

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392149** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2023.09.26

(51) Int. Cl. *C07K 16/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.01.28

(54) **МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА РАКА ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ
АНТИТЕЛА К MCL1**

(31) **63/143,682**

(32) **2021.01.29**

(33) **US**

(86) **PCT/US2022/014401**

(87) **WO 2022/165240 2022.08.04**

(71) Заявитель:
ЭМДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:

**Келчевска Агнешка, Чан Брайан,
Бойл Майкл К. (US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) В настоящем изобретении представлены антитела к Mcl-1 в любой форме и их фрагменты, которые связывают антиген с неожиданно высоким связыванием с Mcl-1, что обеспечивает инструменты, применяемые в способах мониторинга раковых клеток, экспрессирующих Mcl-1, и способах лечения видов рака, в частности, видов гемопоэтического рака, предусматривающих такие раковые клетки.

202392149
A1

202392149

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578327EA/022

МАТЕРИАЛЫ И СПОСОБЫ ДЛЯ МОНИТОРИНГА РАКА ПУТЕМ ВВЕДЕНИЯ АНТИТЕЛА К MCL1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

[1] Настоящая заявка испрашивает преимущество приоритета согласно §119(e) раздела 35 U.S.C. по предварительной заявке на патент США № 63/143682, поданной 29 января 2021 года, которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

Включение посредством ссылки материала, поданного в электронном виде

[2] Перечень последовательностей, который представляет собой часть настоящего изобретения, подается одновременно с описанием в виде текстового файла. Название текстового файла, содержащего перечень последовательностей, который был создан 28 января 2022 года и размер которого составляет 16178 байтов, представляет собой "55149_Seqlisting.txt". Содержание перечня последовательностей включено в данный документ посредством ссылки в полном объеме.

Область изобретения

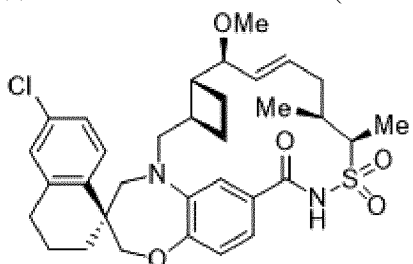
[3] В настоящем изобретении предусмотрены материалы и способы, относящиеся к мониторингу средств для иммунотерапии и, в частности, к мониторингу средств для иммунотерапии рака.

Предпосылки изобретения

[4] Сверхэкспрессия индуцированного белка 1 (Mcl-1) миелоидного лейкоза является общей характерной чертой рака человека. Сверхэкспрессия Mcl-1 предотвращает подвергание раковых клеток запрограммированной гибели клеток (апоптозу), позволяя клеткам выживать, несмотря на обширные генетические повреждения. Mcl-1 является представителем семейства белков Bcl-2. Семейство Bcl-2 включает проапоптотические представители (такие как BAX и BAK), которые при активации образуют гомоолигомер во внешней митохондриальной мембране, что приводит к образованию пор и выходу содержимого митохондрий, что является стадией при запуске апоптоза. Антиапоптотические представители семейства Bcl-2 (такие как Bcl-2, Bcl-XL и Mcl-1) блокируют активность BAX и BAK. Другие белки (такие как BID, BIM, BIK и BAD) проявляют дополнительные регуляторные функции.

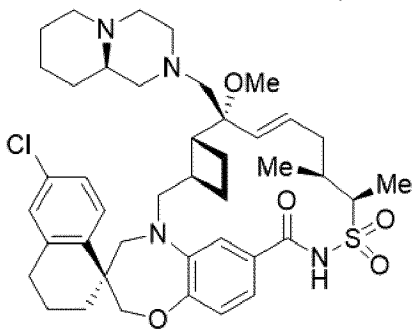
[5] Исследование показало, что ингибиторы Mcl-1 могут быть применимыми для лечения видов рака. Mcl-1 сверхэкспрессируется при многочисленных видах рака. См. Beroukhi et al., *Nature* 463:899-890 (2010). Раковые клетки, содержащие амплификации, окружающие антиапоптотические гены Mcl-1 и Bcl-2-1-1, зависят от экспрессии этих генов в отношении выживания. Beroukhi et al. Mcl-1 представляет собой надлежащую мишень для повторной инициации апоптоза в многочисленных раковых клетках. См. Lessene et al., *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 7:989-1000 (2008); Akgul, *Cell. Mol. Life Sci.* 66 (2009); и Mandelin et al., *Expert Opin. Ther. Targets* 11:363-373 (2007).

[6] Известно, что иммунная система позвоночных способна вырабатывать иммунный ответ, характеризующийся выработкой антитела, которое специфически связывает или распознает конкретный антиген. Разработка моноклональных антител и пролиферация форм антител привели к тому, что технология антител стала важным оружием в попытке борьбы с конкретными заболеваниями и нарушениями при одновременном сведении к минимуму побочных эффектов, обычно ассоциированных со средствами неспецифической терапии. Соединение, представляющее собой (1S,3'R,6'R,7'S,8'E,11'S,12'R)-6-хлор-7'-метокси-11',12'-диметил-3,4-дигидро-2H,15'H-спиро[нафталин-1,22'[20]окса[13]тиа[1,14]дiazатетрацикло[14.7.2.0^{3,6}.0^{19,24}]пентакоза[8,16,18,24]тетраен]-15'-он-13',13'-диоксид (AMG 176), применимо в качестве ингибитора белка 1 миелоидноклеточного лейкоза (Mcl-1). Данное соединение характеризуется формулой I:



(I).

[7] Соединение, представляющее собой (1S,3'R,6'R,7'R,8'E,11'S,12'R)-6-хлор-7'-метокси-11',12'-динетил-7'-((9aR)-октагидро-2H-пиридо[1,2-a]пиразин-2-илметил)-3,4-дигидро-2H,15'H-спиро[нафталин-1,22'[20]окса[13]тиа[1,14]дiazатетрацикло[14.7.2.0^{3,6}.0^{19,24}]пентакоза[8,16,18,24]тетраен]-15'-он-13',13'-диоксид (AMG 397), также применимо в качестве ингибитора белка 1 миелоидноклеточного лейкоза (Mcl-1). Данное соединение характеризуется формулой II:



(II).

[8] В патенте США № 9562061, который включен в данный документ посредством ссылки в полном объеме, раскрыто AMG 176 в качестве ингибитора Mcl-1 и предусмотрен способ его получения.

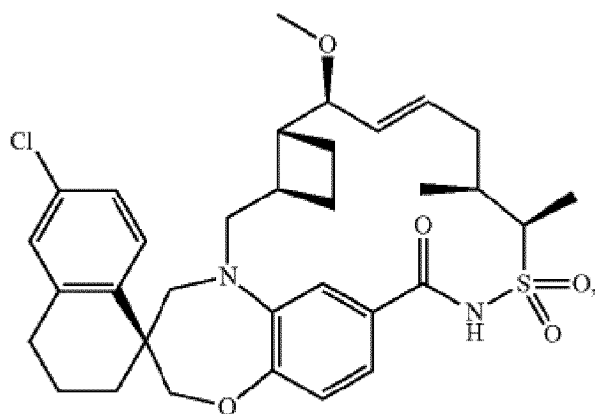
[9] В патенте США № 10300075, который включен в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте, раскрыто AMG 397 в качестве ингибитора Mcl-1 и предусмотрен способ его получения.

[10] Несмотря на то, что были раскрыты новые соединения, которые модулируют Mcl-1, необходимы новые антитела и составы на основе антител для мониторинга

прогресса усилий по ингибированию Mcl-1, например, в средствах противораковой терапии.

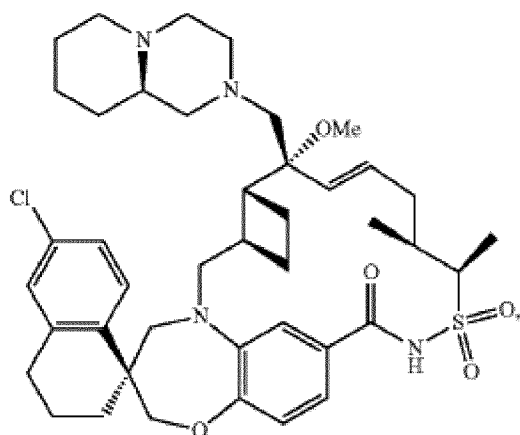
Сущность изобретения

[11] В настоящем изобретении предусмотрены антигенсвязывающие белки, такие как антитела любой формы и их фрагменты, которые демонстрируют неожиданно высокие свойства связывания (например, аффинность, авидность и чувствительность) в отношении антигена Mcl-1. Сравнительные испытания показали, что различные коммерческие иммуногистохимические (ИНС) антитела к Mcl-1 не способны обнаружить уровни Mcl-1, применимые для мониторинга лечения рака. Mcl-1 представляет собой индуцируемый белок дифференцировки клеток миелоидного лейкоза семейства Bcl-2, обнаруженный как сверхэкспрессированный в ряде гематологических и органных видах рака. С помощью антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению стали возможны способы мониторинга средств лечения рака путем измерения уровней Mcl-1 с течением времени. Предполагается, что раскрытые способы мониторинга лечения видов рака, характеризующихся наличием клеток, сверхэкспрессирующих Mcl-1, будут применимы для мониторинга любого лечения рака, целенаправленно воздействующего на такие виды рака. Иллюстративные средства лечения рака, целенаправленно воздействующие на такие виды рака, включают AMG 176 или AMG 397, оба из которых представляют собой ингибиторы Mcl-1. Обнаружение экспрессии Mcl-1 может дать представление о фармакологическом ответе на лечение рака, такое как введение AMG 176. AMG 176 характеризуется структурой ядра формулы (I):



(I).

[12] Структура AMG 397, другого ингибитора Mcl-1, представлена в формуле II:



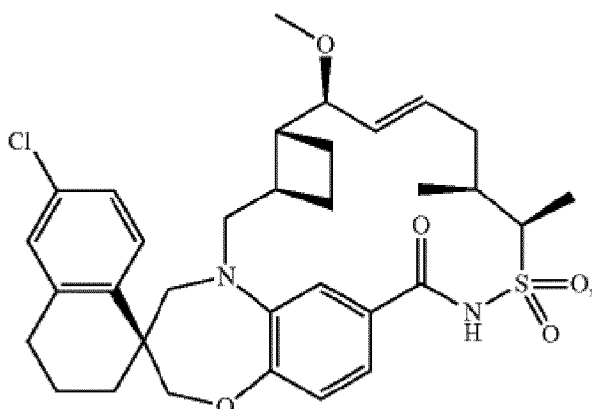
(II).

[13] В одном аспекте настоящее изобретение предусматривает антитело к Mcl-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, последовательность определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 5, последовательность определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 6, последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 16 (HCDR1), последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 17 (HCDR2) и последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 18 (HCDR3) или содержащие последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 11, последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 22, последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 23 и последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 31. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 32, в том числе в некоторых вариантах осуществления, в которых антитело дополнительно содержит последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27, если последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 31, если последовательность вариабельной области тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления антитело или фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело или фрагмент, в том числе варианты, в которых фрагмент антитела содержится в одноцепочечном вариабельном фрагменте (scFv). В некоторых вариантах осуществления фрагмент антитела представляет собой (a) scFv; (b) Fab или (c) (Fab')₂. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент является полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой антитело или фрагмент изотипа иммуноглобулина G (IgG). В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представлены в форме моноклонального антитела. В некоторых вариантах осуществления антитело или его

фрагмент представлены в форме биспецифического антитела, триспецифического антитела, одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями одноцепочечного переменного фрагмента (ds-scFv), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), диатела, триатела, тетратела, минитела, Fab, F(ab')₂, фрагмента V_HH/V_H, пептитела, химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифического привлекающего Т-клетки активатора (BiTE).

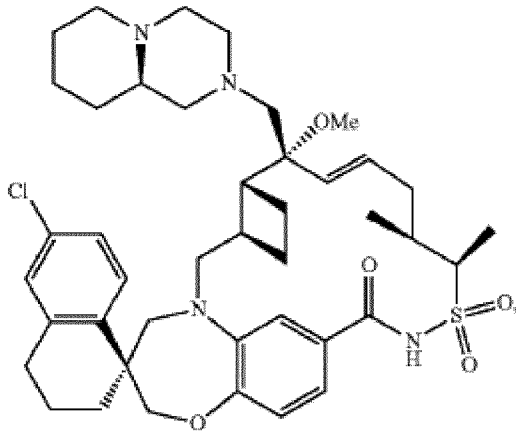
[14] Другой аспект настоящего изобретения представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего или иммунологически функционального фрагмента иммуноглобулина, который раскрыт в данном документе.

[15] Еще один аспект настоящего изобретения представляет собой способ мониторинга лечения раковой клетки у субъекта, включающий: (a) приведение клетки субъекта в контакт с антителом или его фрагментом по пункту 1; (b) обнаружение связывания антитела или его фрагмента с клеткой или ее содержимым; (c) определение уровня Mcl-1 в клетке и (d) сравнение уровня Mcl-1 в клетке с контролем, где контроль представляет собой известный уровень Mcl-1, характерный для отличной от раковой клетки, уровень Mcl-1 в нераковой клетке субъекта или уровень Mcl-1 в раковой клетке субъекта в другой момент времени. В некоторых вариантах осуществления мониторинг включает анализ, который представляет собой ELISA, конкурентный ELISA, анализ поверхностного плазмонного резонанса, анализ нейтрализации *in vitro*, анализ нейтрализации *in vivo*, иммуногистохимический анализ с сортировкой FACS или иммуногистохимический анализ без сортировки FACS. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку лейкоза, клетку лимфомы или клетку миеломы. В некоторых вариантах осуществления лечение рака включает введение AMG 176 формулы I:



I.

[16] В некоторых вариантах осуществления лечение рака включает введение AMG 397 формулы II:



II.

[17] В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку миелоидного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку органичного рака. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, последовательность определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 5, последовательность определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 6, последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 16, последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (HCDR2) под SEQ ID NO: 17 и последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HCDR3) под SEQ ID NO: 18, или антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 11, последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 22, последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 23 и последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27, последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 28 или вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 31 и вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представлены в форме одноцепочечного антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), scFv, Fab, F(ab')₂, биспецифического антитела, триспецифического антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями одноцепочечного вариабельного фрагмента (ds-scFv), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), диатела, триатела, тетратела, минитела, Fab, F(ab')₂, фрагмента V_HH/V_H, пептитела, химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифического привлекающего Т-клетки активатора (BiTE).

[18] Еще один аспект настоящего изобретения представляет собой способ лечения

рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к Mcl-1 или его фрагмента, раскрытого в данном документе. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку лейкоза, клетку лимфомы или клетку миеломы. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку миелоидного лейкоза. В некоторых вариантах осуществления раковая клетка представляет собой клетку органного рака. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, последовательность определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 5, последовательность определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 6, последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 16, последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (HCDR2) под SEQ ID NO: 17 и последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HCDR3) под SEQ ID NO: 18, или антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 11, последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 22, последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 23 и последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 24. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент содержит последовательность варибельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27, последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 28 или варибельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 31 и варибельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 32. В некоторых вариантах осуществления антитело или его фрагмент представлены в форме одноцепочечного антитела, одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), scFv, Fab, F(ab')₂, биспецифического антитела, триспецифического антитела, одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями одноцепочечного варибельного фрагмента (ds-scFv), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), диатела, триатела, тетратела, минитела, Fab, F(ab')₂, фрагмента VHH/VH, пептитела, химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифического привлекающего Т-клетки активатора (BiTE).

[19] Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидны из следующего подробного описания, в том числе графических материалов. Однако следует понимать, что подробное описание и конкретные примеры, хотя и указывают на предпочтительные варианты осуществления, представлены только для иллюстрации, поскольку различные изменения и модификации в рамках идеи и объема настоящего изобретения станут очевидными для специалистов в данной области техники из подробного описания.

Краткое описание графических материалов

[20] **Фигура 1.** Иммунный ответ антител кролика в отношении иммуногена Mcl-1. Анализы ELISA выполняли путем серийного разведения образцов сыворотки крови кролика в 384-луночных планшетах, покрытых меченым биотином белком Mcl-1. Значения поглощающей способности образцов давали приведенные кривые. А) Иммунный ответ на Mcl-1 для образцов раннего забора крови у кролика J3643. В) Иммунный ответ на Mcl-1, полученный для образцов позднего забора крови у кролика J3643.

[21] **Фигура 2.** Сортировка FACS кроличьих В-клеток в планшетах для клонального культивирования на полноразмерном Mcl-1 для обеспечения возможности рекомбинантного синтеза кроличьих моноклональных антител.

[22] **Фигура 3.** Представлены результаты скрининга на предельное связывание антигенов, который привел к созданию панели антител, ранжированных по значениям относительной аффинности в отношении Mcl-1. Мультиплекс гранул при разных значениях концентрации покрытия антигена. Для достижения равновесия применяли 18-часовую инкубацию.

[23] **Фигура 4.** В результате высокопроизводительной эпитоп-специфической сортировки было выявлено 5 групп. Панель из антител к Mcl-1, определенных на фиг. 3, подвергали сортировке друг относительно друга для создания концептуальной карты расположения эпитопов.

[24] **Фигура 5.** Рабочий цикл по направленному сохранению клональной экспансии у кролика (CEDR) в поддержку разработки биомаркеров AMG176, ингибитора Mcl-1. Кроликов иммунизировали с применением стандартного протокола, известного из уровня техники. Вкратце, селезенки животных собирали, диссоциировали, и суспензии отдельных клеток замораживали. Размороженные спленциты кролика сортировали по отдельным клеткам на FACS Aria III в 384-луночные планшеты на биотинилированный белок Mcl-1 и обнаруживали с помощью стрептавидина, конъюгированного с Alexa Fluor 647, и антитела к IgG кролика, конъюгированного с Alexa Fluor 488. Клетки сортировали в 100 мкл/лунка среды RPMI, дополненной FBS, 10% надосадочной жидкостью активированных спленцитов кролика (TSN) и питающей культурой клеток. После 7 дней в моноклональной культуре и размножения В-клеток образцы надосадочной жидкости культуры собирали для последующих анализов и В-клетки кролика лизировали для секвенирования и рекомбинантного синтеза последовательностей антител. Наиболее высокоаффинные, Mcl-1-селективные, иллюстративные антитела из каждой группы эпитопов отбирали для клонирования и экспрессии. Эти антитела анализировали иммуногистохимически (ИНС), и были выявлены ведущие соединения на основе антител 11P5 и 11B14. 11P5 отбирали для дальнейшей разработки анализа для сопутствующей диагностики (CDx).

[25] **Фигура 6.** Кроличий изотипический контроль содержал антитела IgG от кроликов, которые не были иммунизированы с помощью Mcl-1. Эти кроличьи антитела

изотипического контроля были применимы при оценке антител к Mcl-1, полученных с помощью способов, раскрытых в данном документе. Кроличьи антитела изотипического контроля в концентрации, составляющей 5 мкг/мл, применяли для зондирования восьми типов клеток, как показано на панелях А - Н: А) АМО1, В) DMS-23, С) RPMI8226, D) AGS, Е) QPM2, F) G361, G) Colo205 и Н) SKMM2.

[26] **Фигура 7.** Антитело 4019 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 1 мкг/мл, применяли для зондирования восьми типов клеток, как показано на панелях А - Н: А) АМО1, В) DMS-23, С) RPMI8226, D) AGS, Е) QPM2, F) G361, G) Colo205 и Н) SKMM2.

[27] **Фигура 8.** Антитело 5Н16 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 5 мкг/мл, применяли для зондирования восьми типов клеток, как показано на панелях А - Н: А) АМО1, В) DMS-23, С) RPMI8226, D) AGS, Е) QPM2, F) G361, G) Colo205 и Н) SKMM2.

[28] **Фигура 9.** Антитело 6А3 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 1 мкг/мл, применяли для зондирования восьми типов клеток, как показано на панелях А - Н: А) АМО1, В) DMS-23, С) RPMI8226, D) AGS, Е) QPM2, F) G361, G) Colo205 и Н) SKMM2.

