in vivo* однократного дозированного чSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG. Животным NSG имплантировали клетки NCI-H929 люцифераза. Введение антител начинали через 21 день после инъекции, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируется раз внутрибрюшинно. N=5 животных на группу. А) 3 мг/кг антител ДТ против SEA. В) Диапазон дозы hSG16.17 SEA. Данные на этом рисунке показывают, что hSG16.17 SEA может быть активным при однократной дозе 0,3 мг/кг, а hSG16.17SEA может быть более активным, чем его (фукозилированный) аналог ДТ. Воздействие на люминесценцию приводит к длительной выживаемости животных (данные не показаны).

**[00194]** На Фиг. 24. Активность *in vivo* однократного дозированного чSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MOLP-8-люцифераза у мышей SCID. Животным SCID в/в имплантировали клетки MOLP-8 люцифераза. Введение антител начинали через 13 дней после инъекции, когда биолюминесценция наблюдалась в костном мозге. Дозируется раз внутрибрюшинно. N=5 животных на группу. Копия ВСМА #=2000. Динамика люминесценции изображена с течением времени. Эти данные показывают, что даже при наличии только 2000 копий ВСМА hSG16.17-SEA демонстрирует значительную противоопухолевую активность. Дегликозилированное антитело SEA ВСМА, которое не связывает FcγRII или FcγRIII, не проявляет активности, сходной с несвязывающим контролем h00 SEA. Это свидетельствует о важности Fc-опосредованной активности в этой модели.

**[00195]** На Фиг. 25. Антитело SG16.17 SEA демонстрирует улучшенную активность ADCC на целевых клетках MM1R по сравнению

с антителом ДТ *in vitro*. Клетки NK были выделены из МКПК (мононуклеарных клеток периферической крови) с помощью негативного отбора с применением набора для обогащения NK EasySep Human, и полученные клетки CD16+ были количественно определены. Целевые клетки ADCC MM1R множественной миеломы были помечены хромом-51 в течение 1-го часа. В аналитический планшет добавляли серию разбавлений антител, а затем целевые клетки (Т) и эффекторные клетки NK (Е) в соотношении 13:1 Е:Т. Лизис рассчитывали на основе общего контроля и контроля спонтанного высвобождения через 4 часа при 37 ° С. Эти данные показывают значительное улучшение активности ADCC афукозилированного антитела SEA SG16.17 по сравнению с антителом ДТ, а также клиническими антителами, даратумумаб и элотузумаб.

Несмотря на то, что изобретение было подробно описано для ясности понимания, некоторые модификации могут быть реализованы в рамках прилагаемой формулы изобретения. Все публикации, включая номера доступа, веб-сайты и тому подобное, а также патентные документы, приведенные в данной заявке, включены в настоящий документ в качестве ссылки во всей их полноте для всех целей в той же степени, как если бы каждый из них был обозначен отдельно. В случае разных версий последовательностей, в документе может находиться ссылка на веб-сайт или другая ссылка, но считается корректной версия со ссылкой на действительную дату подачи. Действительная дата подачи означает самую раннюю дату приоритета, в которой раскрывается номер доступа. Если иное не очевидно из контекста, любой элемент, вариант осуществления, стадия, признак или аспект изобретения могут быть осуществлены в сочетании с любым другим.

1. Гуманизированное, химерное или венерованное антитело, которое представляет собой гуманизованную, химерную или венерованную форму антитела, депонированного как АТСС РТС-6937.

2. Антитело по п.1, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90%

идентична последовательности hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19).

3. Антитело по п.2, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19).

4. Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19) при условии, что положение H58 может быть занято N или K, положение H60 может быть занято A или N, положение H61 может быть занято Q или E, положение H62 может быть занято K или N, положение H64 может быть занято Q или K, положение H65 может быть занято G или T, положение L24 может быть занято R или L и положение L53 может быть занято S или R.

5. Антитело по любому из предыдущих пунктов, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19).

6. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что положения H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно, а положения L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно.

7. Антитело по п. 1, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19).

8. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

9. Антитело по п.6, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму природной константной области человека с ослабленным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью человека.

10. Антитело по п. 8 или 9, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1.

11. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:5, а константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:3.

12. Антитело по п. 8, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:7 (S239C), а константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:3.

13. Антитело по любому из предыдущих пунктов, которое представляет собой "голое" антитело.

14. Антитело по любому из пп. 1-12, отличающееся тем, что антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

15. Антитело по п. 14, отличающееся тем, что антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом.

16. Антитело по п. 15, отличающееся тем, что цитотоксический агент конъюгирован с антителом через линкер, расщепляемый ферментом.

17. Антитело по п. 15 или 16, отличающееся тем, что цитотоксический агент представляет собой агент, связывающийся в малой борозде ДНК.

18. Антитело по п.17, отличающееся тем, что цитотоксический агент имеет формулу

19. Антитело по п. 15 или 16, отличающееся тем, что цитотоксический агент представляет собой MMAE или MMAF.

20. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемый носитель.

21. Способ лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием или злокачественным новообразованием с экспрессией ВСМА, включающий введение пациенту антитела по любому из предыдущих пунктов по эффективной схеме лечения.

22. Способ по п.20, отличающийся тем, что злокачественным

новообразованием является гематологическая злокачественная опухоль.

23. Способ по п. 22, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелому, лейкоз и лимфому.

24. Способ по п. 22, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

25. Способ по п. 22, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ) или лимфому Ходжкина.

26. Способ по п. 22, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС), макроглобулинемию Вальденстрема или лимфому Беркитта.

27. Способ лечения пациента, страдающего иммунологическим нарушением или с риском развития иммунологического нарушения, опосредованного иммунными клетками, экспрессирующими ВСМА, включающий введение пациенту гуманизированного антитела по любому из предыдущих пунктов по эффективной схеме лечения.

28. Способ по п.27, отличающийся тем, что представляет собой опосредуемое В-клетками нарушение.

29. Способ по п. 27, отличающийся тем, что иммунологическое нарушение представляет собой ревматоидный артрит, системную волчанку E (SLE), диабет типа I, астму, atopический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина".

30. Гуманизированное, химерное или венерованное антитело, которое представляет собой гуманизированную, химерную или венерованную форму антитела SG16.45 крысы со зрелым варибельным участком тяжелой цепи SEQ ID NO:23 и зрелым варибельным участком легкой цепи SEQ ID NO:33.

31. Антитело по п. 30, содержащее зрелую варибельную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична

последовательности VH5 hSG16.45 (SEQ ID NO:31), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности VK2 hSG16.45 (SEQ ID NO:36).

32. Антитело по п.31, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности VH5 hSG16.45 (SEQ ID NO:31), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности VK2 hSG16.45 (SEQ ID NO:36).

33. Антитело по любому из пп.30-32, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) из VH5 hSG16.45 (SEQ ID NO:31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) из VK2 hSG16.45 (SEQ ID NO:36) при условии, что положение H50 может быть занято A или S, положение L24 может быть занято R или L и положение L26 может быть занято S или T.

34. Антитело по любому из пп. 30-33, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:152-154) из VH5 hSG16.45 (SEQ ID NO:31) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:179-181) из VK2 hSG16.45 (SEQ ID NO:36).

35. Антитело по любому из пп. 30-34, отличающееся тем, что положения H30, H93 и H94 заняты N, T и S, соответственно.