[29] **Фигура 10.** Иммуногистохимический анализ линий опухолевых клеток. Моноклональное антитело 11P5 к Mcl-1 применяли в концентрации, составляющей 1 мкг/мл, для зондирования восьми разных линий опухолевых клеток, т. е. АМО1, DMS-23, RPMI8226, AGS, QPM2, G361, Colo205 и SKMM2. Клетки, подвергнутые зондированию, фиксировали в формалине и заливали парафином (FFPE) с применением общепринятых методик до иммуногистохимического окрашивания и микроскопического исследования. Результаты показывают, что антитело 11P5 проявляет специфическое цитоплазматическое окрашивание каждой исследованной линии опухолевых клеток.

[30] **Фигура 11.** Антитело 11В14 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 1 мкг/мл, применяли для зондирования восьми типов клеток, как показано на панелях А - Н: А) АМО1, В) DMS-23, С) RPMI8226, D) AGS, Е) QPM2, F) G361, G) Colo205 и Н) SKMM2.

[31] **Фигура 12.** Сравнительный анализ связывания антител. А) Клетки миндалин пациента 07Н-3971 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью кроличьих антител изотипического контроля в концентрации, составляющей 1 мкг/мл; В) клетки миндалин пациента 07Н-3971 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью антитела 11P5 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 0,5 мкг/мл; С) клетки миндалин пациента 07Н-3971 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью антитела 11В14 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 0,5 мкг/мл.

[32] **Фигура 13.** Клетки миндалин пациента 07Н-3971 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью антитела 4019 к Mcl-1 в концентрации, составляющей 1,0 мкг/мл.

[33] **Фигура 14.** Сравнительный анализ связывания антител. Левая панель: клетки костного мозга пациента 04Н-391 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью кроличьих антител изотипического контроля в концентрации, составляющей 1 мкг/мл; В) клетки костного мозга пациента 04Н-391 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью антитела 11P5 к Mcl-1, в

концентрации, составляющей 0,5 мкг/мл.

[34] **Фигура 15.** Сравнительный анализ связывания антител. Левая панель: клетки костного мозга пациента 04Н-391 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью кроличьих антител изотипического контроля в концентрации, составляющей 1 мкг/мл; В) клетки костного мозга пациента 04Н-391 подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью антитела 11В14 к Mcl-1, в концентрации, составляющей 0,5 мкг/мл.

[35] **Фигура 16. Анализ экспрессии.** Уровни экспрессии Mcl-1, Bcl-2 и Bcl-xL измеряли в восьми линиях опухолевых клеток с применением моноклональных антител, определенных в примере 6. Результаты, представленные на фигуре, показывают методику, использованную для сравнения всех линий клеток в рамках одного анализа, и демонстрируют упорядоченные по рангам уровни экспрессии Mcl-1, Bcl-2 и Bcl-xL в линиях клеток.

[36] **Фигура 17. Иммуногистохимическое окрашивание внутриклеточных структур с помощью антител к Mcl-1.** Левая панель: ткань миндалин пациента 145676 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела 11В14 к Mcl-1. Правая панель: ткань миндалин пациента 145676 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела 11Р5 к Mcl-1. Результаты ИНС показали, что оба антитела к Mcl-1 преимущественно окрашивали лимфоциты герминативного центра.

[37] **Фигура 18. Дифференциальное окрашивание клеток миеломы в костном мозге.** Левая панель: клетки костного мозга пациента 145676 подвергали зондированию с помощью антитела 11В14 к Mcl-1. Правая панель: клетки костного мозга пациента 145676 подвергали зондированию с помощью антитела 11Р5 к Mcl-1. Результаты показали, что моноклональное антитело 11Р5 к Mcl-1, в отличие от моноклонального антитела 11В14 к Mcl-1, проявляло специфическое цитоплазматическое окрашивание клеток миеломы костного мозга.

[38] **Фигура 19. Дифференциальное окрашивание клеток миеломы в костном мозге.** Левая панель: клетки костного мозга пациента 145676 подвергали зондированию с помощью антитела 11В14 к Mcl-1. Правая панель: клетки костного мозга пациента 145676 подвергали зондированию с помощью антитела 11Р5 к Mcl-1. Результаты показали, что моноклональное антитело 11Р5 к Mcl-1, в отличие от моноклонального антитела 11В14 к Mcl-1, проявляло специфическое цитоплазматическое окрашивание клеток миеломы костного мозга.

[39] **Фигура 20. Дифференциальное окрашивание клеток миеломы в декальцинированном костном мозге.** Левая панель: декальцинированные клетки костного мозга пациента 16863 подвергались зондированию с помощью антитела 11В14 к Mcl-1, и полученные в результате FFPE-обработки клетки миеломы подвергали ИНС-анализу. Правая панель: декальцинированные клетки костного мозга пациента 16863 подвергали зондированию с помощью антитела 11Р5 к Mcl-1, и полученные в результате FFPE-обработки клетки миеломы подвергали ИНС-анализу. Результаты

продемонстрировали, что моноклональное антитело 11P5 к Mcl-1, в отличие от моноклонального антитела 11B14 к Mcl-1, проявляло специфическое цитоплазматическое окрашивание клеток миеломы в декальцинированном костном мозге, подвергнутом FFPE-обработке.

[40] **Фигура 21. Оценка отрицательного контроля для ИHC-анализов.** Левая панель: клетки из ткани яичка пациента 390527 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела 11P5 к Mcl-1 в ИHC-анализе. Центральная панель: клетки из ткани семенника пациента 390527 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела к Bcl-2 (Agilent DAKO кат. № M0887) в ИHC-анализе. Правая панель: клетки из ткани семенника пациента 390527 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела к Bcl-xL (Cell Signaling Technology кат. № 2764) в ИHC-анализе. Результаты показали, что клетки из семенника человека обеспечивают подходящий отрицательный контроль для ИHC-анализов в отношении Mcl-1 и Bcl-2, но не в отношении Bcl-xL.

[41] **Фигура 22. Оценка отрицательного контроля для ИHC-анализов.** Левая панель: клетки из ткани матки пациента 5692 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела 11P5 к Mcl-1 в ИHC-анализе. Центральная панель: клетки из ткани матки пациента 5692 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела к Bcl-2 (Agilent DAKO кат. № M0887) в ИHC-анализе. Правая панель: клетки из ткани матки пациента 5692 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела к Bcl-xL (Cell Signaling Technology кат. № 2764) в ИHC-анализе. Результаты показали, что клетки из матки человека обеспечивают подходящий отрицательный контроль для ИHC-анализов в отношении Mcl-1, но не в отношении Bcl-2. Результаты для Bcl-xL показали, что Bcl-xL характеризуется внутренней отрицательностью.

[42] **Фигура 23. Оценка отрицательного контроля для ИHC-анализов.** Левая панель: клетки из ткани яичника пациента 12209 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела 11P5 к Mcl-1 в ИHC-анализе. Центральная панель: клетки из ткани яичника пациента 12209 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела к Bcl-2 (Agilent DAKO кат. № M0887) в ИHC-анализе. Правая панель: клетки из ткани яичника пациента 12209 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела к Bcl-xL (Cell Signaling Technology кат. № 2764) в ИHC-анализе. Результаты показали, что клетки из ткани яичника человека не обеспечивают подходящий отрицательный контроль для ИHC-анализов в отношении Mcl-1, Bcl-2 или Bcl-xL.

[43] **Фигура 24. Оценка отрицательного контроля для ИHC-анализов.** Левая панель: клетки из ткани головного мозга пациента 12400 подвергали зондированию с помощью кроличьего отрицательного контроля в ИHC-анализе. Центральная панель: клетки из ткани головного мозга пациента 12400 подвергали зондированию с помощью мышинового отрицательного контроля в ИHC-анализе. Правая панель: клетки из ткани головного мозга пациента 12400 подвергали зондированию с помощью моноклонального антитела 11P5 к Mcl-1 в ИHC-анализе. Результаты показали, что клетки из головного мозга

человека являются неподходящими для применения в качестве отрицательного контроля по причине фонового окрашивания.

Подробное описание

[44] В настоящем документе описаны схема иммунизации, процедуры скрининга В-клеток и процедуры выделения рекомбинантных антител, которые обеспечили открытие специфических антител к Mcl-1. Антитела, полученные в результате этой процедуры, демонстрируют удивительно превосходящую аффинность связывания и специфичность по сравнению с антителами, известными из уровня техники, что обеспечивает основу для разработки скрининговых анализов для мониторинга уровней Mcl-1 *in vitro* и *in vivo*, например, в качестве мониторинга лечения рака.

[45] Общепринятые методики можно применять для рекомбинантной ДНК, синтеза олигонуклеотидов, а также для культивирования и трансформации тканей (например, электропорации, липофекции). Ферментативные реакции и методики очистки можно осуществлять в соответствии со спецификациями производителя, или как обычно осуществляется в данной области техники, или как описано в данном документе. Вышеуказанные методики и процедуры в основном можно осуществлять в соответствии со способами, хорошо известными из уровня техники, и как описано в различных общих и более конкретных ссылках, которые цитируются и обсуждаются в настоящем описании. См., например, Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., которая включена в данный документ посредством ссылки для любой цели.

[46] Если не предусмотрены конкретные определения, номенклатуры, используемые в связи с и описанными в данном документе лабораторными процедурами и методиками аналитической химии, синтетической органической химии, а также медицинской и фармацевтической химии, хорошо известны и широко применяются в данной области техники. Аналогичным образом, общепринятые методики можно применять для химического синтеза, химических анализов, получения, составления и доставки фармацевтических средств, а также лечения пациентов.

[47] Применяемый в данном документе термин "приблизительно" предназначен для учета изменений, возникающих по причине экспериментальной ошибки. Считается, что все измерения, указанные в данном документе, модифицированы с помощью термина "приблизительно", независимо от того, применяется ли термин явно или нет, если в контексте явно не указано иное. При применении в данном документе формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если в контексте явно не обозначено иное. Считается, что термины "например" и "такой как" и их грамматические эквиваленты соответствуют фразе "и без ограничения", если явно не указано иное.

[48] Фразы "биологическое свойство", "биологическая характеристика" и термин "активность" в отношении антитела по настоящему изобретению применяются в данном документе взаимозаменяемо и включают без ограничения аффинность и специфичность эпитопа (например, человеческое антитело к Mcl-1 человека связывается с Mcl-1

человека), способность противодействовать активности целевого полипептида (например, активности Mcl-1), стабильность антитела *in vivo* и иммуногенные свойства антитела. Другие выявляемые биологические свойства или характеристики антитела, признанные в данной области техники, включают, например, перекрестную реактивность (т. е. в основном с гомологами Mcl-1, отличными от человеческих, или с другими белками или тканями) и способность сохранять высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих. Вышеупомянутые свойства или характеристики можно наблюдать или измерять с применением признанных в данной области техники методик, в том числе без ограничения ELISA, конкурентный ELISA, анализ поверхностного плазмонного резонанса, анализы нейтрализации *in vitro* и *in vivo* и иммуногистохимический анализ с использованием срезов ткани из разных источников, в том числе человека, примата или любого другого подходящего источника. Конкретные виды активности и биологические свойства человеческих антител к Mcl-1 человека более подробно описаны в разделе "Примеры" ниже.

[49] Применяемый в данном документе термин "биологический образец" включает без ограничения любое количество вещества из живого существа или ранее живого существа. Такие живые существа включают без ограничения людей, мышей, обезьян, крыс, кроликов, лошадей, крупный рогатый скот, овец, коз и других животных. Такие вещества включают без ограничения кровь, сыворотку крови, мочу, клетки, органы, ткани, кость, костный мозг, лимфатические узлы и кожу.

[50] Применяемые в данном документе термины "метка" или "меченый" относятся к включению обнаруживаемого маркера, например, путем включения радиоактивно меченой аминокислоты или присоединения к полипептиду биотиновых фрагментов, которые могут быть обнаружены меченым авидином (например, стрептавидином, предусматривающим обнаруживаемый маркер, такой как флуоресцентный маркер, хемилюминесцентный маркер, или ферментативную активность, которые могут быть обнаружены посредством оптических или колориметрических способов). В определенных вариантах осуществления метка также может быть терапевтической. Различные способы мечения полипептидов и гликопротеинов известны из уровня техники и могут быть с успехом применены в способах, раскрытых в данном документе. Примеры меток для полипептидов включают без ограничения радиоизотопы или радионуклиды, такие как ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}U , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{111}In , ^{125}I и ^{131}I , флуоресцентные метки (например, изотиоцианат флуоресцеина или FITC, родамин или лантаноидные люминофоры), ферментативные метки (например, пероксидаза хрена, β -галактозидаза, люцифераза, щелочная фосфатаза), хемилюминесцентные метки, гаптенотные метки, такие как биотинильные группы, и предопределенные эпитопы полипептидов, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновой застежки, сайты связывания вторичных антител, домены связывания металлов или эпитопные метки). В определенных вариантах осуществления метки прикрепляются с помощью спейсерных плечей (например, $(\text{CH}_2)_n$, где n составляет менее приблизительно 20) различных величин длины

для уменьшения потенциальных стерических несоответствий.

[51] Термин "встречающийся в природе" или "нативный", применяемый в данном документе и применяемый в отношении объекта, относится к тому факту, что объект может быть найден в природе. Например, полипептид или полинуклеотидная последовательность, которая присутствует в организме (в том числе вирусы), которая может быть выделена из источника в природе и которая не подвергалась преднамеренной модификации человеком, является встречающейся в природе. Применяемый в данном документе термин "не встречающийся в природе" или "ненативный" относится к материалу, который не встречается в природе или был подвергнут структурной модификации или синтезирован человеком. Например, "не встречающийся в природе" может относиться к варианту, такому как полинуклеотидный вариант, который может быть получен с применением известных из уровня техники методик мутагенеза, или полипептидный вариант, полученный с помощью такого полинуклеотидного варианта. Такие варианты включают, например, варианты, полученные путем нуклеотидных замен, делеций или добавлений, которые могут охватывать один или несколько нуклеотидов. Полинуклеотидные варианты могут быть изменены в кодирующих или не кодирующих областях или в обеих из них. Изменения в кодирующих областях могут приводить к консервативным или неконсервативным аминокислотным заменам, делециям или добавлениям. Наиболее определенными среди них являются "молчащие" замены, добавления, делеции и консервативные замены, которые не изменяют свойств и вариантов активности антитела к Mcl-1. Специалист в данной области техники может легко определить, как получить такой вариант с применением способов, хорошо известных из уровня техники. Термин "встречающиеся в природе нуклеотиды" включает дезоксирибонуклеотиды и рибонуклеотиды. Термин "модифицированные нуклеотиды" включает нуклеотиды с модифицированными или замещенными сахарными группами и т. п. Термин "олигонуклеотидные связи" включает фосфороотионатные, фосфородитионатные, фосфороселеноатные, фосфородиселеноатные, фосфороанилотионатные, фосфоранилататные и фосфороамидатные связи и т. п. См. например, LaPlanche et al., Nucl Acids Res., 14:9081 (1986); Stec et al., J Am. Chem. Soc., 106:6077 (1984); Stein et al., Nucl. Acid. Res., 16:3209 (1988); Zon et al., Anti-Cancer Drug Design, 6:539 (1991); Zon et al., OLIGONUCLEOTIDES AND ANALOGUES: A PRACTICAL APPROACH, pp. 87-108 (F. Eckstein, Ed.; 1991), Oxford University Press, Oxford England; Stec et al., U.S. Pat. No. 5,151,510; Uhlmann et al., Chemical Reviews, 90:543 (1990), раскрытия которых включены в настоящий документ посредством ссылки для любой цели. Олигонуклеотид может содержать обнаруживаемую метку, обеспечивающую возможность обнаружения олигонуклеотида или его гибридизацию.

[52] Термин "выделенный белок" означает, что указанный белок (1) не содержит по меньшей мере некоторые другие белки, с которыми он будет обнаруживаться в природе, (2) по сути не содержит другие белки из того же источника, например, полученных от того же вида, (3) экспрессируется клеткой, полученной от другого вида, (4) был отделен

от по меньшей мере приблизительно 50 процентов полинуклеотидов, липидов, углеводов или других материалов, с которым он ассоциирован в природе, (5) не ассоциирован (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с частями белка, с которым "выделенный белок" ассоциирован в природе, (6) функционально ассоциирован (посредством ковалентного или нековалентного взаимодействия) с полипептидом, с которым он не ассоциирован в природе, или (7) не встречается в природе. Такой выделенный белок может кодироваться геномной ДНК, кДНК, мРНК или другой РНК синтетического происхождения или любой их комбинацией. В одном варианте осуществления выделенный белок по существу не содержит белки или полипептиды или другие загрязняющие вещества, которые находятся в его естественном окружении, которые будут мешать его применению.

[53] Термины "полипептид" или "белок" означают молекулы, содержащие последовательность нативных белков, то есть белков, вырабатываемых встречающимися в природе и специфически нерекомбинантными клетками или сконструированными генетически или рекомбинантными клетками, и включают молекулы, содержащие аминокислотную последовательность нативного белка, или молекулы, имеющие делеции из, добавления к и/или замены одной или нескольких аминокислот нативной последовательности. Термины "полипептид" и "белок" конкретно охватывают антитела к Mcl-1 или последовательности, которые имеют делеции из, добавления к и/или замены одной или нескольких аминокислот антитела к Mcl-1.

[54] Термин "фрагмент полипептида" относится к полипептиду, который содержит аминоконцевую делецию, карбоксиконцевую делецию и/или внутреннюю делецию. В определенных вариантах осуществления длина фрагментов составляет от по меньшей мере 5 до приблизительно 500 аминокислот. Следует отметить, что в определенных вариантах осуществления длина фрагментов составляет по меньшей мере 5, 6, 8, 10, 14, 20, 50, 70, 100, 110, 150, 200, 250, 300, 350, 400 или 450 аминокислот. В частности, применимые фрагменты полипептида включают функциональные домены, в том числе связывающие домены, в частности антигенсвязывающие домены, особенно где антиген представляет собой эпитоп Mcl-1 человека. В случае антитела к Mcl-1 применимые фрагменты включают без ограничения область CDR, вариабельный домен тяжелой или легкой цепей, часть цепи антитела или только ее вариабельную область, содержащую две CDR и т. п.

[55] Термин "антиген" относится к молекуле или части молекулы, способной быть связанной с помощью селективного связывающего средства, такого как антитело, и которую дополнительно можно применять для выработки в организме животного антител, способных к связыванию с данным антигеном. Антиген может иметь один или несколько эпитопов.

[56] "Антигенсвязывающий белок" представляет собой белок, который специфически связывается с антигеном. Иллюстративные антигенсвязывающие белки включают любую форму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[57] Термин "эпитоп" включает любой сайт на антигене, который способен специфически связываться с иммуноглобулином или Т-клеточным рецептором. В определенных вариантах осуществления эпитопные детерминанты включают химически активные поверхностные группировки молекул, такие как аминокислоты, боковые сахарные цепи, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и в определенных вариантах осуществления могут иметь специфические трехмерные структурные характеристики и/или специфические характеристики заряда. Эпитоп представляет собой область антигена, которая связывается антителом. В определенных вариантах осуществления считается, что антитело специфически связывает антиген, если оно предпочтительно распознает антиген-мишень в сложной смеси белков и/или макромолекул. В определенных вариантах осуществления считается, что антитело специфически связывает антиген, если равновесная константа диссоциации составляет приблизительно 10^{-6} М, 10^{-7} М, 10^{-8} М, 10^{-9} М, 10^{-10} М, 10^{-11} М, 10^{-12} М или менее приблизительно 10^{-12} М.

[58] Антитело связывается "по сути с тем же эпитопом", что и эталонное антитело, когда два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. Наиболее широко применяемыми и быстрыми способами определения того, связываются ли два антитела с идентичными или стерически перекрывающимися эпитопами, являются конкурентные анализы, которые могут быть сконфигурированы в ряде разных форматах с применением либо меченого антигена, либо меченого антитела. Обычно антиген иммобилизован на субстрате, и способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител измеряется с применением радиоактивных изотопов или ферментативных метки.

[59] При оценке связывания и специфичности антител согласно настоящему изобретению антитело по существу подавляет адгезию лиганда рецептором, если избыток антитела снижает количество лиганда, связанного с рецептором по меньшей мере на 20%, 40%, 60%, 80%, 85% или больше (как измерено, например, с применением анализа конкурентного связывания *in vitro*).

[60] "Антитело" или "пептид(ы) антитела" относятся к интактному антителу или его связывающему фрагменту, который конкурирует с интактным антителом за специфическое связывание. В определенных вариантах осуществления связывающие фрагменты получают посредством технологий рекомбинантной ДНК. В дополнительных вариантах осуществления связывающие фрагменты получают посредством ферментативного или химического расщепления интактных антител. Связывающие фрагменты включают без ограничения F(ab), F(ab'), F(ab')₂, Fv и одноцепочечные антитела.