36. Антитело по п. 30, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность VH5 hSG16.45 (SEQ ID NO:31), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность VK2 hSG16.45 (SEQ ID NO:36) или зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность VH1 hSG16.45 (SEQ ID NO:27), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность VK1 hSG16.45 (SEQ ID NO:35), или зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность VH1 hSG16.45 (SEQ ID NO:27), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность VK3 hSG16.45 (SEQ ID NO:37).

37. Антитело по любому из пп.30-36, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

38. Антитело по п.37, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой мутантную форму

природной константной области человека с ослабленным связыванием с рецептором Fcγ по сравнению с природной константной областью человека.

39. Антитело по п.37 или 38, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи представляет собой изотип IgG1.

40. Антитело по п.37, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:5, а константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:3.

41. Антитело по п.37, отличающееся тем, что константная область тяжелой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:7 (S239C), а константная область легкой цепи имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO:3.

42. Антитело по любому из пп.30-41, которое представляет собой "голое" антитело.

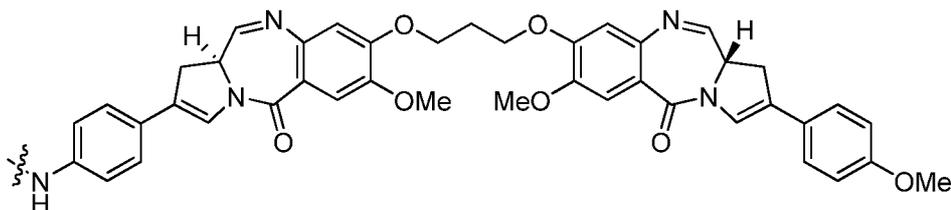
43. Антитело по любому из пп.30-41, отличающееся тем, что антитело конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

44. Антитело по п.43, отличающееся тем, что антитело конъюгировано с цитотоксическим агентом.

45. Антитело по п.44, отличающееся тем, что цитотоксический агент конъюгирован с антителом через линкер, расщепляемый ферментом.

46. Антитело по п.43 или 44, отличающееся тем, что цитотоксический агент представляет собой агент, связывающийся в малой борозде ДНК.

47. Антитело по п.46, отличающееся тем, что цитотоксический агент имеет формулу



48. Антитело по п.44 или 45, отличающееся тем, что цитотоксический агент представляет собой MMAE или MMAF.

49. Антитело по любому из предыдущих пунктов, отличающееся тем, что менее 5% N-гликозид-связанных сахарных цепей в остатке asn в положении 297 по EU константной области тяжелой цепи включают фукозу или ее аналог, в котором клетки, экспрессирующие антитело, культивировали для снижения фукозилирования антитела.

50. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.30-48 и фармацевтически приемлемый носитель.

51. Способ лечения пациента, страдающего злокачественным новообразованием или злокачественным новообразованием с экспрессией ВСМА, включающий введение пациенту гуманизованного антитела по любому из пп.30-49 по эффективной схеме лечения.

52. Способ по п.51, отличающийся тем, что злокачественным новообразованием является гематологическая злокачественная опухоль.

53. Способ по п.52, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелому, лейкоз и лимфому.

54. Способ по п.52, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой множественную миелому.

55. Способ по п.52, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой неходжкинскую лимфому (НХЛ) или лимфому Ходжкина.

56. Способ по п.52, отличающийся тем, что гематологическая злокачественная опухоль представляет собой миелодиспластические синдромы (МДС), миелопролиферативные синдромы (МПС), макроглобулинемию Вальденстрема или лимфому Беркитта.

57. Способ лечения пациента, страдающего иммунологическим нарушением или с риском развития иммунологического нарушения, опосредованного иммунными клетками, экспрессирующими ВСМА, включающий введение пациенту антитела по любому из предыдущих пунктов по эффективной схеме лечения.

58. Способ по п.56, отличающийся тем, что иммунологическое нарушение представляет собой опосредуемое В-клетками нарушение.

59. Способ по п.56, отличающийся тем, что иммунологическое нарушение представляет собой ревматоидный артрит, системную

волчанку E (SLE), диабет типа I, астму, атопический дерматит, аллергический ринит, тромбоцитопеническую пурпуру, рассеянный склероз, псориаз, синдром Шегрена, тиреоидит Хашимото, болезнь Грейвса, первичный билиарный цирроз, гранулематоз Вегенера, туберкулез и реакцию "трансплантант против хозяина".

60. Гуманизированное антитело, которое специфически связывается с белком ВСМА человека, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 90% идентична последовательности hSG16.17 VK2 (SEQ ID NO:19).

61. Антитело по п.60, содержащее зрелую переменную область тяжелой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13), и зрелую переменную область легкой цепи, которая по меньшей мере на 95% идентична последовательности VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19).

62. Антитело по п.60, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19) при условии, что положение H58 может быть занято N или K, положение H60 может быть занято A или N, положение H61 может быть занято Q или E, положение H62 может быть занято K или N, положение H64 может быть занято Q или K, положение H65 может быть занято G или T, положение L24 может быть занято R или L и положение L53 может быть занято S или R.

63. Антитело по п.60, содержащее три CDR по Кабат (SEQ ID NO:60-62) из VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13) и три CDR по Кабат (SEQ ID NO:90-92) из VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19).

64. Антитело по п.60, отличающееся тем, что положения H20, H48, H69, H71, H73, H76, H80, H88, H91 и H93 заняты L, I, M, A, K, N, V, A, F и T, соответственно, а положения L46, L48 и L87 заняты V, V и F, соответственно.

65. Антитело по п.60, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность VH3 hSG16.17 (SEQ ID NO:13), а зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность VK2 hSG16.17 (SEQ ID NO:19).

66. Антитело по п.60, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

67. Антитело по п.65, отличающееся тем, что зрелая переменная область тяжелой цепи слита с константной областью тяжелой цепи, а зрелая переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.

68. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из п.67 и фармацевтически приемлемый носитель.

69. Фармацевтическая композиция по п. 68, отличающаяся тем, что менее около 10% антител фукозилированы в коре фукозой или аналогом фукозы.

70. Фармацевтическая композиция по п.68, отличающаяся тем, что менее чем около 5% антител фукозилированы в коре фукозой или аналогом фукозы.

71. Фармацевтическая композиция по п.69, отличающаяся тем, что около 2% антител фукозилированы в коре фукозой или аналогом фукозы.

## ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное, химерное или венерованное антитело, которое представляет собой гуманизированную, химерную или венерованную форму крысиного антитела SG16.45, имеющее зрелую переменную область тяжелой цепи SEQ ID NO: 23 и зрелую переменную область легкой цепи SEQ ID NO: 33.

2. Антитело по п. 1, где

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH5 (SEQ ID NO: 31) и зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK2 (SEQ ID NO: 36) или

зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH1 (SEQ ID NO: 27) и зрелая переменная область легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK1 (SEQ ID NO: 35) или

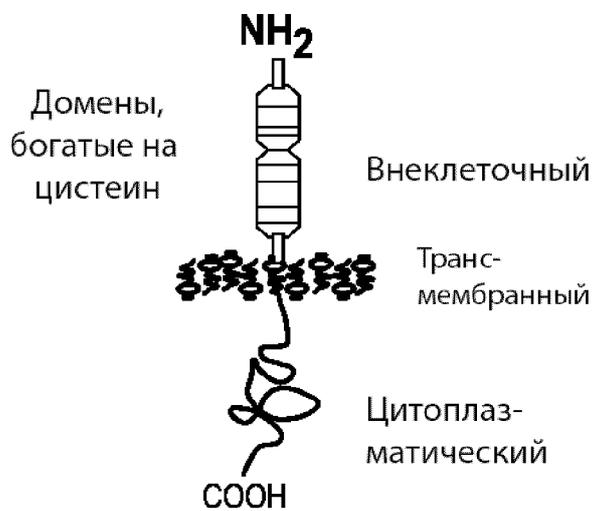
зрелая переменная область тяжелой цепи имеет последовательность hSG16.45 VH1 (SEQ ID NO: 27) и переменная область зрелой легкой цепи имеет последовательность hSG16.45 VK3 (SEQ ID NO: 37).

3. Антитело по п.1 или 2, в котором менее 5% N-гликозидных связанных сахарных цепей по остатку Asn в EU-положении 297 константной области тяжелой цепи включают фукозу или ее аналог, в котором культивировали клетки, экспрессирующие антитело для уменьшения фукозилирования антитела.

4. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-3 и фармацевтически приемлемый носитель.

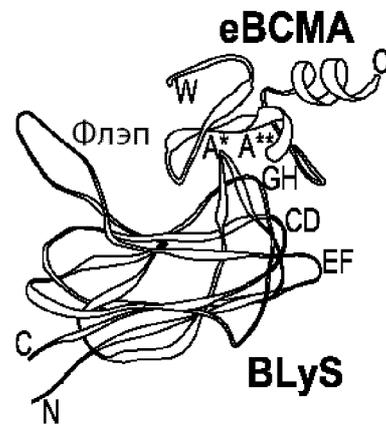
5. Способ лечения пациента, страдающего или подверженного риску развития рака, экспрессирующего ВСМА, включающий введение пациенту эффективного режима гуманизированного антитела по любому из пп.1-3.

По доверенности



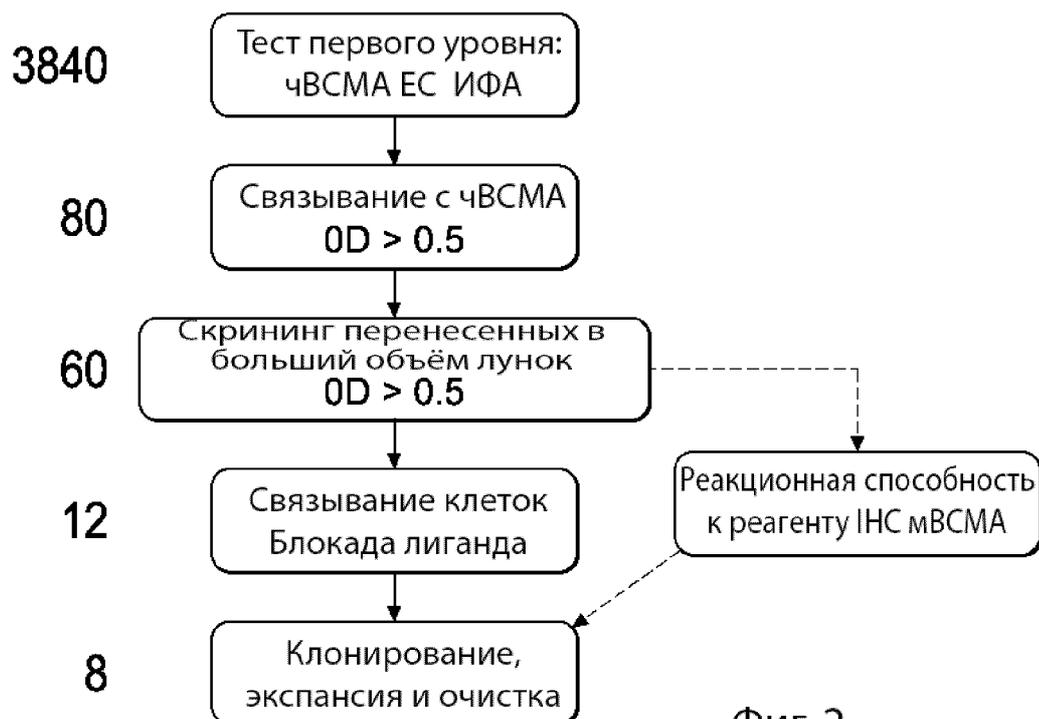
Jelinek и Darce (2005) *Curr Dir Autoimmun.* Basel, Karger 8: 266-288

Фиг. 1А



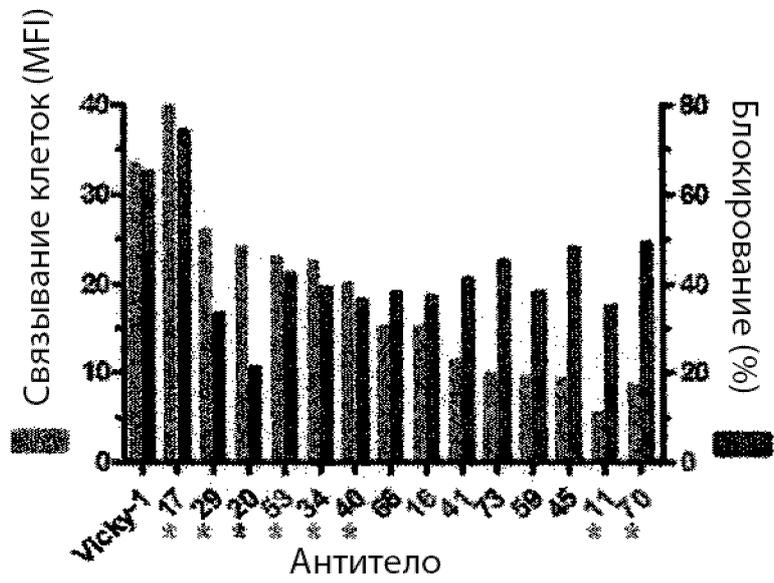
Wallweber (2004) *J Mol Biol* 343: 283-290