[61] "Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было выявлено, отделено и/или извлечено из компонента его природной среды. Загрязняющие компоненты его природной среды представляют собой материалы, которые будут мешать применению антитела в анализе, диагностике или терапии и могут включать ферменты,

гормоны и другие белковые или небелковые вещества. В определенных вариантах осуществления антитело очищают (1) до более 95% или более 99% по весу антитела, определенного посредством способа Лоури, (2) до степени, достаточной для получения по меньшей мере 15 остатков N-концевой или внутренней аминокислотной последовательности с применением секвенатора с вращающимся стаканом, или (3) до гомогенности посредством SDS-PAGE в восстанавливающих или невосстанавливающих условиях с применением окрашивания с помощью кумасси синего или серебра. Выделенное антитело предусматривает антитело *in situ* в рекомбинантных клетках, поскольку по меньшей мере один компонент природного окружения антитела не присутствует.

[62] "Нейтрализующее антитело" представляет собой молекулу антитела, которая способна блокировать или по существу снижать эффекторную функцию антигена-мишени, с которым она связывается. Соответственно, "нейтрализующее" антитело к Mcl-1 способно блокировать или по существу снижать эффекторную функцию Mcl-1. Термин "по существу снижать" предназначен для обозначения по меньшей мере приблизительно 60%, по меньшей мере приблизительно 70%, по меньшей мере приблизительно 75%, по меньшей мере приблизительно 80%, по меньшей мере приблизительно 85% или по меньшей мере приблизительно 90% снижения эффекторной функции антигена-мишени (например, Mcl-1 человека).

[63] Термин "специфическое связывающее средство" относится к встречающейся в природе или не встречающейся в природе молекуле, которая специфически связывается с мишенью. Примеры специфических связывающих средств включают без ограничения белки, пептиды, нуклеиновые кислоты, углеводы и липиды. В определенных вариантах осуществления специфическое связывающее средство представляет собой антитело.

[64] Термин "специфическое связывающее средство к Mcl-1" относится к специфическому связывающему средству, которое специфически связывает любую часть Mcl-1. В определенных вариантах осуществления специфическое связывающее средство к Mcl-1 представляет собой антитело, которое специфически связывается с Mcl-1.

[65] Например, антитело "специфически связывается" с мишенью, если антитело, будучи меченым, может быть отторгнуто от своей мишени соответствующим немеченым антителом.

[66] Применяемый в данном документе термин "иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина" относится к фрагменту полипептида, который содержит по меньшей мере CDR тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина. Иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению способен связываться с антигеном. В определенных вариантах осуществления антиген представляет собой лиганд, который специфически связывается с рецептором. В таких вариантах осуществления связывание иммунологически функционального фрагмента иммуноглобулина по настоящему изобретению предупреждает связывание лиганда с его рецептором, прерывая биологический ответ,

возникающий в результате связывания лиганда с рецептором. В одном варианте осуществления иммунологически функциональный фрагмент иммуноглобулина по настоящему изобретению специфически связывается с Mcl-1. Предпочтительно, фрагмент специфически связывается с Mcl-1 человека.

[67] Термин "функционально связанный" означает, что компоненты, в отношении которого применяется этот термин, находятся в отношениях, которые обеспечивают им возможность выполнять присущие им функции в подходящих условиях или функционировать так, как ожидается или предполагается. Например, контрольная последовательность, "функционально связанная" с кодирующей последовательностью белка, лигируется к ней таким образом, что экспрессия кодирующей последовательности белка контролируется по меньшей мере частично регуляторной последовательностью, что как правило приводит к экспрессии кодирующей последовательности в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторной(ых) последовательности(ей).

[68] Термин "фармацевтическое средство", "средство" или "лекарственное средство" относится к химическому соединению, смеси химических соединений, биологической макромолекуле или экстракту, полученному из биологических материалов, способному индуцировать желаемый терапевтический эффект при соответствующем введении субъекту, например, пациенту. Выражение "фармацевтически эффективное количество" в отношении фармацевтической композиции, содержащей одно или множество антител, раскрытых в данном документе, следует понимать как означающее количество указанной фармацевтической композиции, которое способно устранить у субъекта, такого как пациент, уменьшение порога чувствительности к внешним раздражителям с возвращением этого порога чувствительности на уровень, сравнимый с таковым уровнем, наблюдаемым у здоровых субъектов.

[69] Применяемый в данном документе термин "вспомогательное вещество" означает любые фармацевтически приемлемые добавки, носитель, разбавитель, адъювант или другой ингредиент, отличный от активного фармацевтического ингредиента (API), которые, как правило, включают для составления и/или введения пациенту. Handbook of Pharmaceutical Excipients, 5th Edition, Rowe, et al., eds., Pharmaceutical Press, 2005, Hardback, 928, 0853696187.

[70] Применяемый в данном документе термин "полинуклеотид" означает одонитевые или двухнитевые полимеры нуклеиновой кислоты длиной по меньшей мере 10 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления нуклеотиды, входящие в состав полинуклеотида, могут представлять собой рибонуклеотиды, или дезоксирибонуклеотиды, или модифицированную форму любого типа нуклеотида. Модификации включают модификации основания, такие как в случае бромуридина, модификации рибозы, такие как в случае арабинозида и 2',3'-дидезоксирибозы, и модификации межнуклеотидной связей, такие как в случае фосфоротиоата, фосфородитиоата, фосфороселеноата, фосфородиселеноата, фосфороанилотиоата,

фосфоанилатата и фосфоамидата. Термин "полинуклеотид" в частности включает одно- и двухнитевые формы ДНК или РНК.

[71] Применяемый в данном документе термин "олигонуклеотид" включает встречающиеся в природе и модифицированные нуклеотиды, связанные между собой встречающимися в природе и/или не встречающимися в природе олигонуклеотидными связями. Олигонуклеотиды представляют собой подмножество полинуклеотидов, содержащее представителей, которые в основном являются одонитевыми и составляют в длину 200 нуклеотидов или меньше. В определенных вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 10 до 60 нуклеотидов. В определенных вариантах осуществления длина олигонуклеотидов составляет от 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 до 40 нуклеотидов. Олигонуклеотиды могут быть одонитевыми или двухнитевыми, например, для применения в конструировании генетического мутанта. Олигонуклеотиды по настоящему изобретению могут представлять собой смысловые или бессмысловые олигонуклеотиды по отношению к последовательности, кодирующей белок.

[72] Применяемый в данном документе термин "регуляторная последовательность" относится к полинуклеотидной последовательности, которая может влиять на экспрессию, процессинг и/или внутриклеточную локализацию кодирующих последовательностей, с которыми они функционально связаны. Природа таких регуляторных последовательностей может зависеть от организма-хозяина. В конкретных вариантах осуществления регуляторные последовательности для прокариот могут включать промотор, сайт связывания рибосомы и последовательность терминации транскрипции. В других конкретных вариантах осуществления регуляторные последовательности для эукариот могут включать промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания факторов транскрипции, последовательности энхансеров транскрипции, последовательности терминации транскрипции и последовательности полиаденилирования. В определенных вариантах осуществления "регуляторные последовательности" могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнеров по слиянию.

[73] Термин "вектор" включает молекулу нуклеиновой кислоты, способную переносить в клетку другую нуклеиновую кислоту, с которой она была связана. Один тип вектора представляет собой "плазмиду", которая относится к кольцевой двухнитевой петле ДНК, в которую могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Другой тип вектора представляет собой вирусный вектор, где в вирусный геном могут быть лигированы дополнительные сегменты ДНК. Определенные векторы способны к автономной репликации в клетке-хозяине, в которую они введены (например, бактериальные векторы, содержащие бактериальную точку начала репликации, и эпизомные векторы млекопитающих). Другие векторы (например, неэпизомные векторы млекопитающих) могут быть интегрированы в геном клетки-хозяина при введении в клетку-хозяина и реплицируются, таким образом, вместе с геномом хозяина. Более того, некоторые векторы способны управлять экспрессией генов, с которыми они

функционально связаны. Такие векторы называются в данном документе "рекомбинантными векторами экспрессии" (или просто "векторами экспрессии"). В целом, векторы экспрессии, применимые в практике методик рекомбинантной ДНК, часто представляют собой плазмиды. В настоящем описании "плазида" и "вектор" могут применяться взаимозаменяемо, поскольку плазида является наиболее часто применяемой формой вектора. Тем не менее, другие формы векторов экспрессии, такие как вирусные векторы (например, ретровирусы с дефектом репликации, аденовирусы и аденоассоциированные вирусы), которые выполняют эквивалентные функции, также предусмотрены в настоящем изобретении.

[74] Фраза "рекомбинантная клетка-хозяин" (или просто "клетка-хозяин") предусматривает клетку, в которую был введен рекомбинантный вектор экспрессии. Специалистам в данной области техники будет понятно, что такие термины предполагаются как относящиеся к не только конкретной клетки-субъекта, но и потомства такой клетки. Поскольку в последующих поколениях могут происходить определенные модификации по причине либо мутации, либо влияний окружающей среды, такое потомство может быть фактически не идентично родительской клетке, но все равно входит в объем термина "клетка-хозяин", как применяется в данном документе. Для экспрессии антител по настоящему изобретению можно применять широкий ряд систем экспрессии хозяина, в том числе системы экспрессии бактерий, дрожжей, бакуловирусов и млекопитающих (а также системы экспрессии фагового дисплея). Примером подходящего бактериального вектора экспрессии является рUC19. Для рекомбинантной экспрессии антитела клетку-хозяина трансфицируют одним или несколькими рекомбинантными векторами экспрессии, несущими фрагменты ДНК, кодирующие легкую и тяжелую цепи иммуноглобулина антитела таким образом, чтобы легкая и тяжелая цепи экспрессировались в клетке-хозяине и могли секретироваться в среду, в которой культивируются клетки-хозяева, в результате чего образуется кондиционированная среда. Антитела могут быть извлечены из кондиционированной среды с применением методик, хорошо известных из уровня техники. Для получения генов тяжелых и легких цепей антител, введения таких генов в рекомбинантные векторы экспрессии и введения векторов в клетки-хозяева применяют стандартные методологии рекомбинантной ДНК, такие как описанные в Sambrook et al, 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories, Ausubel, F. M. et al., (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates, (1989) и в патенте США № 4816397.

[75] Термин "трансдукция" применяется для обозначения переноса генов от одной бактерии к другой, обычно с помощью фага. "Трансдукция" также относится к приобретению и переносу последовательностей эукариотических клеток с помощью ретровирусов.

[76] Термин "трансфекция" применяется для обозначения поглощения чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, и клетка была "трансфицирована", если экзогенная ДНК

была введена внутрь клеточной мембраны. Целый ряд методик трансфекции хорошо известен из уровня техники и раскрыт в данном документе. См., например, Graham et al., 1973, Virology 52-456; Sambrook et al., 2001, MOLECULAR CLONING, A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratories; Davis et al., 1986, BASIC METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Elsevier; и Chu et al., 1981, Gene 13: 197. Такие методики можно применять для введения одной или нескольких экзогенных фрагментов ДНК в подходящие клетки-хозяева.

[77] Применяемый в данном документе термин "трансформация" относится к изменению генетических характеристик клетки, и при этом клетка была трансформирована, в случае если она была модифицирована с тем, чтобы она содержала новую ДНК. Например, клетка является трансформированной, если она генетически изменена по сравнению с ее нативным состоянием. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может подвергаться рекомбинации с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может временно сохраняться в виде эписомального элемента без репликации, или может реплицироваться независимо в качестве плазмиды. Считается, что клетка была подвергнута "стабильной трансформации", если ДНК реплицируется при делении клетки.

[78] Все соединения и их фармацевтически приемлемые соли могут находиться вместе с другими веществами, такими как вода и растворители (например, гидраты и сольваты).

Антигенсвязывающие белки

[79] В данном документе представлены антигенсвязывающие белки, которые связываются с Mcl-1. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки связываются с изоформой 1 Mcl-1, которая подавляет апоптоз и тем самым усиливает выживаемость клеток. Антигенсвязывающие белки по данному изобретению могут принимать любую из многих форм антигенсвязывающих белков, известных из уровня техники. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению принимают форму антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, белкового продукта на основе антитела или производного антитела.

[80] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок включает, по сути состоит из или состоит из антитела. Применяемый в данном документе термин "антитело" относится к белку в общепринятом формате иммуноглобулина, содержащему тяжелые и легкие цепи и содержащему переменные и константные области. Например, антитело может представлять собой IgG, который характеризуется "Y-образной" структурой из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну "легкую" цепь (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 25 кДа) и одну "тяжелую" цепь (как правило, имеющую молекулярный вес, составляющий приблизительно 50-70 кДа). Антитело содержит переменную область и константную область. В форматах IgG переменная область в основном содержит приблизительно 100-110 или больше аминокислот в длину, содержащая три

определяющие комплементарность области (CDR), которые в первую очередь отвечают за распознавание антигена и по существу различаются среди других антител, которые связываются с разными антигенами. Константная область позволяет антителу рекрутировать клетки и молекулы иммунной системы. Вариабельная область обнаружена в N-концевых областях каждой встречающейся в природе легкой цепи и тяжелой цепи, тогда как константная область состоит из C-концевых частей встречающихся в природе тяжелых и легких цепей (Janeway et al., "Structure of the Antibody Molecule and the Immunoglobulin Genes", Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 4th ed. Elsevier Science Ltd./Garland Publishing, (1999)).

[81] Общая структура и свойства CDR антител хорошо известны. Вкратце, в остове антитела CDR встроены в каркас вариабельной области тяжелой и легкой цепей, где они составляют области, главным образом отвечающие за связывание и распознавание антигена. Вариабельная область, как правило, содержит по меньшей мере три CDR тяжелой или легкой цепи (Kabat и др., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, Public Health Service NIH, Bethesda, MD; см. также Chothia и Lesk, 1987, J. Mol. Biol. 196:901-917; Chothia и др., 1989, Nature 342: 877-883) в пределах каркасной области (обозначенные как каркасные области 1-4, FR1, FR2, FR3 и FR4 по Kabat et al., 1991; см. также Chothia and Lesk, 1987). В связанном варианте осуществления остатки каркаса являются измененными. Каркасные области тяжелой цепи, которые могут быть изменены, располагаются в пределах областей, обозначенных H-FR1, H-FR2, H-FR3 и H-FR4, которые окружают остатки CDR тяжелой цепи, и остатки каркасных областей легкой цепи, которые могут быть изменены, располагаются в пределах областей, обозначенных L-FR1, L-FR2, L-FR3 и L-FR4, которые окружают остатки CDR легкой цепи. Аминокислота в пределах каркасной области может быть заменена, например, любой подходящей аминокислотой, выявляемой в каркасной последовательности человека или консенсусной последовательности человека.

[82] Антитела могут содержать любую константную область, известную из уровня техники. Человеческие легкие цепи классифицируются как легкие каппа- и лямбда-цепи. Тяжелые цепи классифицируются как мю-, дельта-, гамма-, альфа- или эpsilon-цепи, и они определяют изотип антитела как IgM, IgD, IgG, IgA и IgE соответственно. IgG имеет несколько подклассов, включая без ограничения IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. IgM имеет подклассы, включая без ограничения IgM1 и IgM2. Варианты осуществления настоящего изобретения включают все такие классы или изотипы антител. Константная область легкой цепи может представлять собой, например, константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа, например, человеческую константную область легкой цепи каппа- или лямбда-типа. Константная область тяжелой цепи может представлять собой, например, константные области тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа, например, человеческую константную область тяжелой цепи альфа-, дельта-, эpsilon-, гамма- или мю-типа. Соответственно, в различных вариантах осуществления антитело представляет собой антитело изотипа IgA, IgD, IgE, IgM или IgG, в том числе

любое из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В различных аспектах антитело содержит константную область, содержащую одну или несколько аминокислотных модификаций по сравнению со встречающимся в природе аналогом для улучшения периода полураспада/стабильности или для того, чтобы сделать антитело более подходящим для экспрессии/коммерческого производства. В различных случаях антитело содержит константную область, где С-концевой остаток Lys, который присутствует во встречающемся в природе аналоге, удален или отщеплен.

[83] Антитело может представлять собой моноклональное антитело. В некоторых вариантах осуществления антитело содержит последовательность, которая по существу сходна с встречающимся в природе антителом, вырабатываемым млекопитающим, например, мышью, кроликом, козой, лошастью, курицей, хомяком, человеком и т. п. В этом отношении антитело можно рассматривать как антитело млекопитающего, например, антитело мыши, антитело кролика, антитело козы, антитело лошади, антитело курицы, антитело хомяка, антитело человека и т. п. В определенных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой антитело, например, антитело человека. В определенных аспектах антигенсвязывающий белок представляет собой химерное антитело или гуманизованное антитело. Термин "химерное антитело" относится к антителу, содержащему домены от двух или более разных антител. Химерное антитело может, например, содержать константные домены от одного вида и переменные домены от второго вида или, в более общем случае, может содержать фрагменты аминокислотной последовательности от по меньшей мере двух видов. Химерное антитело также может содержать домены двух или более разных антител от одного и того же вида. Термин "гуманизованный", если применяется касательно антител, которые относятся к антителам, имеющим области, сконструированные таким образом, чтобы более точно соответствовать областям человеческих антител, тем самым снижая иммуногенность гуманизованной формы антитела. Как правило, конструирование сосредоточено на областях, отличных от CDR, таких как каркасные области и константные области антител. Такое конструирование обеспечивает снижение иммуногенности при сохранении характеристик связывания исходного антитела, отличного от человеческого. Например, гуманизация может предусматривать прививание CDR из антитела, отличного от человеческого, такого как мышьеантитело, на человеческое антитело. Гуманизация также может предусматривать селективные аминокислотные замены для получения последовательности, отличной от последовательности человека, более сходной с последовательностью человека. Информация, в том числе информация о последовательностях константных областей тяжелой и легкой цепей антител человека, общедоступна в базе данных Uniprot, а также в других базах данных, хорошо известных специалистам в области конструирования и получения антител. Например, последовательности константной области IgG2 человека, доступные в базе данных Uniprot под номером Uniprot P01859, включены в данный документ посредством ссылки.

[84] Антитело можно расщеплять на фрагменты с помощью ферментов, таких как,

папаин и пепсин. Папаин расщепляет антитело с получением двух Fab-фрагментов и одного Fc-фрагмента. Пепсин расщепляет антитело с получением $F(ab')_2$ -фрагмента и pFc' -фрагмента. В различных аспектах настоящего изобретения антигенсвязывающий белок представляет собой антигенсвязывающий фрагмент антитела (т. е. антигенсвязывающий фрагмент антитела, антигенсвязывающий фрагмент или антигенсвязывающая часть). В различных случаях антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой Fab-фрагмент или $F(ab')_2$ -фрагмент.

[85] Архитектуру антител была использована для создания растущего диапазона альтернативных форматов антител, который охватывает диапазон молекулярного веса, составляющий по меньшей мере приблизительно 12-150 кДа и характеризуется диапазоном валентности (n) от мономерных ($n=1$), до димерных ($n=2$), до тримерных ($n=3$), до тетрамерных ($n=4$) и потенциально более высокого порядка; такие альтернативные форматы в данном документе называются "белковыми продуктами на основе антитела". Белковые продукты на основе антитела включают белковые продукты на основе структуры полного антитела и белковые продукты, которые имитируют фрагменты антитела, которые сохраняют полную антигенсвязывающую способность, например, scFv, Fab и VHH/VH. Относительно небольшой антигенсвязывающий фрагмент, который полностью сохраняет антигенсвязывающий сайт когнатного антитела, представляет собой Fv-фрагмент, который полностью состоит из переменных (V) областей. Растворимый, гибкий аминокислотный пептидный линкер применяется для соединения областей VL и VH при образовании scFv (одноцепочечного переменного фрагмента, или, чаще, одноцепочечного переменного фрагмента) для стабилизации молекулы, или константные (C) домены добавляются к областям V для образования Fab-фрагмента (антигенсвязывающего фрагмента). Как scFv-, так и Fab-фрагменты могут быть легко получены в клетках-хозяевах, например, прокариотических клетках-хозяевах. Другие белковые продукты на основе антитела включают scFv, стабилизированный дисульфидными связями (ds-scFv), одноцепочечный Fab (scFab), а также ди- и мультимерные форматы антител, такие как диа-, триа- и тетратела, или миниантитела (мини-Ab), которые предусматривают разные форматы, состоящие из scFv, связанных с доменами олигомеризации. Самые маленькие фрагменты представляют собой области VHH/VH тяжелой цепи антител верблюдовых, а также однодоменные антитела (sdAb). Структурным элементом, который чаще всего применяется для создания новых форматов антител, является фрагмент антитела, представляющий собой одноцепочечный переменный (V) домен (scFv), который содержит V-домены из тяжелой и легкой цепей (VH- и VL-домены), связанные с помощью пептидного линкера из ~ 15 аминокислотных остатков. Пептитело или продукт слияния пептида и Fc представляет собой еще один белковый продукт на основе антитела. Структура пептитела состоит из биологически активного пептида, привитого на Fc-домен. Пептитела известны из уровня техники. Другие формы антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению, которые представляют собой слитые белки, включают химерные антигенные рецепторы (CAR) и

биспецифические привлекающие T-клетки активаторы (BiTES).