Фиг. 1В

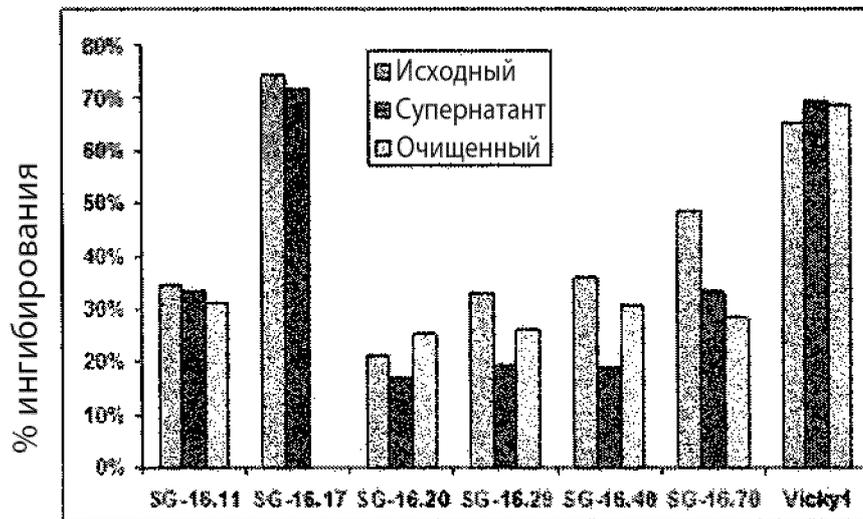


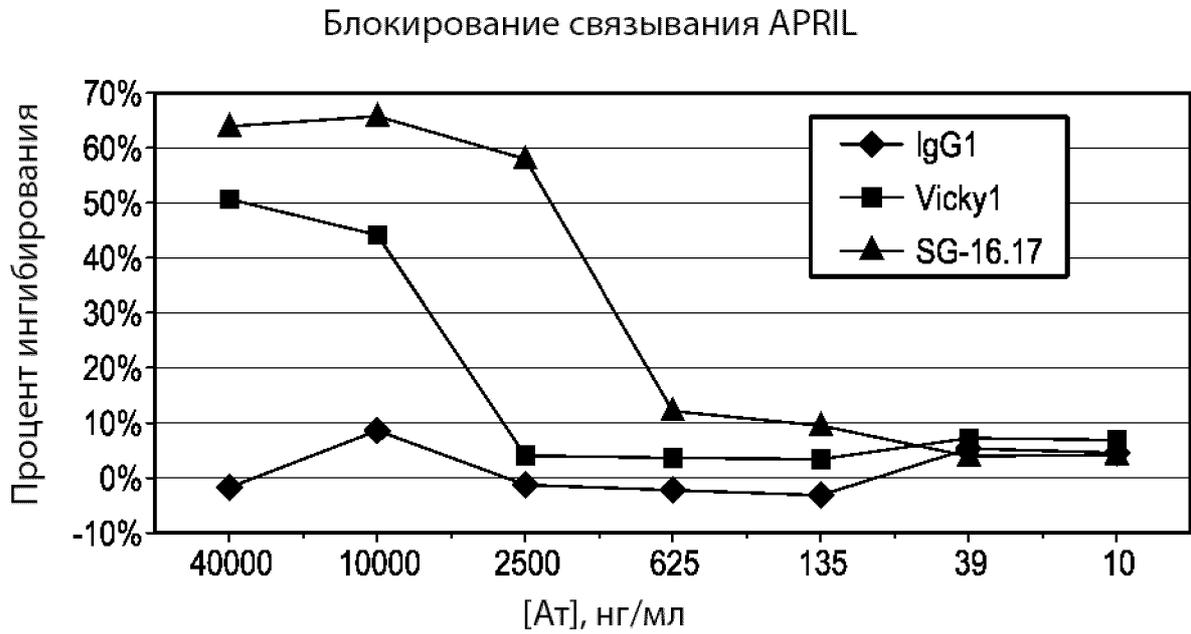
Фиг. 2

Фиг. 3

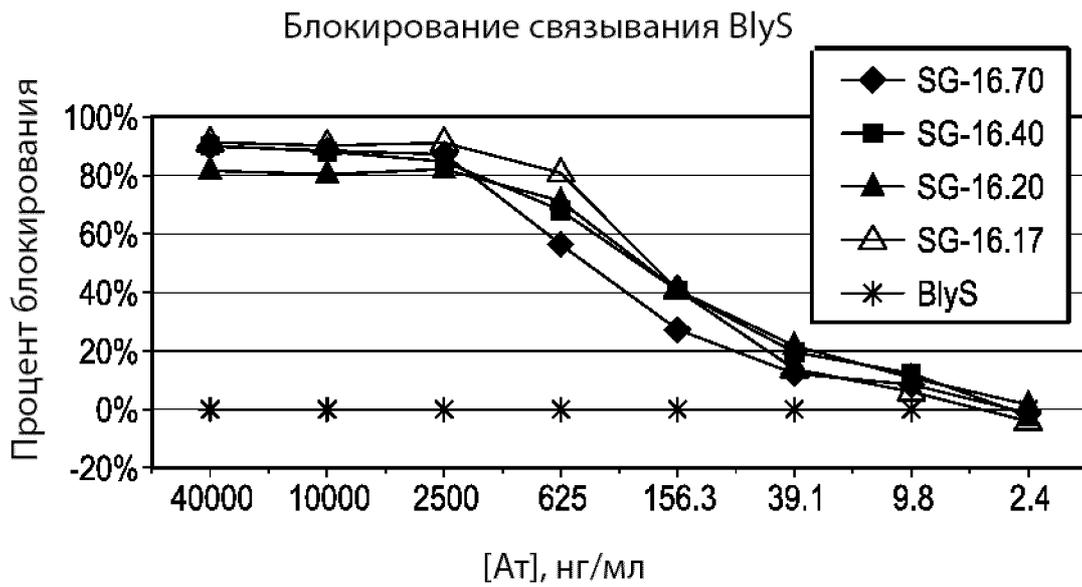


Фиг. 4





Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 9: Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.17

```

          10      20      30      40      50
hSG16.17 VH1  QVQLVQSRAEVKKPGASVKLSCKASGYTFTDYIHWVRQAPGQGLEWIGYINPNSGYTKY
hSG16.17 VH2  .....G.....M.....R.....N.
hSG16.17 VH3  .....G.....N.
hSG16.17 VH4  .....G.....V.....M.....R.....N.
hSG16.17 VH5  .....G.....V.....
hSG16.17 VH6  .....M.....I.....S.
CDR Кабата
IMGT CDRs          ++++++          ++++++

          60      70      80      90      100     110
hSG16.17 VH1  NENFKTRATMTADKSIINTAYVELSRLRSDDTAVYFCTRYMWERVTGFFDFWQQTMTVTVSS
hSG16.17 VH2  AQR.QG.V.....
hSG16.17 VH3  AQR.QG.....
hSG16.17 VH4  AQR.QG.....
hSG16.17 VH5  .....T.....S...E.....
hSG16.17 VH6  AQR.QG.V.....T.....S...E.....
CDR Кабата
IMGT CDRs          *****          ++++++

```

Фиг. 10: Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17 с акцепторной последовательностью VK человека; KV1-12/KJ5