[86] Еще другие белковые продукты на основе антитела согласно настоящему изобретению включают одноцепочечное антитело (SCA); вышеупомянутые диатело, триатело и тетратело; биспецифические или триспецифические антитела и т. п. Биспецифические антитела можно разделить на несколько основных классов: BsIgG, дополненные IgG, фрагменты биспецифического антитела (BsAb), биспецифические слитые белки и конъюгаты BsAb. См., например, Spiess et al., *Molecular Immunology* 67(2) Part A: 97-106 (2015).

[87] В различных аспектах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению содержит, по сути состоит из или состоит из любого из этих белковых продуктов на основе антитела. В различных аспектах антигенсвязывающий белок содержит, по сути состоит из или состоит из любого из scFv, Fab VHH/VH, Fv-фрагмента, ds-scFv, scFab, димерного антитела, мультимерного антитела (например, диатела, триатела, тетратела), мини-Ab, VHH/VH пептитела тяжелой цепи антитела верблюдовых, sdAb, биспецифического или триспецифического антитела, BsIgG, дополненного IgG, фрагмента BsAb, биспецифического слитого белка или конъюгата BsAb.

[88] В различных случаях антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению представляет собой белковый продукт на основе антитела в мономерной форме или полимерной (например, олигомерной или мультимерной) форме. В определенных вариантах осуществления, в которых антитело содержит два или более отличающихся фрагментов антигенсвязывающих областей, антитело считается биспецифическим, триспецифическим, или полиспецифическим, или бивалентным, тривалентным или поливалентным в зависимости от числа отличающихся эпитопов, которые распознаются и связываются антителом. Под бивалентным антителом, отличным от "полиспецифического" или "многофункционального" антитела, в определенных вариантах осуществления понимается, что оно содержит сайты связывания, имеющие идентичную антигенную специфичность.

[89] В различных вариантах осуществления антитело к Mcl-1 или его вариант антитела выбраны из группы, состоящей из человеческого антитела, гуманизированного антитела, химерного антитела, моноклонального антитела, рекомбинантного антитела, антигенсвязывающего фрагмента антитела, одноцепочечного антитела, мономерного антитела, диатела, триатела, тетратела, Fab-фрагмента, F(ab')₂-фрагмента, scFab-фрагмента, антитела IgG1, антитела IgG2, антитела IgG3 и антитела IgG4.

[90] В различных аспектах антигенсвязывающий белок по настоящему изобретению связан с терапевтическим средством. Терапевтическое средство может представлять собой любое терапевтическое средство, известное из уровня техники, включая без ограничения химиотерапевтические средства, цитокины и факторы роста, цитотоксические средства и т. п.

Аффинность и авидность

[91] Антигенсвязывающие белки, представленные в данном документе,

связываются с Mcl-1 нековалентным и обратимым образом. В различных вариантах осуществления сила связывания антигенсвязывающего белка с Mcl-1 может быть описана с точки зрения его аффинности, меры силы взаимодействия между сайтом связывания антигенсвязывающего белка и эпитопом Mcl-1. В различных аспектах антигенсвязывающие белки, представленные в данном документе, характеризуются высокой аффинностью в отношении Mcl-1 и, таким образом, связывают большее количество Mcl-1 за более короткий период времени, чем низкоаффинные антигенсвязывающие белки. В различных аспектах антигенсвязывающий белок характеризуется равновесной константой ассоциации, K_A , которая составляет по меньшей мере 10^5 моль⁻¹, по меньшей мере 10^6 моль⁻¹, по меньшей мере 10^7 моль⁻¹, по меньшей мере 10^8 моль⁻¹, по меньшей мере 10^9 моль⁻¹, или по меньшей мере 10^{10} моль⁻¹ или по меньшей мере 10^{10} моль⁻¹, по меньшей мере 10^{10} моль⁻¹. Как понятно среднему специалисту в данной области техники, K_A может быть подвержена влиянию факторов, в том числе pH, температуры и состава буфера.

[92] В различных вариантах осуществления сила связывания антигенсвязывающего белка с Mcl-1 может быть описана с точки зрения его чувствительности. K_D представляет собой равновесную константу диссоциации, соотношение k_{off}/k_{on} между антигенсвязывающим белком и Mcl-1. K_D и K_A обратно пропорциональны друг другу. Значение K_D относится к концентрации антигенсвязывающего белка (количеству антигенсвязывающего белка, необходимому для конкретного эксперимента), и поэтому чем ниже значение K_D (ниже концентрация), тем выше аффинность антигенсвязывающего белка. В различных аспектах сила связывания антигенсвязывающего белка с Mcl-1 может быть описана с точки зрения K_D . В различных аспектах значение K_D антигенсвязывающих белков, представленных в данном документе, составляет приблизительно 10^{-1} , приблизительно 10^{-2} , приблизительно 10^{-3} , приблизительно 10^{-4} , приблизительно 10^{-5} , приблизительно 10^{-6} или меньше. В различных аспектах значение K_D антигенсвязывающих белков, представленных в данном документе, является микромолярным, наномолярным, пикомолярным или фемтомолярным. В различных аспектах значение K_D антигенсвязывающих белков, представленных в данном документе, находится в пределах диапазона от приблизительно от 10^{-4} до 10^{-6} , или от 10^{-7} до 10^{-9} , или от 10^{-10} до 10^{-12} , или от 10^{-13} до 10^{-15} , или от 10^{-9} до 10^{-12} , или от 10^{-9} до 10^{-15} . В различных аспектах значение K_D антигенсвязывающих белков, представленных в данном документе, находится в пределах диапазона от приблизительно $1,0 \times 10^{-12}$ М до приблизительно $1,0 \times 10^{-8}$ М. В различных аспектах значение K_D антигенсвязывающих белков находится в пределах диапазона от приблизительно $1,0 \times 10^{-11}$ М до приблизительно $1,0 \times 10^{-9}$ М.

[93] В различных аспектах аффинность антигенсвязывающих белков измеряется или ранжируется с применением проточной цитометрии или анализа на основе сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS). Анализы связывания на основе проточной цитометрии известны из уровня техники. См., например, Cedeno-Arias et al., *Sci Pharm* 79(3): 569-581 (2011); Rathanaswami et al., *Analytical Biochem* 373: 52-60

(2008); и Geuijen et al., *J Immunol Methods* 302(1-2): 68-77 (2005). В различных аспектах аффинность антигенсвязывающих белков измеряется или ранжируется с применением конкурентного анализа, как описано в Trikha et al., *Int J Cancer* 110: 326-335 (2004) и Tam et al., *Circulation* 98(11): 1085-1091 (1998). В работе Trikh et al. клетки, которые экспрессируют антиген, применялись в радиоанализе. Связывание ^{125}I -меченного антигенсвязывающего белка (например, антитела) с антигеном клеточной поверхности измеряется в клетках в суспензии. В различных аспектах относительная аффинность антитела к Mcl-1 определяется с помощью анализа на основе FACS, в котором разные концентрации антитела к Mcl-1, конъюгированного с флуорофором, инкубируются с клетками, экспрессирующими Mcl-1, и определяется испускаемая флуоресценция (которая является прямой мерой связывания антитела с антигеном). Строят кривую, изображающую флуоресценцию для каждой дозы или концентрации. Максимальное значение представляет собой наименьшую концентрацию, при которой флуоресценция достигает плато или максимума, то есть происходит насыщение связывания. Половина максимального значения принимается как EC_{50} или IC_{50} , и антитело с наименьшим значением отношения $\text{EC}_{50}/\text{IC}_{50}$ считается характеризующимся наибольшим значением аффинности по отношению к другим антителам, исследованным таким же образом.

[94] В различных аспектах значение IC_{50} , определенное в анализе конкурентного ингибирования связывания, примерно соответствует значению K_D антигенсвязывающего белка. В различных случаях конкурентный анализ представляет собой анализ на основе FACS, проводимый с использованием эталонного антитела, вторичного антитела, конъюгированного с флуорофором, и клеток, которые экспрессируют Mcl-1. В различных аспектах клетки генетически модифицированы для сверхэкспрессии Mcl-1. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки НЕК293Т, трансдуцированные вирусным вектором для экспрессии Mcl-1. В альтернативных аспектах клетки эндогенно экспрессируют Mcl-1. Перед проведением анализа на основе FACS в некоторых аспектах клетки, которые эндогенно экспрессируют Mcl-1, предварительно определяются как клетки с низкой экспрессией Mcl-1 или клетки с высокой экспрессией Mcl-1. В некоторых аспектах клетки представляют собой раковые или опухолевые клетки. В различных аспектах клетки представляют собой клетки из линии клеток, например, линии клеток крови, линии клеток яичника, линии клеток эндометрия, линии клеток мочевого пузыря, линии клеток легкого, линии клеток желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), линии клеток печени, линии клеток легких и т. п. В различных анализах антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению антигенсвязывающие белки конкурируют с эталонным антителом за связывание с Mcl-1 человека. Снижение связывания эталонного антитела указывает на присутствие, силу и/или степень связывания антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению с Mcl-1, как определено посредством анализа конкурентного связывания *in vitro*. В различных аспектах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению ингибируют связывающее взаимодействие между Mcl-1 человека и эталонным антителом, и это ингибирование характеризуется значением IC_{50} . В различных

аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 2500 нМ, при ингибировании связывающего взаимодействия между Mcl-1 человека и эталонным антителом. В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 2000 нМ, менее приблизительно 1500 нМ, менее приблизительно 1000 нМ, менее приблизительно 900 нМ, менее приблизительно 800 нМ, менее приблизительно 700 нМ, менее приблизительно 600 нМ, менее приблизительно 500 нМ, менее приблизительно 400 нМ, менее приблизительно 300 нМ, менее приблизительно 200 нМ или менее приблизительно 100 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 80 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 40 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 20 нМ или менее приблизительно 10 нМ. В различных случаях антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом, которое, как известно, связывается с Mcl-1 (это эталонное антитело отличается от любого из антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению), за связывание с Mcl-1.

[95] Авидность является мерой общей силы комплекса антитело-антиген. Она зависит от трех основных параметров: аффинности антигенсвязывающего белка в отношении эпитопа, валентности как антигенсвязывающего белка, так и Mcl-1 и структурного расположения частей, которые взаимодействуют. Чем больше значение валентности (числа сайтов связывания антигена) антигенсвязывающего белка, тем большее количество антигена (Mcl-1) он может связать. В различных аспектах антигенсвязывающие белки характеризуются сильной авидностью в отношении Mcl-1. В различных аспектах антигенсвязывающие белки являются поливалентными. В различных аспектах антигенсвязывающие белки являются бивалентными. В различных случаях антигенсвязывающие белки являются моновалентными.

Перекрестная реактивность

[96] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с Mcl-1 и не связываются с любым другим представителем семейства Bcl-2, т. е. не вступают в перекрестную реакцию с любым другим представителем семейства Bcl-2. В различных случаях антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению являются Mcl-1-специфическими. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению характеризуются селективностью в отношении Mcl-1, которая по меньшей мере 10-кратно, 5-кратно, 4-кратно, 3-кратно, 2-кратно превышает селективность антигенсвязывающего белка в отношении другого белка семейства Bcl-2. В различных вариантах осуществления антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению характеризуются селективностью в отношении Mcl-1, которая по меньшей мере в 10-кратно, 5-кратно, 4-кратно, 3-кратно, 2-кратно превышает селективность антигенсвязывающего белка в отношении любого другого белка семейства Bcl-2. Селективность может быть основана на

значении K_D , проявляемой антигенсвязывающим белком в отношении Mcl-1 или представителя семейства Bcl-2, где значение K_D может быть определено посредством методик, известных из уровня техники, таких как поверхностный плазмонный резонанс или анализы аффинности на основе FACS.

Конкурентные анализы

[97] В различных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок ингибирует связывающее взаимодействие между Mcl-1 человека и эталонным антителом, при этом известно, что эталонное антитело связывается с Mcl-1, но не является антигенсвязывающим белком по настоящему изобретению. В различных случаях антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с Mcl-1 человека и за счет этого снижают количество Mcl-1 человека, связанного с эталонным антителом, как определено посредством анализа конкурентного связывания *in vitro*. В различных аспектах антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению ингибируют связывающее взаимодействие между Mcl-1 человека и эталонным антителом, и это ингибирование характеризуется значением IC_{50} . В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 2500 нМ, при ингибировании связывающего взаимодействия между Mcl-1 человека и эталонным антителом. В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 2000 нМ, менее приблизительно 1500 нМ, менее приблизительно 1000 нМ, менее приблизительно 900 нМ, менее приблизительно 800 нМ, менее приблизительно 700 нМ, менее приблизительно 600 нМ, менее приблизительно 500 нМ, менее приблизительно 400 нМ, менее приблизительно 300 нМ, менее приблизительно 200 нМ или менее приблизительно 100 нМ. В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 90 нМ, менее приблизительно 80 нМ, менее приблизительно 70 нМ, менее приблизительно 60 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 40 нМ, менее приблизительно 30 нМ, менее приблизительно 20 нМ или менее приблизительно 10 нМ.

[98] В различных случаях антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению конкурируют с эталонным антителом за связывание с Mcl-1 человека и таким образом снижают количество Mcl-1 человека, связанного с эталонным антителом, как определено посредством анализа конкурентного связывания *in vitro*. В различных аспектах анализ конкурентного связывания *in vitro* представляет собой анализ на основе FACS, в котором флуоресценция вторичного антитела, конъюгированного с флуорофором, которое связывается с Fc эталонного антитела, измеряется в отсутствие или в присутствии конкретного количества антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению. В различных аспектах анализ на основе FACS проводят с эталонным антителом, вторичным антителом, конъюгированным с флуорофором, и клетками, которые экспрессируют Mcl-1. В различных аспектах клетки генетически модифицированы для сверхэкспрессии Mcl-1. В некоторых аспектах клетки представляют собой клетки НЕК293Т, трансдуцированные

вирусным вектором для экспрессии Mcl-1. В альтернативных аспектах клетки эндогенно экспрессируют Mcl-1. Перед проведением анализа на основе FACS в некоторых аспектах клетки, которые эндогенно экспрессируют Mcl-1, предварительно определяются как клетки с низкой экспрессией Mcl-1 или клетки с высокой экспрессией Mcl-1. В некоторых аспектах клетки представляют собой раковые или опухолевые клетки. В различных аспектах клетки представляют собой клетки из линии клеток, например, линии клеток крови, линии клеток яичника, линии клеток эндометрия, линии клеток мочевого пузыря, линии клеток легкого, линии клеток желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), линии клеток печени, линии клеток легких и т. п. В различных случаях антигенсвязывающие белки по настоящему изобретению связываются с высокой аффинностью с Mcl-1, эндогенно экспрессируемым одной или несколькими клетками, которые эндогенно экспрессируют Mcl-1. В различных аспектах антигенсвязывающие белки демонстрируют значение IC_{50} , составляющее менее 3000 нМ, как определено в анализе конкурентного ингибирования связывания на основе FACS. В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 2500 нМ, менее приблизительно 2000 нМ, менее приблизительно 1750 нМ, менее приблизительно 1500 нМ, менее приблизительно 1250 нМ, менее приблизительно 1000 нМ, менее приблизительно 750 нМ или менее приблизительно 500 нМ, как определено в анализе конкурентного ингибирования связывания на основе FACS. В различных аспектах антигенсвязывающие белки проявляют значение IC_{50} , составляющее менее приблизительно 400 нМ, менее приблизительно 300 нМ, менее приблизительно 200 нМ, менее приблизительно 100 нМ, менее приблизительно 75 нМ, менее приблизительно 50 нМ, менее приблизительно 25 нМ или менее приблизительно 10 нМ, как определено в анализе конкурентного ингибирования связывания на основе FACS.

[99] Другие анализы связывания, такие как анализы конкурентного связывания или конкурентные анализы, которые исследуют способность антитела конкурировать со вторым антителом за связывание с антигеном или его эпитопом, известны из уровня техники. См., например, Trikha et al., *Int J Cancer* 110: 326-335 (2004); Tam et al., *Circulation* 98(11): 1085-1091 (1998). публикацию заявки на патент США № US20140178905, Chand et al., *Biologicals* 46: 168-171 (2017); Liu et al., *Anal Biochem* 525: 89-91 (2017); и Goolia et al., *J Vet Diagn Invest* 29(2): 250-253 (2017). Также из уровня техники известны другие способы сравнения двух антител, в том числе, например, поверхностный плазмонный резонанс (SPR). SPR можно применять для определения констант связывания антигенсвязывающего белка по настоящему изобретению и эталонного антитела, и эти две константы связывания можно сравнивать.

Способы получения антител и связанные с ними способы

[100] Подходящие способы получения антигенсвязывающих белков (например, антител, антигенсвязывающих фрагментов антител и белковых продуктов на основе антител) известны из уровня техники. Например, стандартные гибридомные способы получения антител описаны, например, в Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory*

Manual, CSH Press (1988), и С.А. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY (2001)).

[101] В зависимости от вида хозяина можно применять различные адъюванты для увеличения иммунного ответа, что приводит к большей выработке антител хозяином. Такие адъюванты включают без ограничения полные и неполные адъюванты Фрейнда, минеральные гели, такие как гидроксид алюминия, и поверхностно-активные вещества, такие как лизолецитин, полиолы Pluronic, полианионы, пептиды, масляные эмульсии, гемоцианин фиссуреллы и динитрофенол. BCG (бациллы Кальметта-Герена) и Corynebacterium parvum представляют собой потенциально применимые адъюванты для человека.

[102] Другие способы получения антител обобщены в таблице 1.

ТАБЛИЦА 1

Методика	Различные ссылки
Способы с применением EBV-гибридомы и систем экспрессии на основе бактериофаговых векторов	Haskard and Archer, J. Immunol. Methods, 74(2), 361-67 (1984), Roder et al., Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986), и Huse et al., Science, 246, 1275-81 (1989)).
Способы получения антител у животных, отличных от человека	Патенты США 5545806, 5569825 и 5714352 и публикация заявки на патент США № 2002/0197266
Индуктирование продуцирования in vivo в популяции лимфоцитов или путем скрининга рекомбинантных библиотек иммуноглобулинов или панелей высокоспецифических связывающих реагентов	Orlandi et al (Proc Natl Acad Sci 86: 3833-3837; 1989), и Winter G and Milstein C (Nature 349: 293-299, 1991).
Способы получения рекомбинантных белков	"Protein production and purification" Nat Methods 5(2): 135-146 (2008).
Фаговый дисплей	Janeway et al., выше, Huse et al., выше, и патент США 6265150. Связанные способы также описаны в патенте США № 5403484; патенте США № 5571698; патенте США № 5837500; патенте США № 5702892. Методики описаны в патенте США № 5780279; патенте США № 5821047; патенте США № 5824520; патенте США № 5855885; патенте США № 5858657; патенте США № 5871907;

Методика	Различные ссылки
	патенте США № 5969108; патенте США № 6057098 и патенте США № 6225447.
Антитела могут вырабатываться трансгенными мышами	Патенты США №№ 5545806 и 5569825 и Janeway et al., выше.

[103] Способы исследования антител на способность связываться с эпитопом Mcl-1, независимо от способа получения антител, известны из уровня техники и включают любой анализ связывания антитела с антигеном, такой как, например, радиоиммуноанализ (RIA), ELISA, вестерн-блот, иммунопреципитация, SPR и конкурентный анализ ингибирования (см., например, Janeway и др. и публикацию заявки на патент США № 2002/0197266).

[104] В определенных вариантах осуществления варианты антитела предусматривают варианты гликозилирования, где число и/или тип сайтов гликозилирования были изменены по сравнению с аминокислотными последовательностями исходного полипептида. В определенных вариантах осуществления варианты белка содержат большее или меньшее число сайтов N-связанного гликозилирования, чем нативный белок. Сайт N-связанного гликозилирования характеризуется последовательностью: Asn-Xaa-Ser или Asn-Xaa-Thr, где аминокислотный остаток, обозначенный как Xaa, может представлять собой любой аминокислотный остаток, кроме пролина. Замена аминокислотных остатков для создания такой последовательности обеспечивает потенциальный новый сайт для добавления N-связанной углеводной цепи. В качестве альтернативы, замены, которые удаляют эту последовательность, будут удалять существующую N-связанную углеводную цепь. Также предусмотрена перегруппировка N-связанных углеводных цепей, где один или несколько N-связанных сайтов гликозилирования (как правило тех, которые встречаются в природе) удаляются и создаются один или несколько новых N-связанных сайтов. Дополнительные варианты антител предусматривают цистеиновые варианты, где один или несколько остатков цистеина удалены или заменены другой аминокислотой (например, серином) по сравнению с исходной аминокислотной последовательностью. Цистеиновые варианты могут быть применимы, если антитела должны подвергаться повторному фолдингу в биологически активную конформацию, например, после выделения нерастворимых телец включения. Как правило, цистеиновые варианты содержат меньше остатков цистеина, чем нативный белок, и, как правило содержат четное число, чтобы свести к минимуму взаимодействия, обусловленные неспаренными остатками цистеина.

[105] В дополнительных вариантах осуществления варианты антител могут предусматривать антитела, содержащие модифицированный Fc-фрагмент или модифицированную константную область тяжелой цепи. Fc-фрагмент, что означает "фрагмент, который кристаллизуется", или константная область тяжелой цепи могут быть изменены путем мутации для придания антителу измененных характеристик связывания.

См. например, Burton and Woof 1992, *Advances in Immunology* 51: 1-84; Ravetch and Bolland, 2001, *Annu. Rev.* 19: 275-90, Shields et al., 2001, *Journal of Biol. Chem* 276: 6591-6604; Telleman and Junghans, 2000, *Immunology* 100: 245-251; Medesan et al., 1998, *Eur. J. Immunol.* 28: 2092-2100; все из которых включены в данный документ посредством ссылки). Такие мутации могут включать замены, добавления, делеции или любую их комбинацию и, как правило, возникают путем сайт-направленного мутагенеза с применением одного или нескольких мутагенных олигонуклеотидов согласно способам, описанными в данном документе, а также в соответствии с способами, известными из уровня техники (например, см., Sambrook et al., *MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, 3rd Ed., 2001, Cold Spring Harbor, N.Y. и Berger et al., *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Volume 152, *Guide to Molecular Cloning Techniques*, 1987, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., которые включены в данный документ посредством ссылки).

[106] Согласно определенным вариантам осуществления аминокислотные замены могут (1) снижать восприимчивость к протеолизу, (2) снижать восприимчивость к окислению, (3) изменять аффинность связывания и/или (4) придавать или модифицировать другие физико-химические или функциональные свойства таких полипептидов. Согласно определенным вариантам осуществления одна или несколько аминокислотных замен (в определенных вариантах осуществления консервативные аминокислотные замены) могут быть осуществлены во встречающейся в природе последовательности (в определенных вариантах осуществления в части полипептида за пределами домена(-ов), образующего(-их) межмолекулярные контакты). В определенных вариантах осуществления консервативная аминокислотная замена, как правило, по существу не изменяет структурные характеристики исходной последовательности (например, консервативная замена аминокислоты не нарушает или не имеет тенденции к нарушению вторичной структуры, которая характеризует исходную последовательность, такую как спираль). Примеры признанных на уровне техники вторичных и третичных структур полипептидов описаны в *PROTEINS, STRUCTURES AND MOLECULAR PRINCIPLES*, (Creighton, Ed.), 1984, W. H. Freeman and Company, New York; в *INTRODUCTION TO PROTEIN STRUCTURE* (C. Branden and J. Tooze, eds.), 1991, Garland Publishing, New York, N.Y.; и в Thornton et al., 1991, *Nature* 354:105, каждая из которых включена в данный документ посредством ссылки.

[107] В настоящем изобретении представлены антитела, которые содержат тяжелую цепь и легкую цепь, где тяжелая и легкая цепи вместе образуют антигенсвязывающую структуру, способную специфически связывать Mcl-1. Полноразмерная тяжелая цепь предусматривает домен переменной области V_H и три домена константной области C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Как правило, домен V_H находится на аминоконце полипептида, а домен C_H находится на карбоксильном конце. Применяемый в данном документе термин "тяжелая цепь" охватывает полноразмерную тяжелую цепь и ее фрагменты. Полноразмерная легкая цепь предусматривает домен переменной области V_L и домен константной области C_L . Как и в случае тяжелой цепи, домен переменной

области легкой цепи, как правило, находится на аминоконце полипептида. Применяемый в данном документе термин "легкая цепь" охватывает полноразмерную легкую цепь и ее фрагменты. "F(ab)-фрагмент" состоит из одной легкой цепи, и C_{H1}, и переменных областей одной тяжелой цепи. Тяжелая цепь молекулы F(ab) не может образовывать дисульфидную связь с другой молекулой тяжелой цепи. F(ab)-фрагмент содержит одну легкую цепь и одну тяжелую цепь, которая содержит большую часть константной области между доменами C_{H1} и C_{H2}, так что между двумя тяжелыми цепями может образовываться межцепочечная дисульфидная связь с образованием молекулы F(ab')₂. Область F_v содержит переменные области как из тяжелой, так и из легкой цепей, но лишена константных областей. Одноцепочечные антитела представляют собой молекулы F_v, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей были соединены гибким линкером с образованием одной полипептидной цепи, которая образует антигенсвязывающую область. Одноцепочечные антитела подробно рассматриваются в WO 88/01649 и патентах США №№ 4946778 и 5260203, включенных в данный документ в соответствующей части посредством ссылки.

[108] Следующие примеры представлены для иллюстрации и не предназначены для ограничения объема объекта изобретения, раскрытого в данном документе.

Примеры

Пример 1

Иммунизация кроликов. Направленное сохранение клональной экспансии у кроликов (CEDR): сбор, сортировка, получение образцов надосадочной жидкости и лизатов

[109] Кроликов иммунизировали с помощью Mcl-1 с применением протокола, который является стандартным в данной области техники. Селезенки животных собирали, диссоциировали и замораживали. Размороженные иммунные клетки кролика подвергали зондированию с помощью биотинилированного Mcl-1 и стрептавидина, конъюгированного с Alexa Fluor 647, а также антитела к IgG кролика, конъюгированному с Alexa Fluor 488, для выявления клеток, экспрессирующих антитела к Mcl-1. Затем обнаруженные клетки сортировали на FACS Aria III в 384-луночные планшеты, содержащие 100 мкл/луночка среды RPMI, дополненной FBS, 10% надосадочной жидкостью активированных спленоцитов кролика (TSN) и питающей культурой клеток. После 7 дней в моноклональной культуре и размножения В-клеток образцы надосадочной жидкости культуры собирали для последующих анализов и В-клетки кролика лизировали для секвенирования и рекомбинантного синтеза последовательностей антител.

[110] Наиболее высокоаффинные, Mcl-1-селективные, иллюстративные антитела из каждой группы эпитопов (см. фигуру 4) отбирали для клонирования и экспрессии. Эти антитела подвергли иммуногистохимическому анализу (ИНС), который выявил антитела 11P5 и 11B14 к Mcl-1.

[111] Для рекомбинантного синтеза антител из лизированных В-клеток лизат первоначально очищали с применением набора для очистки мРНК Catcher PLUS

(Invitrogen/Thermo Fisher). После этого этапа очищения синтезировали кДНК и амплифицировали последовательности антител с применением праймеров, специфических в отношении IgG кролика. Последовательности антител подвергали анализу и уникальные последовательности отбирали для клонирования. Последовательности клонировали в вектор экспрессии рТТ5 и обеспечивали экспрессию в клетках НЕК293Т с применением системы временной трансфекции 293fectin, следуя процедуре, предоставленной производителем (Thermo Fisher). Для подтверждения того, что очищенные антитела селективно связывают белок Mcl-1, применяли ИНС-анализы. Антитело 11P5 к Mcl-1 отбирали для разработки сопутствующей диагностики (CDx).

ТАБЛИЦА 2 (праймеры)

Праймеры для ПЦР-амплификации VK кролика	Последовательность в направлении от 5' до 3'	Идентификатор последовательности
Rab Cκ, AS-RT праймер Vκ кролика	5' CCA GGT GAC GGT 3'	34
Rab Vκ 5'UTR, S-внешний праймер VK кролика	5' AG[GA] ACC CAG CAT GGA CA[CT] [CGA]A 3'	35
Rab Cκ, AS-внешний праймер Vκ кролика	5' GGA [TC][AG]G [AT]AT TTA TT[CT] GCC AC[GA] CAC A 3'	36
Праймеры для ПЦР-амплификации VH кролика		
Rab Cγ CH1, AS-RT-праймер Vγ кролика	5' TGC CCG AGT TCC A 3'	37
Rab VH 5'UTR, S-внешний праймер VH кролика	5' AGA C[GA]C TCA CCA TGG AGA CT 3'	38
Rab Cγ, AS-внешний праймер Vγ кролика	5' ACT GGC TCC GGG AGG TA 3'	39

Пример 2

Исследование белка Mcl-1 посредством ELISA

[112] Образцы надосадочной жидкости культуры клеток из В-клеток, выделенных от иммунизированных кроликов, содержащие кроличьи моноклональные антитела, подвергали скринингу на связывание с белком Mcl-1 посредством иммуноферментного анализа (ELISA). Лунки планшетов для связывания среды сначала покрывали нейтравидином в течение ночи при 4°C, промывали 3 раза по 90 мкл PBS с применением устройства для промывания планшетов BioTek, а затем блокировали аналитическим разбавителем 1% молоко/1 x PBS. Затем биотинилированный Mcl-1 иммобилизовали в лунках покрытых нейтравидином планшетов для связывания среды и промывали 3 раза с

помощью PBS. Образцы надосадочной жидкости, полученные в результате CEDR у кроликов, затем добавляли в разбавлении 1:5 в 50 мкл объема анализируемой пробы в течение одного часа при комнатной температуре (RT). Связанные антитела затем выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) вторичных антител козы к Ig кролика (Jackson ImmunoResearch) и субстрата 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (TMB) (Neogen), следуя протоколу, установленному производителем. Лунки планшетов подвергали измерениям поглощающей способности при 450 нм в планшет-ридере. Порогом связывания с иммобилизованным Mcl-1 в этом анализе было трехкратное увеличение поглощающей способности по сравнению со значением поглощающей способности, измеренным в лунке, в которую был добавлен нерелевантный (т. е. контрольный) образец надосадочной жидкости от кролика.

Пример 3

Анализ подсчета Bcl-2/Bcl-xL

[113] Антитела, связывающие Mcl-1, оценивали на перекрестную реактивность в отношении Bcl-2 и Bcl-xL посредством ELISA. Вкратце, белки Bcl-2 и Bcl-xL отдельно покрывали в лунках планшетов для связывания среды в течение одного часа при 37°C, промывали 3 раза по 90 мкл PBS с применением устройства для промывания планшетов BioTek, а затем блокировали аналитическим разбавителем 1% молоко/1 x PBS. Образцы надосадочной жидкости, полученные в результате CEDR у кроликов, затем добавляли в лунки в течение одного часа при к. т. Связанные антитела затем выявляли с помощью конъюгированных с пероксидазой хрена (HRP) вторичных антител козы к Ig кролика (Jackson ImmunoResearch) и субстрата TMB (Neogen), следуя протоколу, установленному производителем. Лунки планшетов подвергали измерениям поглощающей способности при 450 нм в планшет-ридере. Порогом связывания с иммобилизованным Bcl-2 или Bcl-xL в этом анализе было трехкратное увеличение поглощающей способности по сравнению со значением поглощающей способности, измеренным в лунке, в которую был добавлен нерелевантный (т. е. контрольный) образец надосадочной жидкости от кролика.

Пример 4

Эпитоп-специфическая сортировка (относительная эпитоп-специфическая сортировка/относительное профилирование)

[114] Распространенным способом определения характеристик эпитопов являются эксперименты по изучению конкуренции. Антитела, которые конкурируют друг с другом, можно рассматривать как связывающие один и тот же или перекрывающийся сайт на мишени. В данном примере описан способ определения конкуренции за связывание с Mcl-1 и описаны результаты способа при применении к ряду антител.

[115] Эксперименты по сортировке можно выполнять посредством ряда способов, и используемый способ может повлиять на результаты анализа. В описанных в данном документе экспериментах по сортировке Mcl-1 связывался одним эталонным антителом, а зондирование проводили с помощью другого. Если эталонное антитело препятствовало связыванию антитела-зонда, антитела относили к одной и той же группе. Порядок, в

котором использовались антитела, имеет важное значение. Если антитело А использовали в качестве эталонного антитела и оно блокировало связывание антитела В, обратное не всегда верно, антитело В, применяемое в качестве эталонного антитела, не обязательно блокирует связывание антитела А с мишенью. В этом случае действует ряд факторов, связывание антитела может вызвать конформационные изменения в мишени, которые препятствуют связыванию второго антитела, или эпитопы, которые перекрываются, но не полностью закрывают друг друга, могут обеспечить второму антителу все еще достаточно высокоаффинное взаимодействие с мишенью для обеспечения связывания. В общем, если конкуренция наблюдается в любом порядке, считается, что антитела блокируют друг друга, а если оба антитела могут блокировать друг друга, то, скорее всего, эпитопы перекрываются более полно.

[116] В эксперименте, описанном в данном примере, для определения высокопроизводительным способом относительных профилей эпитоп-специфической сортировки Mcl-1-специфических антител применялся модифицированный анализ конкуренции антитело-антитело. Вкратце, каждое отдельное антитело исследовали на способность конкурировать за связывание с панелью эталонных антител, выбранных из более ранней кампании по CEDR для Mcl-1, которые отличались последовательностью. Затем определяли характер конкуренции/связывания каждого исследуемого антитела с панелью эталонных антител и сравнивали с таковыми, полученными от других исследуемых антител. Затем сравнивали степень корреляции между профилями конкуренции/связывания отдельных исследуемых антител. Антитела, которые показали схожие профили конкуренции/связывания, были объединены (сгруппированы) вместе (например, профиль сортировки А, В и т. д.).

[117] Биотинилированный белок Mcl-1 объединяли с покрытыми стрептавидином, имеющими уникальный штрих-код гранулами LumAvidin (Luminex Corporation) в течение 30 минут в темноте при к. т. и дважды промывали с помощью PBS+2% FBS (буфер FACS), осаждая гранулы центрифугированием. Образцы надосадочной жидкости эталонных антител инкубировали с покрытыми антигеном гранулами в течение часа в темноте при к. т. и промывали три раза. Гранулы ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем StabilGuard[®] для блокировки сайтов неспецифического связывания (Surmodics). Покрытые антигеном гранулы, с которыми были связаны эталонные антитела, объединяли, а затем делили в отдельных лунках для образцов, содержащие образец исследуемого антитела (образец надосадочной жидкости, полученный в результате CEDR) (или отрицательный контроль). Гранулы и исследуемые антитела инкубировали в течение одного часа в темноте при к. т. и дважды промывали. Затем образцы инкубировали с фрагмент-специфическим антителом для обнаружения Alexa Fluor[®] 488 IgG в течение 15 минут в темноте при к. т., промывали один раз и ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением платформы iQue[™] Screener Platform (Intellicyt).

[118] Для определения профилей конкурирования/связывания антитела для отдельных тестируемых антител сигнал связывания только для эталонного антитела

вычитали из сигнала для эталонного антитела с тестируемым антителом для каждой реакции конкурирования/связывания (т. е. по всему набору эталонных антител). Профиль связывания отдельного антитела определяли как совокупность чистых значений связывания для каждой реакции конкуренции/связывания. Затем степень сходства между отдельными профилями оценивали путем расчета коэффициента корреляции между каждым из профилей исследуемых антител. Исследуемые антитела, демонстрирующие более высокие степени сходства друг с другом, затем были сгруппированы в общие профили сортировки. Отдельные профили сортировки проявляли низкую степень корреляции. С применением этого способа Mcl-1-связывающие антитела подразделяют на 5 уникальных профилей сортировки.

Пример 5

Анализ с предельным связыванием антигенов (ранжирование аффинности)

[119] Для оценки силы взаимодействия антитела и антигена (относительной аффинности связывания) образцы надосадочной жидкости, полученные в результате CEDR, специфические в отношении Mcl-1, исследовали в анализе с предельным связыванием антигенов. Титрованное небольшое количество биотинилированного белка Mcl-1 инкубировали с покрытыми стрептавидином гранулами LumAvidin Beads[®] (Luminex Corporation) в течение 30 минут в темноте при к. т., а затем дважды промывали буфером для FACS, осаждая гранулы центрифугированием. Гранулы ресуспендировали в буфере для FACS, содержащем StabilGuard[®] (Surmodics). Затем антиген-связанные гранулы инкубировали с образцом надосадочной жидкости, полученной в результате CEDR, в течение 18 часов в темноте при к. т., дважды промывали буфером для FACS, инкубировали с фрагмент-специфическим антителом для обнаружения Alexa Fluor[®] 488 IgG в течение 15 минут в темноте при к. т., один раз промывали и, наконец, ресуспендировали в буфере для FACS. Образцы анализировали с применением платформы iQue[™] Screener Platform (Intellicyt). В этом способе анализа степень сигнала связывания антитела с мишенью (Mcl-1) коррелирует с измеренной интенсивностью флуоресценции и, таким образом, позволяет проводить относительное сравнение значений аффинности по всей панели.

[120] Каждый из литературных источников, процитированный в данном документе, настоящим включен посредством ссылки во всей своей полноте или в соответствующей части, что будет очевидно из контекста цитирования.

[121] Следует понимать, что хотя заявляемый объект изобретения был описан в сочетании с его подробным описанием, предшествующее описание предназначено для иллюстрации и не ограничивает объем такого заявляемого объекта изобретения, который определяется объемом прилагаемой формулы изобретения. Другие аспекты, преимущества и модификации находятся в пределах объема нижеприведенной формулы изобретения.

Пример 6

Иммуногистохимические анализы

[122] Для оценки экспрессии Bcl-2 и Bcl-xL посредством ИHC применяли коммерчески доступные иммуногистохимические (ИHC) реагенты. Было показано, что моноклональное антитело 11P5 к Mcl-1, раскрытое в данном документе, чувствительным образом и специфически связывается с Mcl-1, в том числе в линиях опухолевых клеток, цельных тканях и декальцинированных образцах костной ткани. Измерение уровня экспрессии Bcl-2 осуществляли с помощью моноклонального антитела к Bcl-2 (номер по каталогу MO887) IgG1 клона 124 мыши (Agilent DAKO) в концентрации 10 мкг/мл. Отрицательный квалифицированный контроль получали путем зондирования ткани семенника. Уровень экспрессии Bcl-xL измеряли с применением моноклонального антитела к Bcl-xL (номер по каталогу 2764) IgG клона 54H6 кролика (Cell Signaling Technology) при разбавлении 1:400. Отрицательный квалифицированный контроль включает зондирование миометральной ткани матки. Измерение экспрессии Mcl-1 выполняли с помощью кроличьего антитела IgG к Mcl-1 (Amgen) в концентрации 0,25 мкг/мл. Отрицательные квалифицированные контроли предусматривали зондирование тканей семенника и матки, а также линию клеток SKMM2.