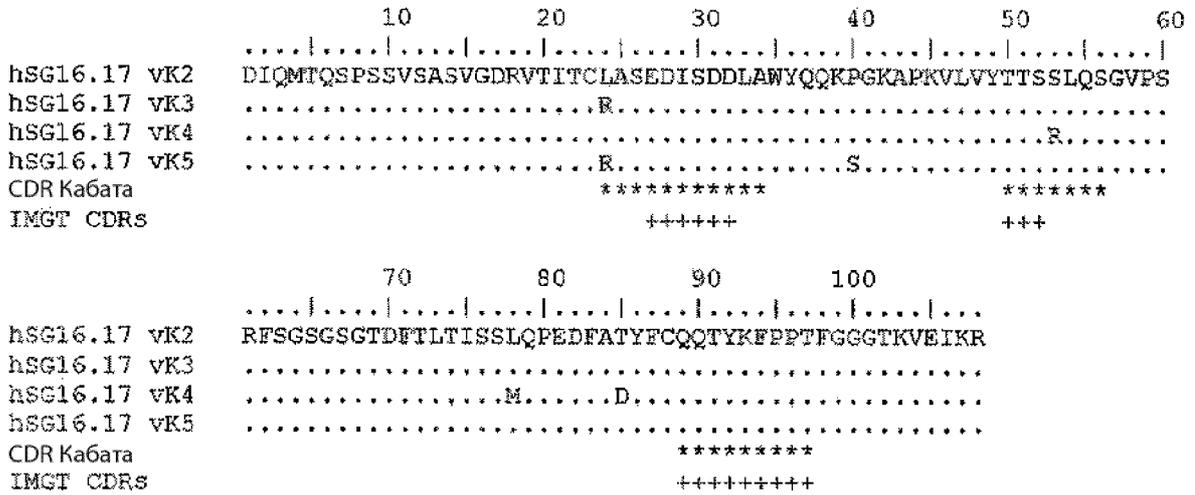
```

          10      20      30      40      50      60
Крысиное hSG16.17 VK  .....A.L...L.E.T.S.E.L...E.D...D.D.....S...S.QV.V.TT.R...D...
Чел. KV1-12/KJ5      DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGISWLAWYQQKPKAPKLLIYAASLQSGVPS
hSG16.17 VK2        .....L...E.D...D.D.....V.V.TT.....
hSG16.17 VK3        .....L...E.D...D.D.....V.V.TT.....
hSG16.17 VK4        .....L...E.D...D.D.....V.V.TT.R.....
hSG16.17 VK5        .....L...E.D...D.D.....S...V.V.TT.....
CDR Кабата
IMGT CDRs          *****          ++++++          ++++++

          70      80      90      100
Крысиное hSG16.17 VK  .....R.S.K.IVM...E.D.F.QQTYKFPPT...A...RLDL...
Чел. KV1-12/KJ5      RFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC-----FGGSKVEIKR
hSG16.17 VK2        .....F.QQTYKFPPT.....
hSG16.17 VK3        .....F.QQTYKFPPT.....
hSG16.17 VK4        .....M...D.F.QQTYKFPPT.....
hSG16.17 VK5        .....F.QQTYKFPPT.....
CDR Кабата
IMGT CDRs          *****          ++++++

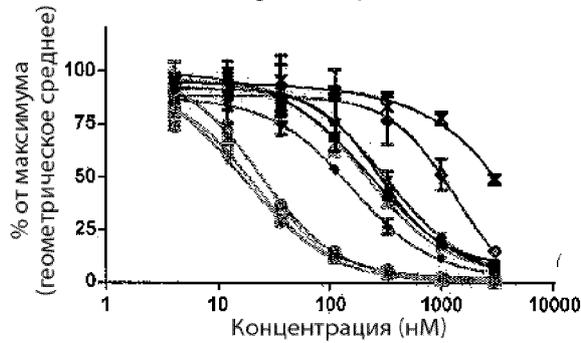
```

Фиг. 11: Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.17



Фиг. 12

Конкурентное связывание ДТ, SEA и G1v1 на трансфицированных чCD16 (FcγRIIIa) CHO клетках h00-AF488 @ 25 нМ; 1/2/23/15 GL/LW



- |            |              |                  |                 |
|------------|--------------|------------------|-----------------|
| h00 G1 ДТ  | сОКТ9 G1 ДТ  | Ритуксимаб G1 ДТ | сSG16.17 G1 ДТ  |
| h00 G1v1   | сОКТ9 G1 SEA | Ритуксимаб G1v1  | сSG16.17 G1 SEA |
| h00 G1 SEA |              |                  | сSG16.45 G1 ДТ  |
|            |              |                  | сSG16.45 G1 SEA |



Фиг. 15: Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью HV человека; HV3-74/HJ3

```

          10         20         30         40         50
Крысиное SG16.45 vH .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Чел. HV3-74/HJ3 .....R..K..V.....NDH..T.I.....R..E..I..S..TNT.GA.Y.
hSG16.45 vH5 .....R..K..V.....NDH..T.....S..TNT.GA.Y.
CDR Кабата .....*****
IMGT CDRs .....+++++++

          60         70         80         90         101        110
Крысиное SG16.45 vH |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Чел. HV3-74/HJ3 L.....S.....S...T...TSPGLYFDY...V.....
hSG16.45 vH5 ADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR-----WGQGTMTVTVSS
CDR Кабата .....*****
IMGT CDRs .....+++++++

```

Фиг. 16: Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью HV человека; HV3-9/HJ3

```

          10         20         30         40         50
Крысиное SG16.45 vH .....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Чел. HV3-9/HJ3 .....R..A.....D.YA.H.V.....K....V.G..SWNS.SIG.
hSG16.45 vH6 .....R..A.....V.....K....V.G.....
CDR Кабата .....*****
IMGT CDRs .....+++++++

          60         70         80         90         101        110
Крысиное SG16.45 vH |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
Чел. HV3-9/HJ3 LDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNLSRSEDATATYYCTSPGLYFDYWGQGTMTVTVSS
hSG16.45 vH6 A.....NS.....A...L...AK-----...T.....
CDR Кабата .....*****
IMGT CDRs .....+++++++

```

Фиг. 17: Выравнивание вариантов тяжелой цепи hSG16.45

```

          10      20      30      40      50
hSG16.45 vH1  EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFNDHWMTWIRQAPGKGLEWISSITNTGGATYY
hSG16.45 vH2  .....A.....
hSG16.45 vH3  .....A.....
hSG16.45 vH4  .....V.....
hSG16.45 vH5  ...V.....V.....V.V.....
hSG16.45 vH6  ...V.....R.....V.....V.G.....
CDR Кабата          *****
IMGT CDRs          ++++++++

          60      70      80      90     101     110
hSG16.45 vH1  LDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSPGLYFDYWGGQVMVTVSS
hSG16.45 vH2  A.....
hSG16.45 vH3  A.....S.....
hSG16.45 vH4  A.....S.....T.....
hSG16.45 vH5  A.....A.....T.....
hSG16.45 vH6  A.....A.....S.....L.....T.....
CDR Кабата          *****
IMGT CDRs          ++++++++