[123] Восемь линий опухолевых клеток анализировали с применением моноклональных антител к Mcl-1 для оценки уровней экспрессии Mcl-1 посредством иммуногистохимического анализа. Результаты, представленные на фигурах 6-11, демонстрируют, что антитела 4019, 5H16, 6A3, 11P5 и 11B14 к Mcl-1 характеризуются иммунореактивностью в отношении Mcl-1 в линиях опухолевых клеток. Кроме того, антитела к Mcl-1 характеризуются варьирующими степенями иммунореактивности в отношении уровня экспрессии Mcl-1 в линиях опухолевых клеток, причем линия клеток AMO1 (А на фигурах) характеризуется наиболее высоким уровнем экспрессии, а линия клеток SKMM2 (Н на фигурах) характеризуется самым низким уровнем экспрессии (экспрессия Mcl-1 упорядочена по рангам на фиг. 16). На фиг. 10 и 11 продемонстрировано, что антитела 4019, 11P5 и 11B14 демонстрируют более сильную иммунореактивность по сравнению с антителами 5H16 и 6A3 и поэтому были отобраны для дальнейшего определения характеристик в цельных тканях. На фиг. 12 и 13 продемонстрировано, что 11P5 и 11B14 (фиг. 12), в отличие от 4019 (фиг. 13), соответствующим образом обеспечивают иммуноокрашивание лимфоцитов миндалин. На фиг. 14 и 15 продемонстрировано, что антитело 11P5 демонстрирует более сильное иммуноокрашивание Mcl-1 в клетках костного мозга (фиг. 14), чем антитело 11B14 (фиг. 15). На фиг. 17, 18, 19 и 20 продемонстрировано, что антитело 11P5 превосходит 11B14 в обнаружении Mcl-1 посредством иммуногистохимического анализа в лимфоидной ткани (миндалины и костный мозг, фиг. 17-19), а также в декальцинированной ткани (костный мозг, фиг. 20).

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело к Mcl-1 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие последовательность определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, последовательность определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 5, последовательность определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 6, последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 16 (HCDR1), последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 17 (HCDR2) и последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи под SEQ ID NO: 18 (HCDR3) или содержащие последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 11, последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 22, последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 23 и последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 24.

2. Антитело по п. 1, содержащее последовательность варибельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27 или SEQ ID NO: 31.

3. Антитело по п. 1, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 28 или SEQ ID NO: 32.

4. Антитело по п. 3, дополнительно содержащее последовательность варибельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27, если последовательность варибельной области тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 28, или SEQ ID NO: 31, если последовательность варибельной области тяжелой цепи изложена под SEQ ID NO: 32.

5. Антитело или фрагмент по п. 1, где антитело или фрагмент представляет собой одноцепочечное антитело или фрагмент.

6. Фрагмент антитела по п. 5, содержащийся в одноцепочечном варибельном фрагменте (scFv).

7. Фрагмент антитела по п. 5, где фрагмент антитела представляет собой

(a) scFv;

(b) Fab или

(c) (Fab')₂.

8. Антитело или его фрагмент по п. 1, которые являются полностью человеческими.

9. Антитело или его фрагмент по п. 1, которые представляют собой антитело или фрагмент изотипа иммуноглобулина G (IgG).

10. Антитело или его фрагмент по п. 1 в форме моноклонального антитела.

11. Антитело или его фрагмент по п. 1 в форме биспецифического антитела, триспецифического антитела, одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями одноцепочечного варибельного фрагмента (ds-scFv), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), диатела, триатела, тетраатела, минитела, Fab, F(ab')₂, фрагмента VH/VH, пептитела,

химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифического привлекающего Т-клетки активатора (BiTE).

12. Фармацевтическая композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель и терапевтически эффективное количество антитела или его антигенсвязывающего или иммунологически функционального фрагмента иммуноглобулина по п. 1.

13. Способ мониторинга лечения раковой клетки у субъекта, включающий:

(а) приведение клетки субъекта в контакт с антителом или его фрагментом по п. 1;

(b) обнаружение связывания антитела или его фрагмента с клеткой или ее содержимым;

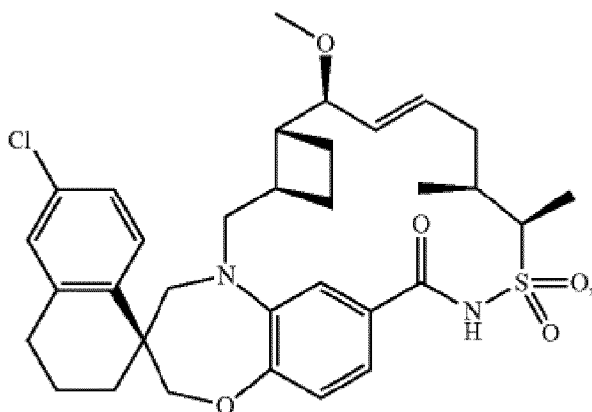
(с) определение уровня Mcl-1 в клетке и

(d) сравнение уровня Mcl-1 в клетке с контролем, где контроль представляет собой известный уровень Mcl-1, характерный для отличной от раковой клетки, уровень Mcl-1 в нераковой клетке субъекта или уровень Mcl-1 в раковой клетке субъекта в другой момент времени.

14. Способ по п. 13, где мониторинг включает анализ, который представляет собой ELISA, конкурентный ELISA, анализ поверхностного плазмонного резонанса, анализ нейтрализации *in vitro*, анализ нейтрализации *in vivo*, иммуногистохимический анализ с сортировкой FACS или иммуногистохимический анализ без сортировки FACS.

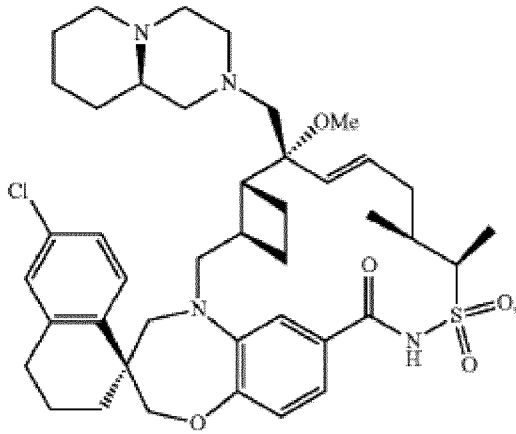
15. Способ по п. 13, где раковая клетка представляет собой клетку лейкоза, клетку лимфомы или клетку миеломы.

16. Способ по п. 13, где лечение рака включает введение AMG 176 формулы I:



I.

17. Способ по п. 13, где лечение рака включает введение AMG 397 формулы II:



II.

18. Способ по п. 13, где раковая клетка представляет собой клетку миелоидного лейкоза.

19. Способ по п. 13, где раковая клетка представляет собой клетку органного рака.

20. Способ по п. 13, где антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, последовательность определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 5, последовательность определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 6, последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 16, последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (HCDR2) под SEQ ID NO: 17 и последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HCDR3) под SEQ ID NO: 18, или антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 11, последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 22, последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 23 и последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 24.

21. Способ по п. 13, где антитело или его фрагмент содержит последовательность вариабельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27, последовательность вариабельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 28 или вариабельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 31 и вариабельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 32.

22. Способ по п. 13, где антитело или его фрагмент представлены в форме одноцепочечного антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), scFv, Fab, F(ab')₂, биспецифического антитела, триспецифического антитела, одноцепочечного вариабельного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями одноцепочечного вариабельного фрагмента (ds-scFv), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), диатела, триатела, тетратела, минитела, Fab, F(ab')₂, фрагмента V_HH/V_H, пептитела, химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифического привлекающего Т-клетки активатора (BiTE).

23. Способ лечения рака у субъекта, включающий введение субъекту терапевтически эффективного количества антитела к Mcl-1 или его фрагмента по п. 1.

24. Способ по п. 23, где раковая клетка представляет собой клетку лейкоза, клетку лимфомы или клетку миеломы.

25. Способ по п. 23, где раковая клетка представляет собой клетку миелоидного лейкоза.

26. Способ по п. 23, где раковая клетка представляет собой клетку органного рака.

27. Способ по п. 23, где антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность определяющей комплементарности области 1 легкой цепи (LCDR1) под SEQ ID NO: 4, последовательность определяющей комплементарности области 2 легкой цепи (LCDR2) под SEQ ID NO: 5, последовательность определяющей комплементарности области 3 легкой цепи (LCDR3) под SEQ ID NO: 6, последовательность определяющей комплементарности области 1 тяжелой цепи (HCDR1) под SEQ ID NO: 16, последовательность определяющей комплементарности области 2 тяжелой цепи (HCDR2) под SEQ ID NO: 17 и последовательность определяющей комплементарности области 3 тяжелой цепи (HCDR3) под SEQ ID NO: 18, или антитело или его фрагмент представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент, содержащие последовательность LCDR1 под SEQ ID NO: 10, последовательность LCDR2 под SEQ ID NO: 11, последовательность LCDR3 под SEQ ID NO: 12, последовательность HCDR1 под SEQ ID NO: 22, последовательность HCDR2 под SEQ ID NO: 23 и последовательность HCDR3 под SEQ ID NO: 24.

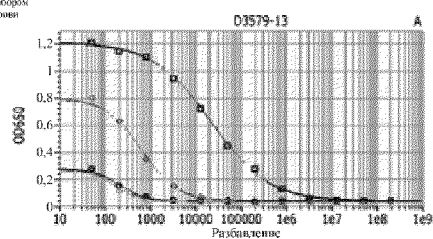
28. Способ по п. 23, где антитело или его фрагмент содержит последовательность варибельной области легкой цепи под SEQ ID NO: 27, последовательность варибельной области тяжелой цепи под SEQ ID NO: 28 или варибельную область легкой цепи под SEQ ID NO: 31 и варибельную область тяжелой цепи под SEQ ID NO: 32.

29. Способ по п. 23, где антитело или его фрагмент представлены в форме одноцепочечного антитела, одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), scFv, Fab, F(ab')₂, биспецифического антитела, триспецифического антитела, одноцепочечного варибельного фрагмента (scFv), стабилизированного дисульфидными связями одноцепочечного варибельного фрагмента (ds-scFv), однодоменного антитела (sdAb), одноцепочечного Fab-фрагмента (scFab), диатела, триатела, тетратела, минитела, Fab, F(ab')₂, фрагмента V_HH/V_H, пептитела, химерного антигенного рецептора (CAR) или биспецифического привлекающего Т-клетки активатора (BiTE).

По доверенности

Образцы раннего забора крови

Кровяк(и)	Дата	мл	Титр
I3643	03/22/17	5	541700
I3645	03/22/17	5	4900
I3643	Перед забором крови	5	<50
I3645	Перед забором крови	5	<50

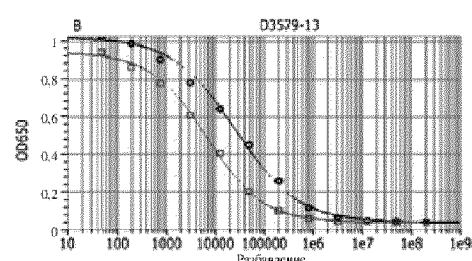


Аппроксимация Log-Log: $y = (A - B) / (1 + (C/x)^D)$

	A	B	C	D	R ²
● I3643, перед забором крови (образец 1): Концентрация в сравнении со значениями	0.28	1.49	217	0.038	0.922
□ I3643, 3/22/17 (образец 2): Концентрация в сравнении со значениями	1.21	0.681	2.15e+04	0.0398	0.988
○ I3645, перед забором крови (образец 3): Концентрация в сравнении со значениями	0.268	1.64	174	0.0381	0.871
■ I3645, 3/22/17 (образец 4): Концентрация в сравнении со значениями	0.806	1.06	617	0.0387	0.983

Образцы позднего забора крови

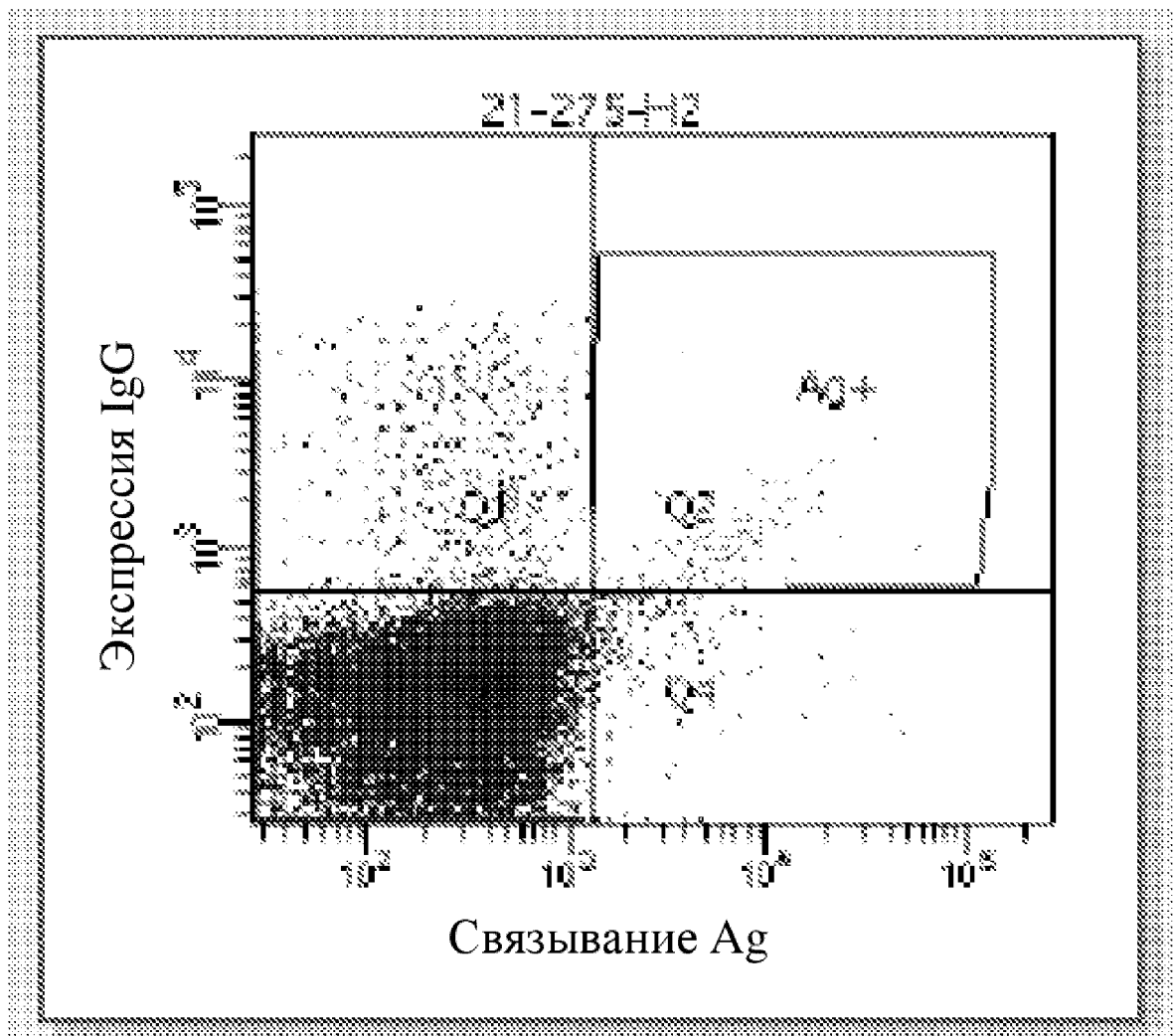
Кровяк(и)	Дата	мл	Титр
I3643	05/10/17	5	661200
I3645	05/10/17	5	122200



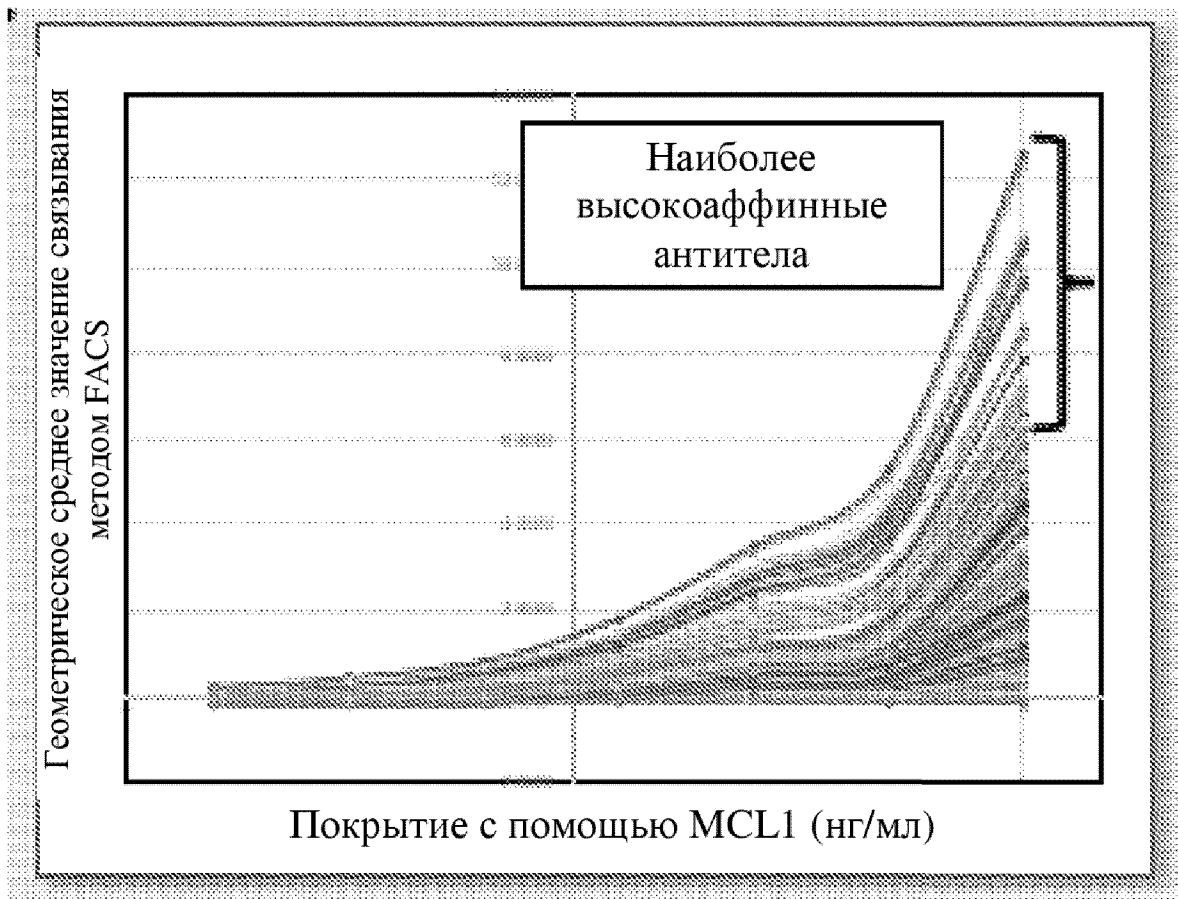
Аппроксимация Log-Log: $y = (A - B) / (1 + (C/x)^D)$