```

Фиг. 18: Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.45 с акцепторной последовательностью KV человека; KV3-20/KJ2

```

          10      20      30      40      50
Крысиное SG16.45 vK  .....T.TAA...KV.IT.L.TS...VM.--...H.S.AS.K...ST..L.S.V.
Чел. KV3-20/KJ2    EIYLTQSPGTLTSLSPGERATLSCRASQVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIP
hSG16.45 vK1      .....A...V.I...S...VM.--...H.....ST..L.S.V.
hSG16.45 vK2      .....S...VM.--...ST..L.S...
hSG16.45 vK3      .....I...S...VM.--...H.....ST..L.S.V.
hSG16.45 vK5      .....L.TS...VM.--...H.....ST..L.S...
CDR Кабата          *****
IMGT CDRs          ++++++++

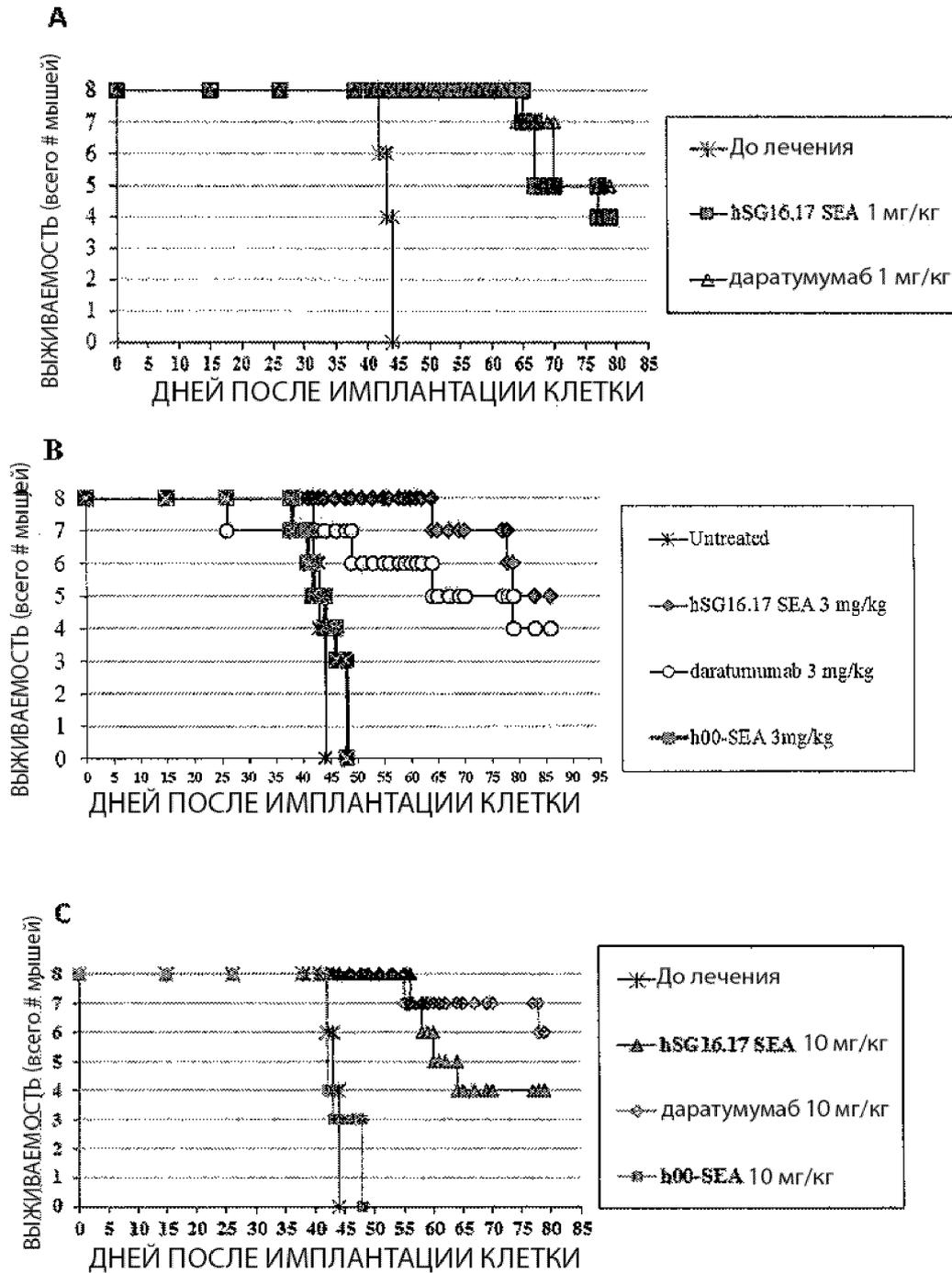
          70      80      90     100
Крысиное SG16.45 vK  .....SYS...NTM.A..A.T...HQWSSDPPT..S.....
Чел. KV3-20/KJ2    DRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC-----FGQGTKLEIKR
hSG16.45 vK1      .....Y...M.....HQWSSDPPT.....
hSG16.45 vK2      .....HQWSSDPPT.....
hSG16.45 vK3      .....Y.....HQWSSDPPT.....
hSG16.45 vK5      .....Y.....HQWSSDPPT.....
CDR Кабата          *****
IMGT CDRs          ++++++++

```

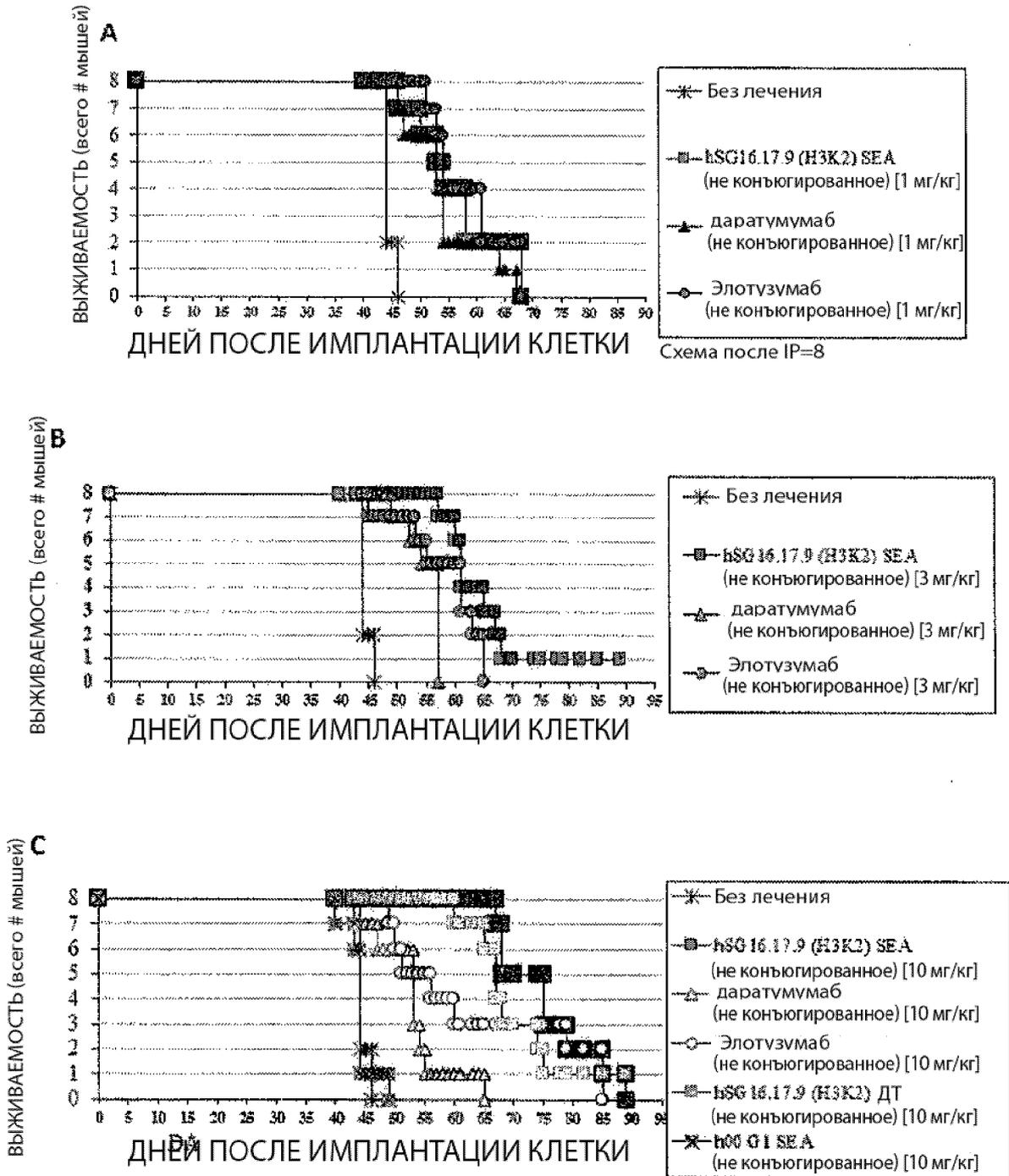
Фиг. 19: Выравнивание вариантов легкой цепи hSG16.45