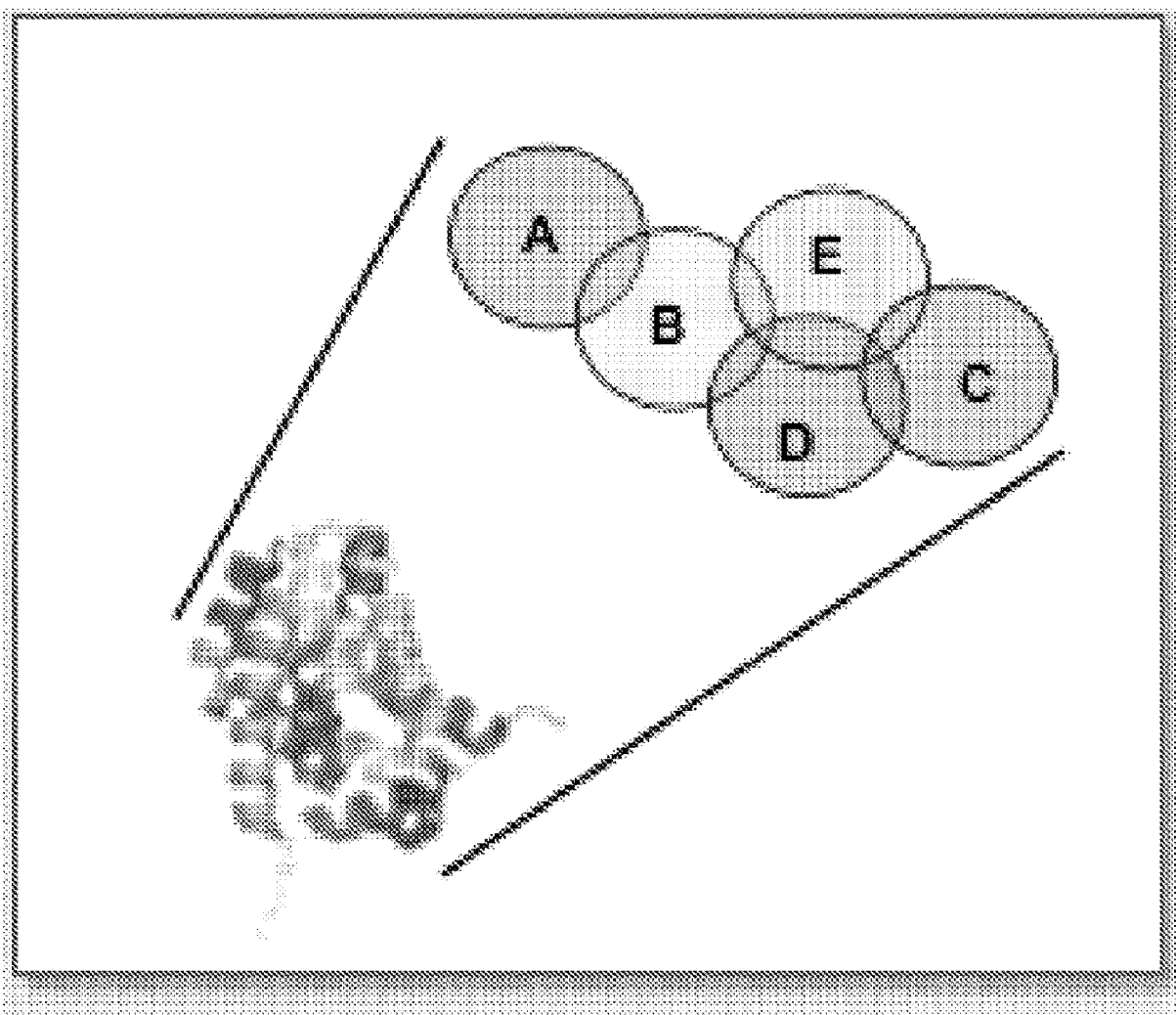
	A	B	C	D	R ²
● I3643, 5/10/17 (образец 1): Концентрация в сравнении со значениями	1.03	0.677	2.58e+04	0.0384	0.978
□ I3645, 5/10/17 (образец 2): Концентрация в сравнении со значениями	0.945	0.76	0.79e+03	0.0384	0.993