		10	20	30	40	50	60
hSG16.45 vK1	EIVLTQSPGTL	SASPGERVTIS	CRASSSVSVMY	WYQHKPGQAPR	LLIYSTSSLAS	GPDR	
hSG16.45 vK2		L	A	L	Q	I	
hSG16.45 vK3		L	A				
hSG16.45 vK5		L	A	L	L	T	I
CDR Кабара			*****			*****	
IMGT CDRs			+++++++			+++	
		70	80	90	100		
hSG16.45 vK1	FSGSGSGTDY	TLTISRMBPE	DFAVYYCHQW	SSDPPTFGQG	TLEIKR		
hSG16.45 vK2		F	L				
hSG16.45 vK3			L				
hSG16.45 vK5			L				
CDR Кабара			*****				
IMGT CDRs			+++++++				

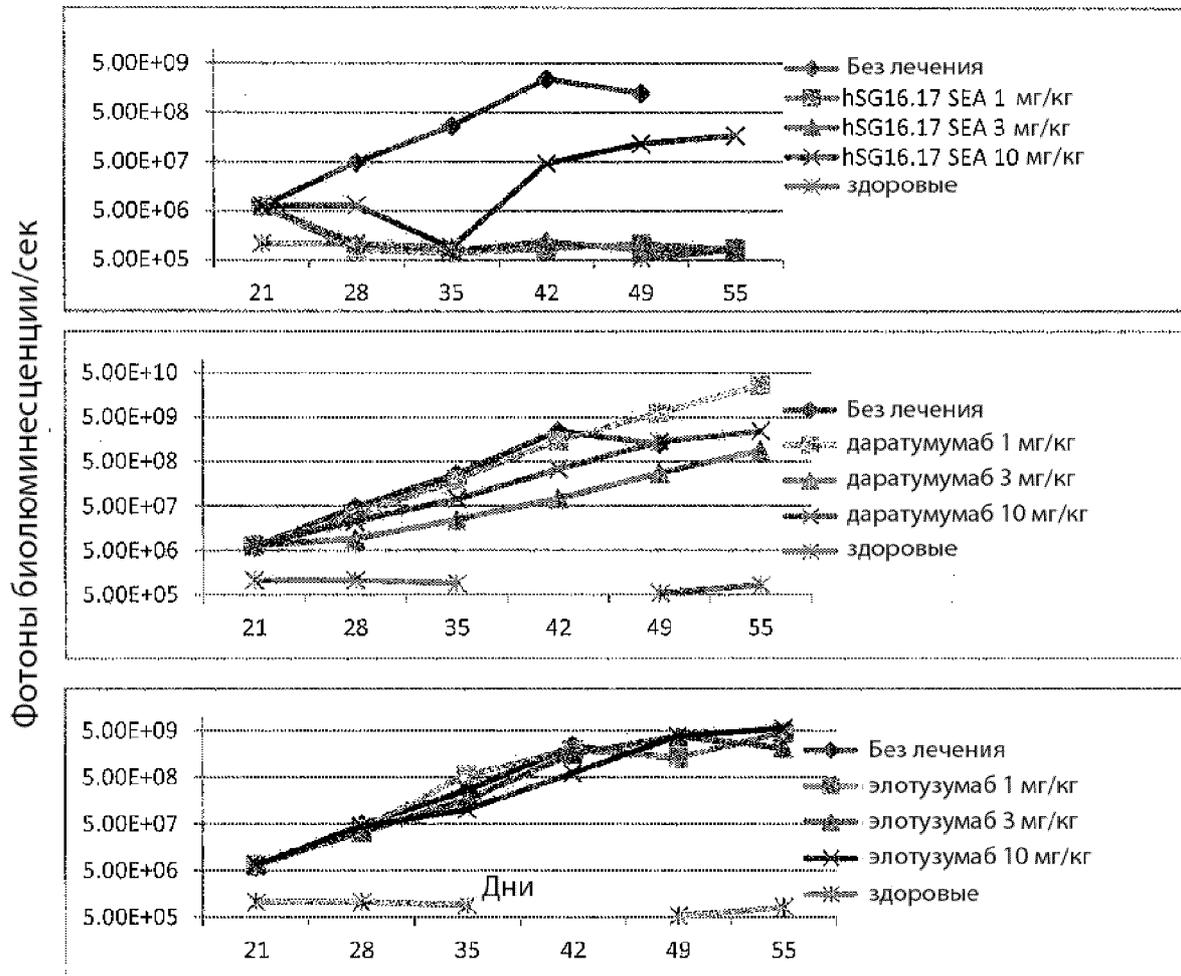
Фиг. 20: Активность in vivo мультидозированного чSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MM1S у мышей SCID.



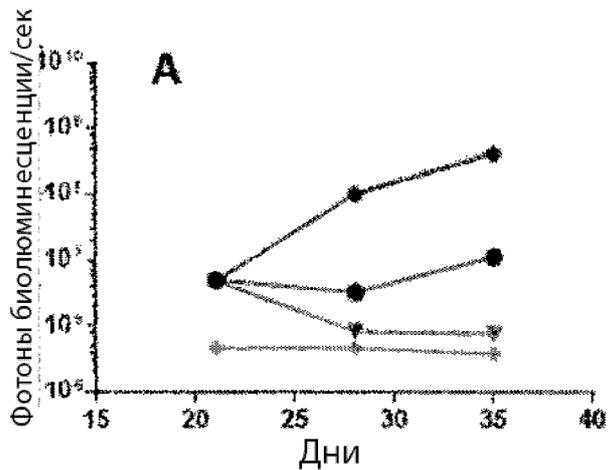
Фиг. 21. Активность in vivo однократного дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли EJM у мышей NSG.



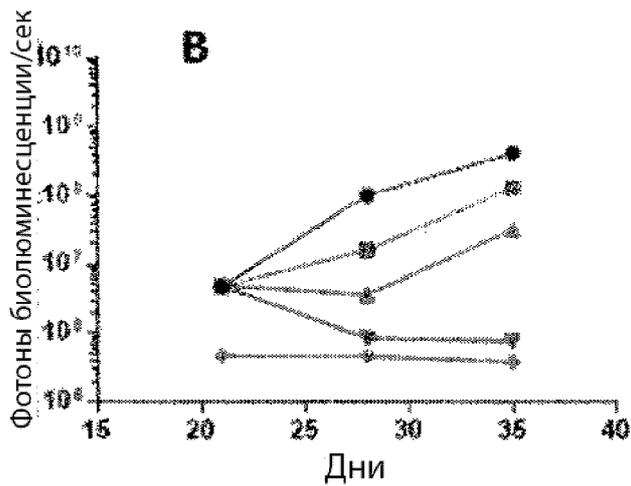
Фиг. 22. Активность *in vivo* мультидозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG



Фиг. 23. Активность *in vivo* однократно дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли NCI-H929-люцифераза у мышей NSG

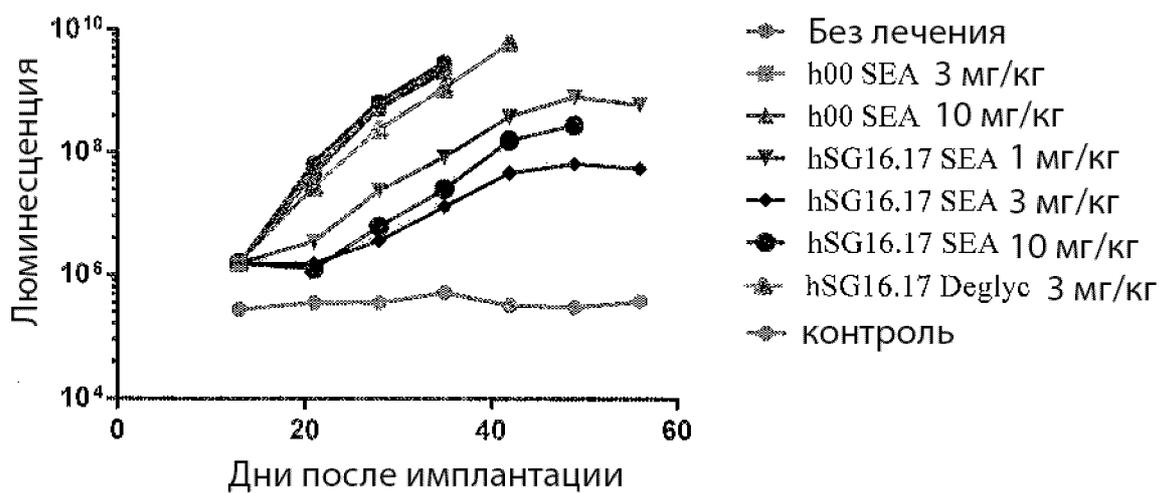


- Без лечения
- ▲ hSG16.17.9 (H3K2) SEA (не конъюгированное) [3 мг/кг]
- hSG16.17 (H3K2) ДТ (не конъюгированное) [3 мг/кг]
- ▲ hSG G1 SEA (не конъюгированное) [3 мг/кг]
- ◆ здоровый контроль n=3

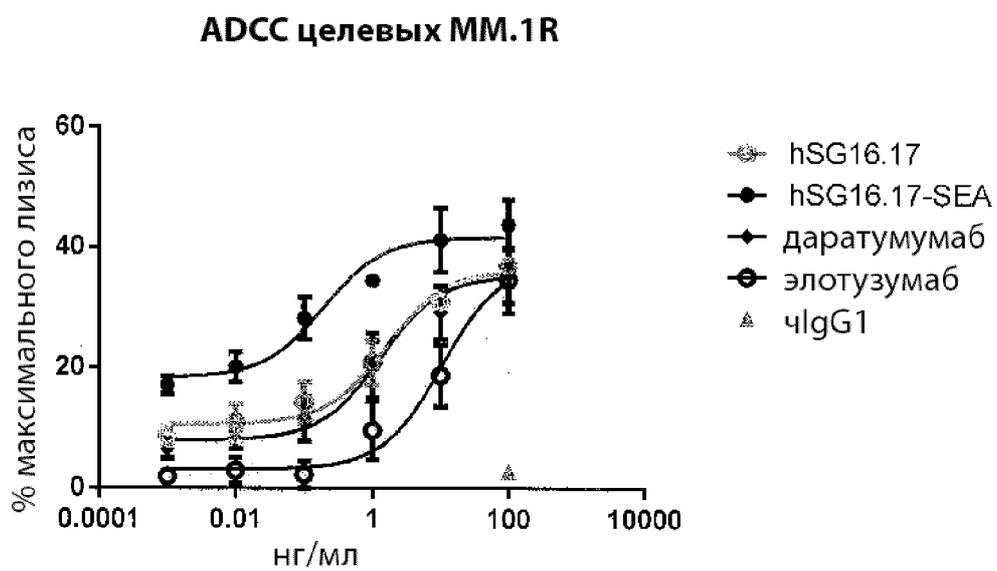


- Без лечения
- ▲ hSG16.17.9 (H3K2) SEA (не конъюгированное) [0,3 мг/кг]
- ▲ hSG16.17.9 (H3K2) SEA ДТ (не конъюгированное) [1 мг/кг]
- ▲ hSG16.17.9 (H3K2) SEA (не конъюгированное) [3 мг/кг]
- ◆ здоровый контроль n=3

Фиг. 24. Активность *in vivo* однократно дозированного hSG16.17-SEA в модели диссеминированной опухоли MOLP-8-люцифераза у мышей SCID.



Фиг. 25. Антитело SG16.17 SEA демонстрирует улучшенную ADCC активность на целевых клетках MM1R



## PATENT COOPERATION TREATY

## PCT

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 0269-00212PC	<b>FOR FURTHER ACTION</b> see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US2017/018177	International filing date ( <i>day/month/year</i> ) 16 February 2017	(Earliest) Priority Date ( <i>day/month/year</i> ) 17 February 2016
Applicant SEATTLE GENETICS, INC.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 4 sheets.

It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

## 1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

the international application in the language in which it was filed.

a translation of the international application into \_\_\_\_\_ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b.  This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2.  Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3.  Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

the text is approved as submitted by the applicant.

the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 23A

as suggested by the applicant.

as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.

as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.

b.  none of the figures is to be published with the abstract.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/018177

## Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a.  forming part of the international application as filed:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.  
 on paper or in the form of an image file.
- b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:  
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).  
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:  
SEQ ID NOs:3, 5, 7, 13, 19, 23, 27, 31, 33, 35, 36, and 37 were searched.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/018177

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
  
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
  
3.  Claims Nos.: 5, 6, 8-29, 34, 35, 37-59  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- No protest accompanied the payment of additional search fees.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2017/018177

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8) - A61K 39/395; A61K 45/06; C07K 16/28; C07K 16/30 (2017.01) CPC - A61K 39/39558; A61K 45/06; A61K 2039/505; C07K 16/2809; C07K 16/2878; C07K 16/3061; C07K 2317/21; C07K 2317/31; C07K 2317/33; C07K 2317/34; C07K 2317/515; C07K 2317/565; C07K 2317/76; C07K 2317/92 (2017.02)		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) See Search History document		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/130.1; 424/131.1; 424/133.1; 424/139.1; 435/328; 435/331; 530/387.1; 530/387.3; 536/23.53 (keyword delimited)		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) See Search History document		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2010/104949 A2 (BIOGEN IDEC MA INC. et al) 16 September 2010 (16.09.2010) entire document	1-4, 7, 30-33, 36, 60-71
A	WO 2015/158671 A1 (CELLECTIS) 22 October 2015 (22.10.2015) entire document	1-4, 7, 30-33, 36, 60-71
A	RYAN et al. "Antibody targeting of B-cell maturation antigen on malignant plasma cells," Molecular Cancer Therapeutics, 19 November 2007 (19.11.2007), Vol. 6, Iss 11, Pgs. 3009-3018. entire document	1-4, 7, 30-33, 36, 60-71
A	WO 2012/163805 A1 (GLAXO GROUP LIMITED et al) 06 December 2012 (06.12.2012) entire document	1-4, 7, 30-33, 36, 60-71
A	TAI et al. "Targeting B-cell maturation antigen in multiple myeloma," Immunotherapy, 15 September 2015 (15.09.2015), Vol. 7, No. 11, Pgs. 1187-1199. entire document	1-4, 7, 30-33, 36, 60-71
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 April 2017	Date of mailing of the international search report <b>08 MAY 2017</b>	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300	Authorized officer <b>Blaine R. Copenheaver</b> PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774	