Фигура 1



Фигура 2

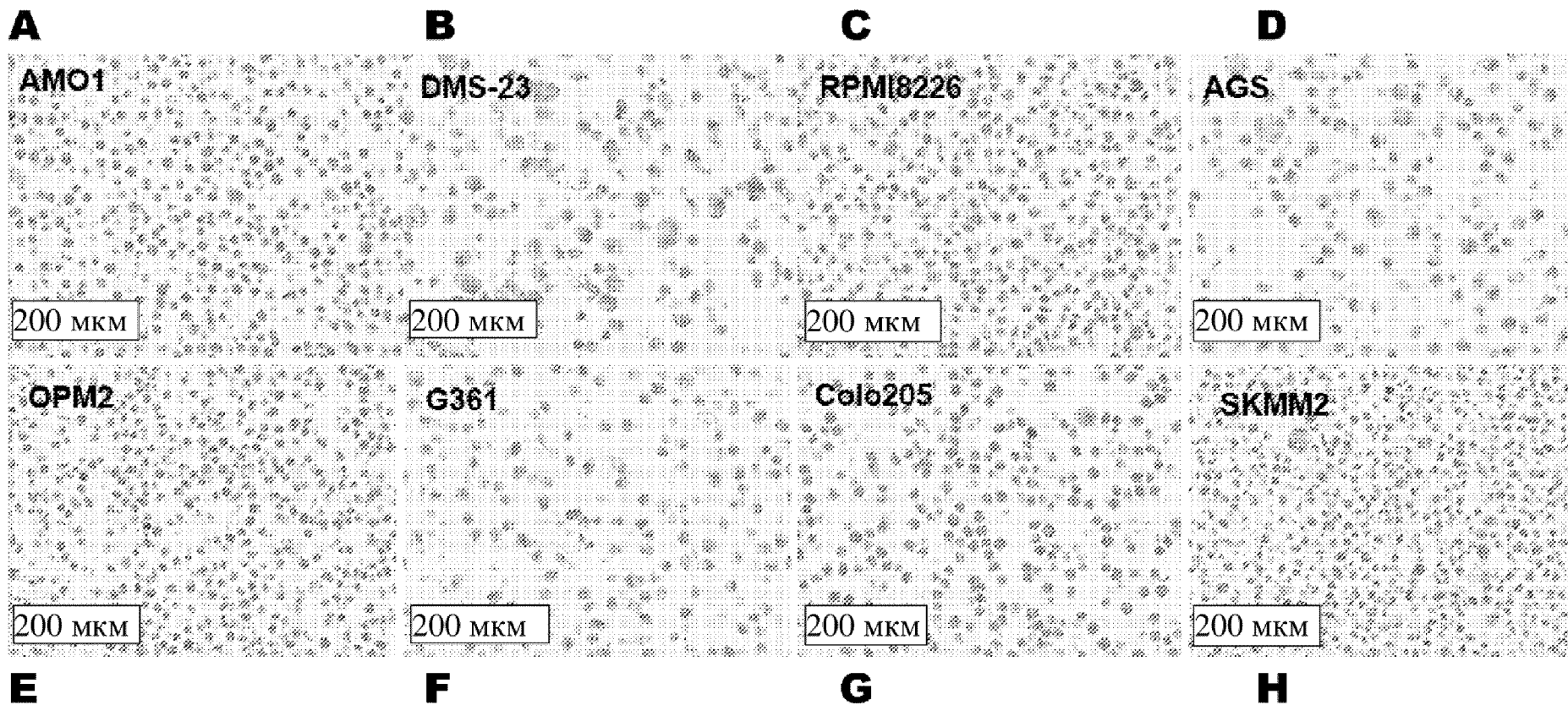
**Фигура 3**



Фигура 4

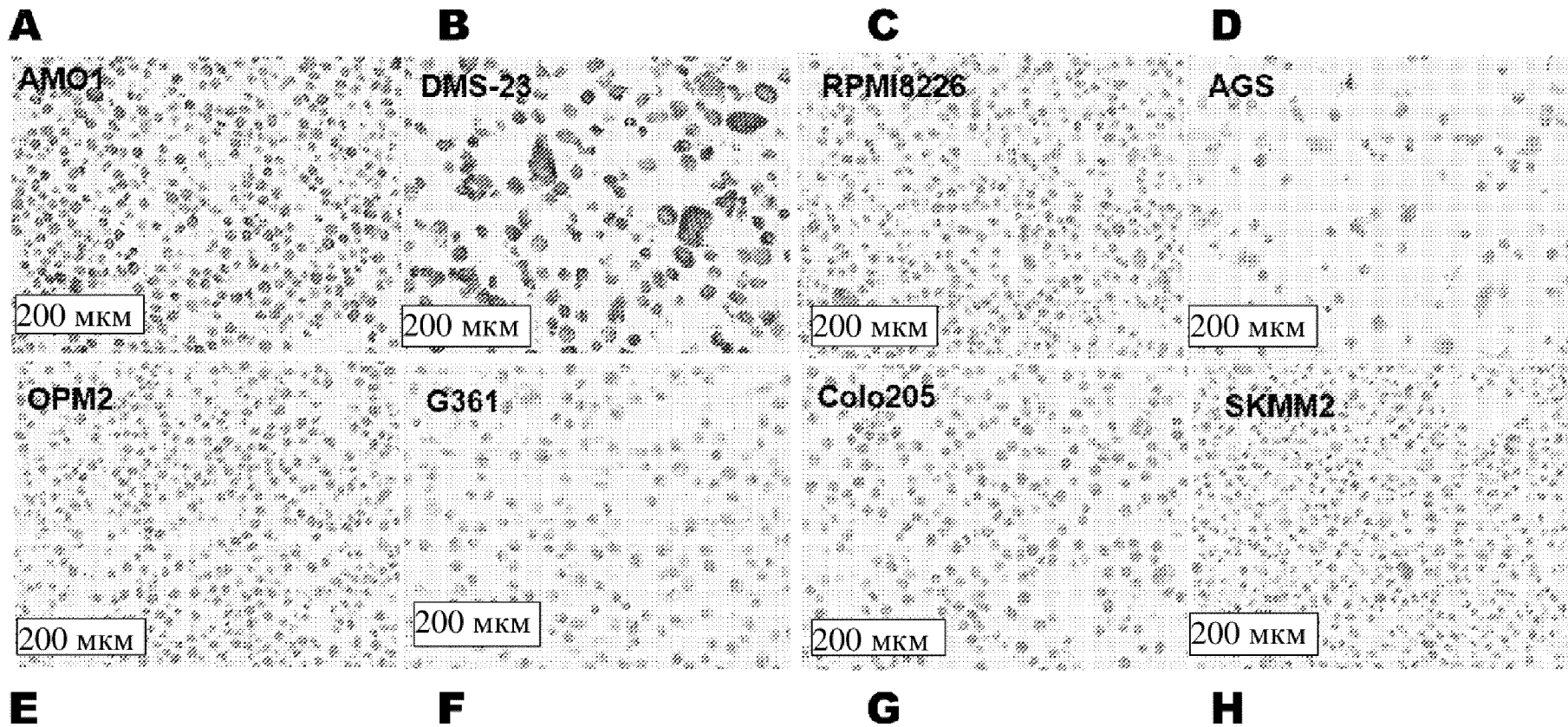


Фигура 5



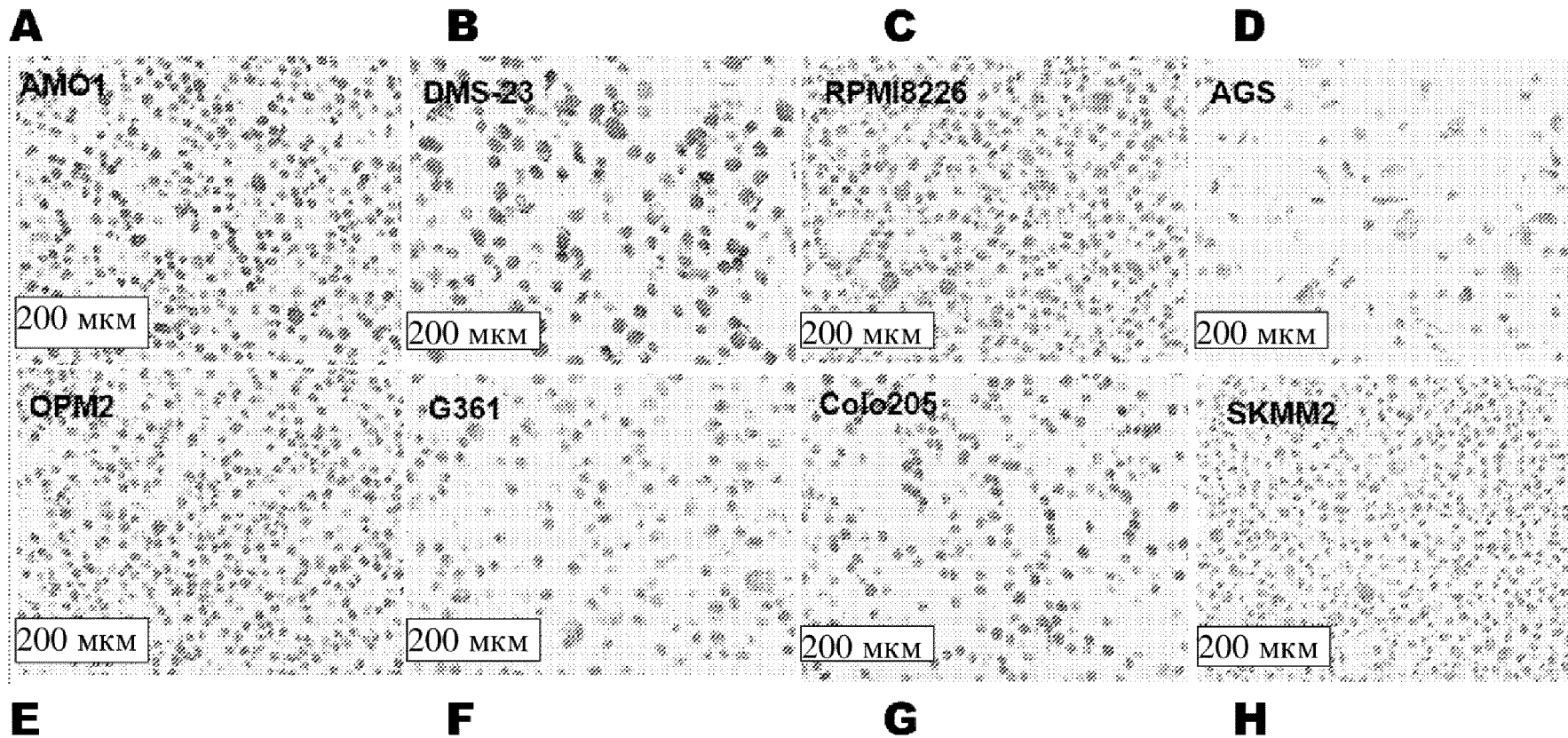
6/24

Фигура 6



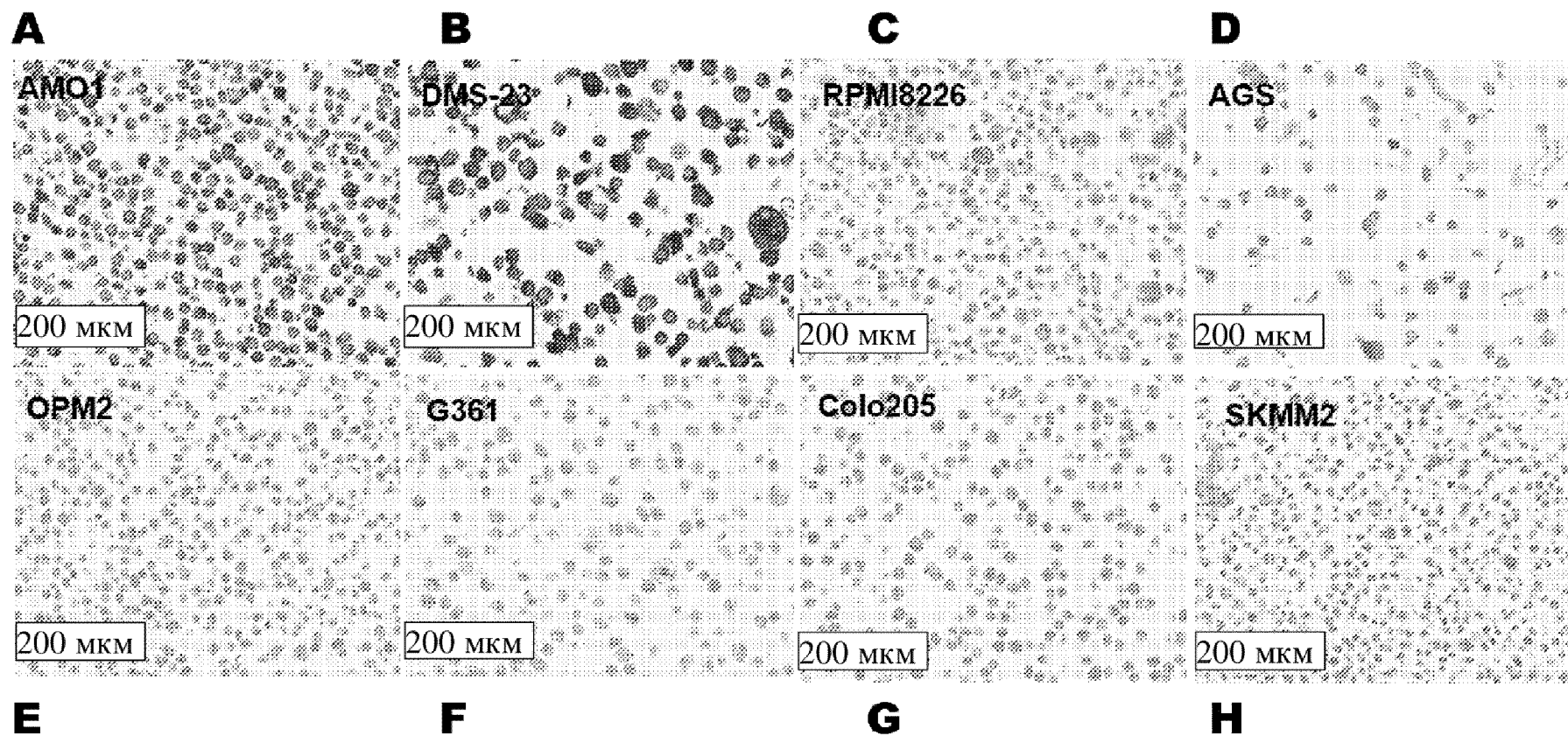
7/24

Фигура 7



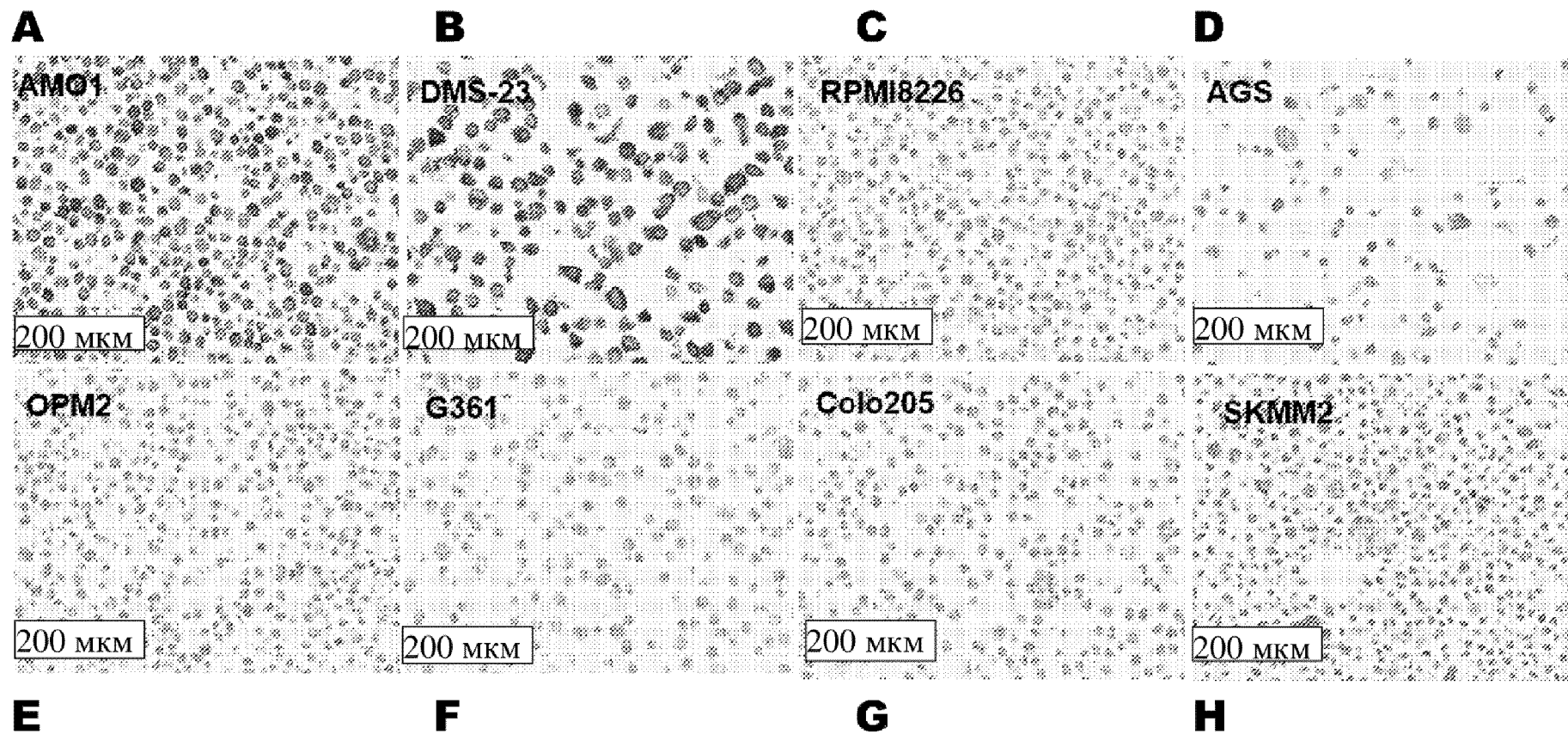
8/24

Фигура 8



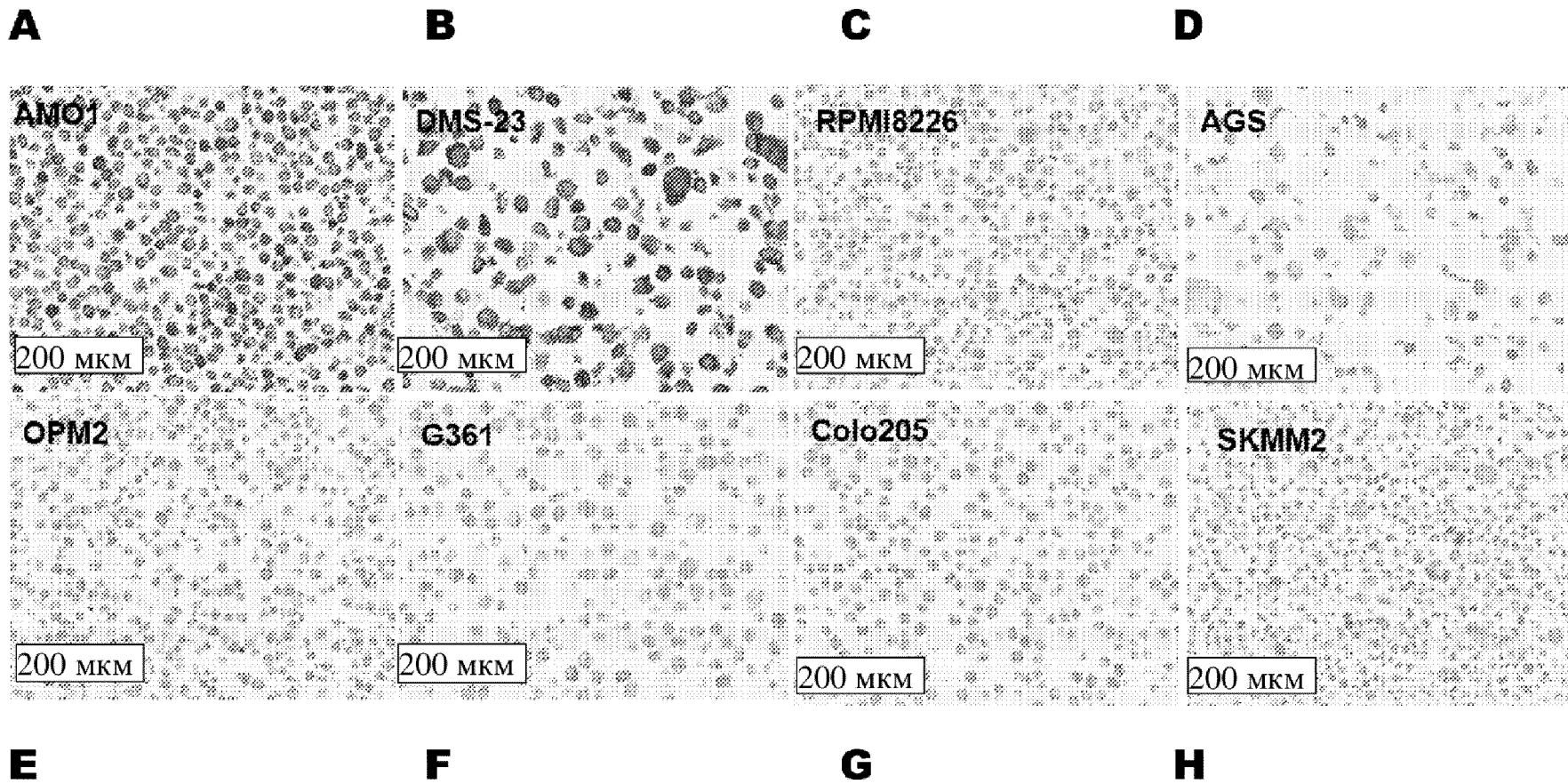
9/24

Фигура 9



10/24

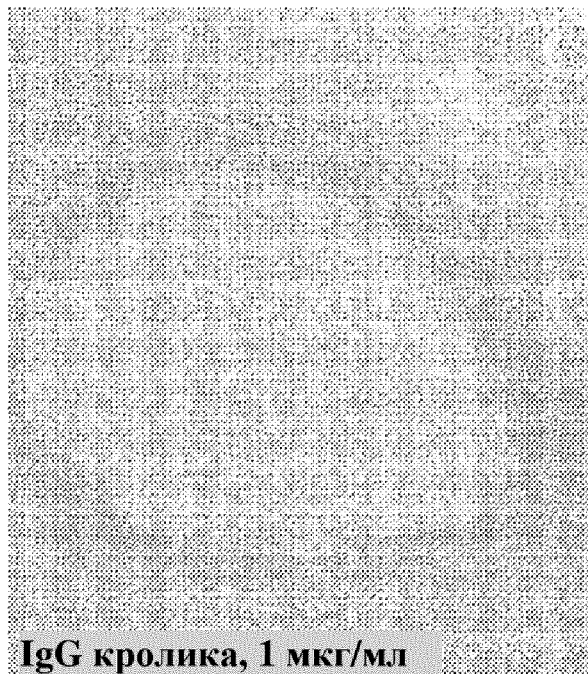
Фигура 10



11/24

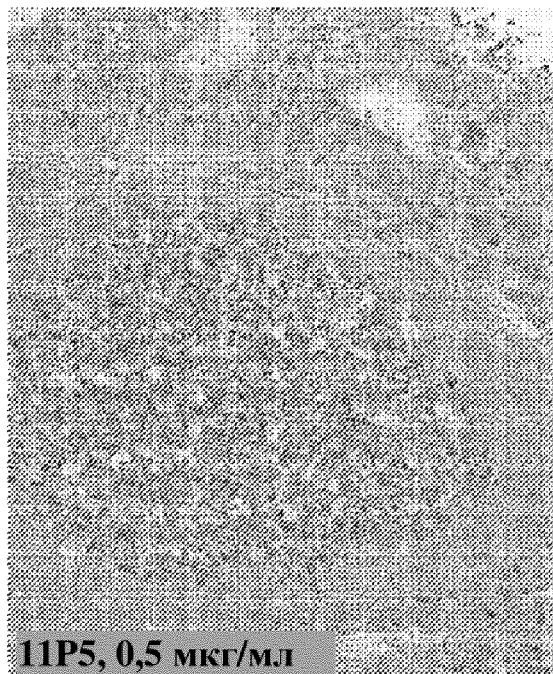
Фигура 11

A



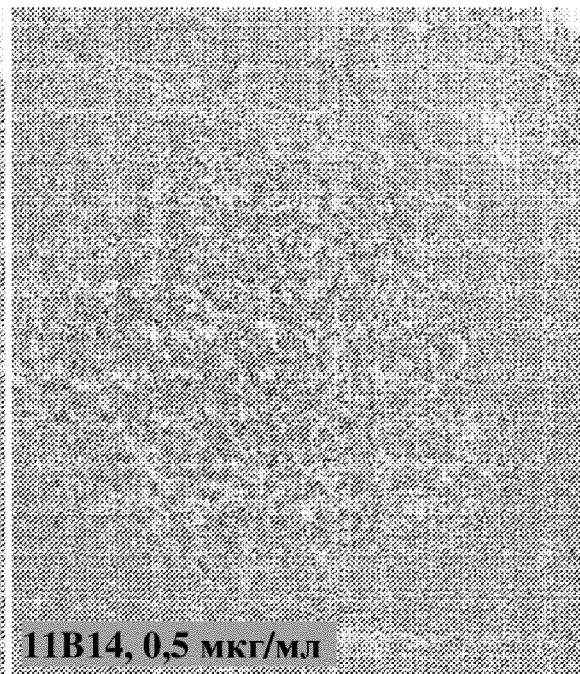
IgG кролика, 1 мкг/мл

B



11P5, 0,5 мкг/мл

C



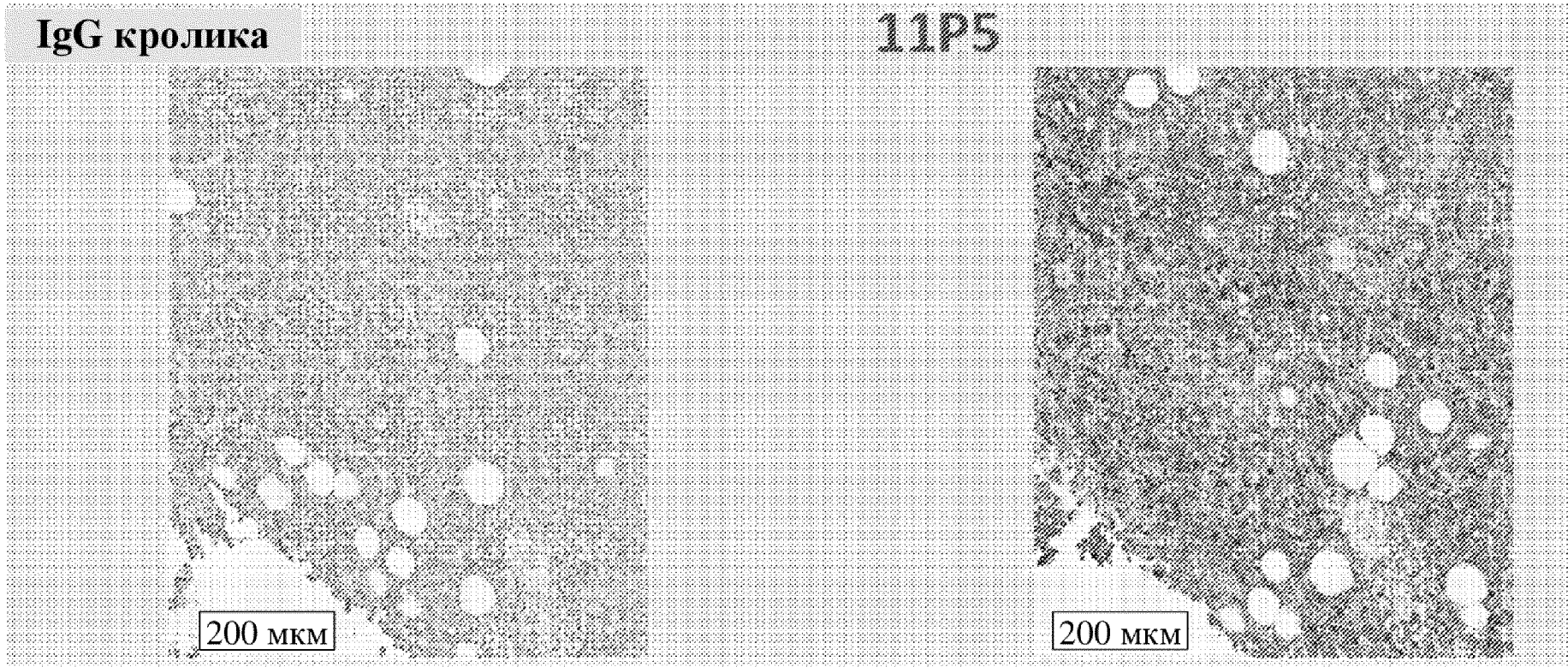
11B14, 0,5 мкг/мл

12/24

Фигура 12

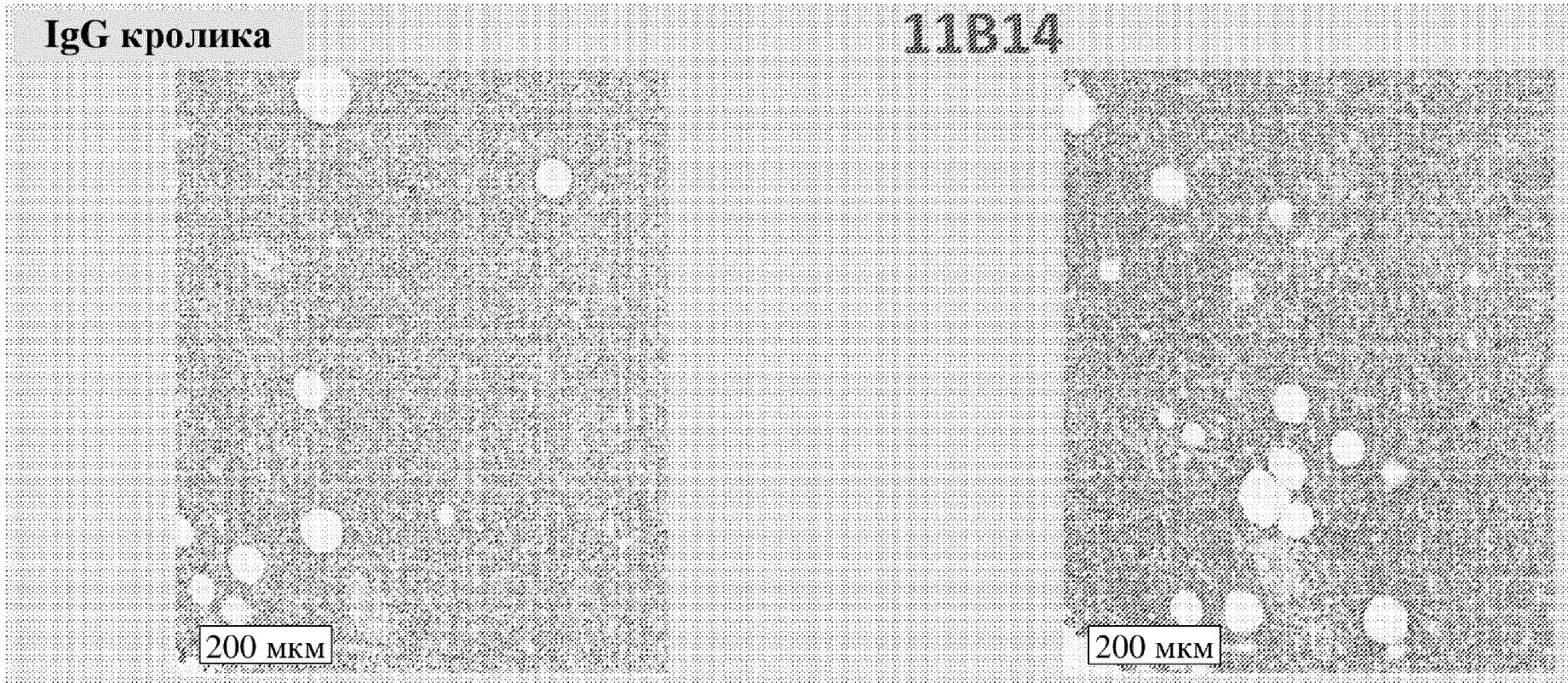


Фигура 13



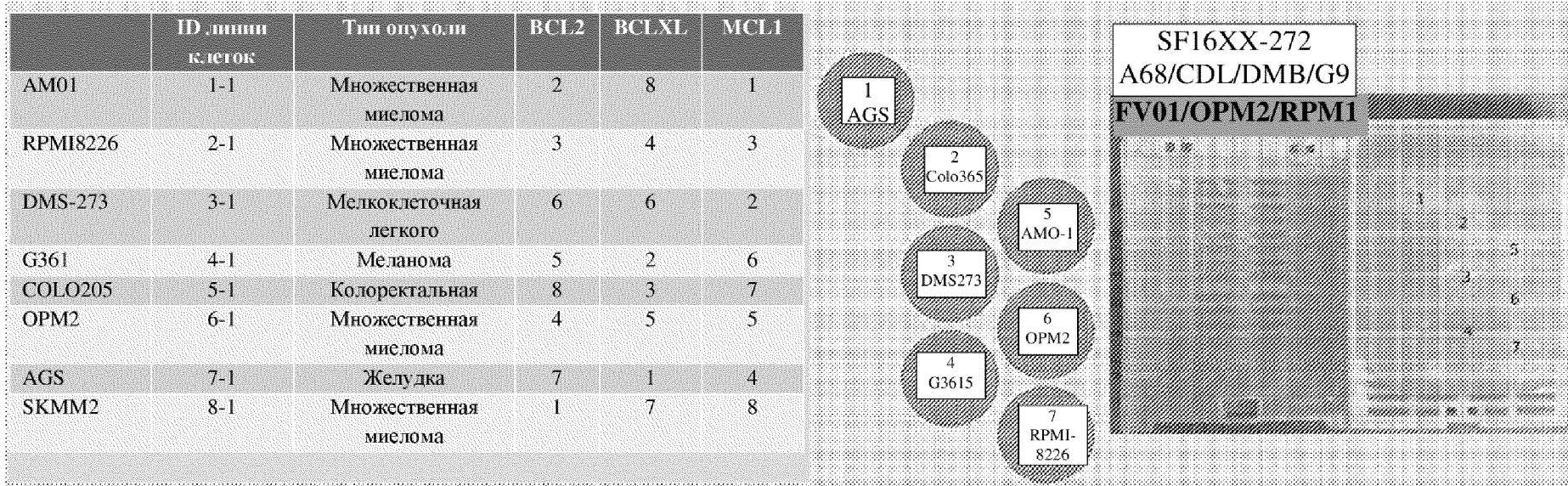
14/24

Фигура 14



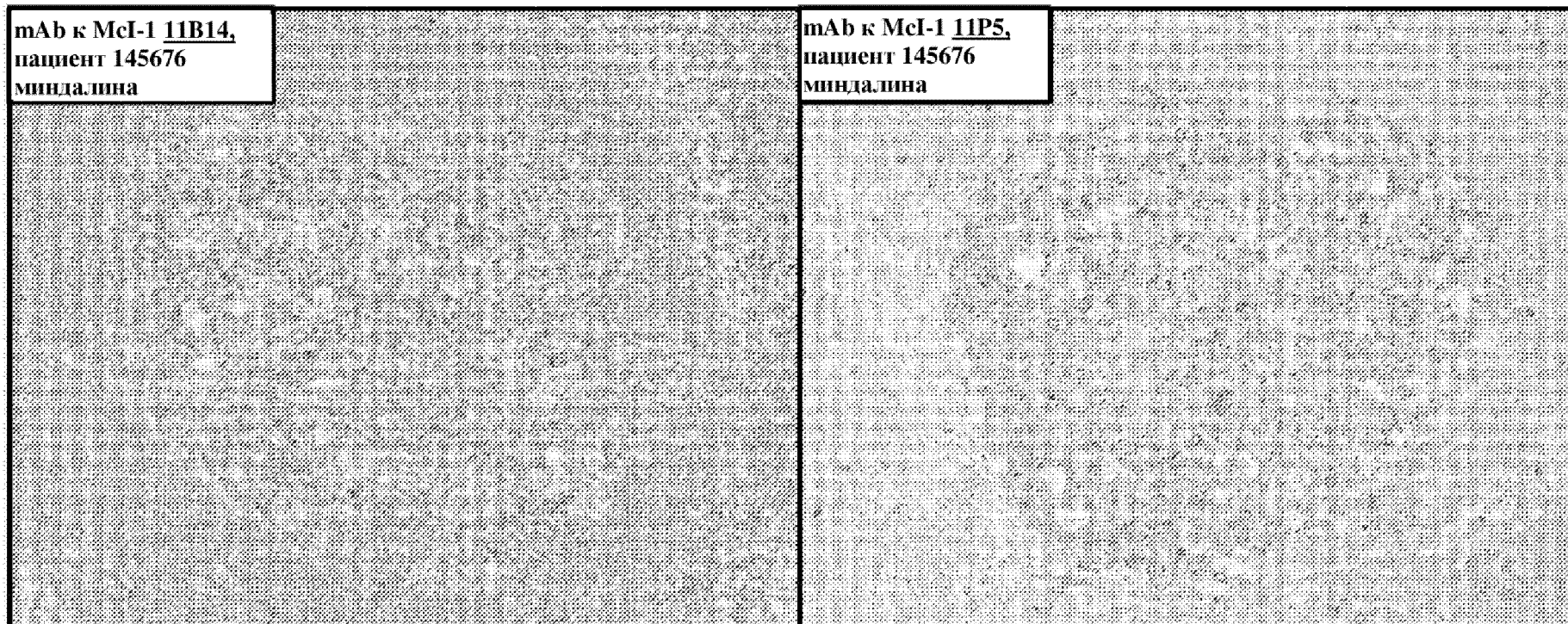
15/24

Фигура 15



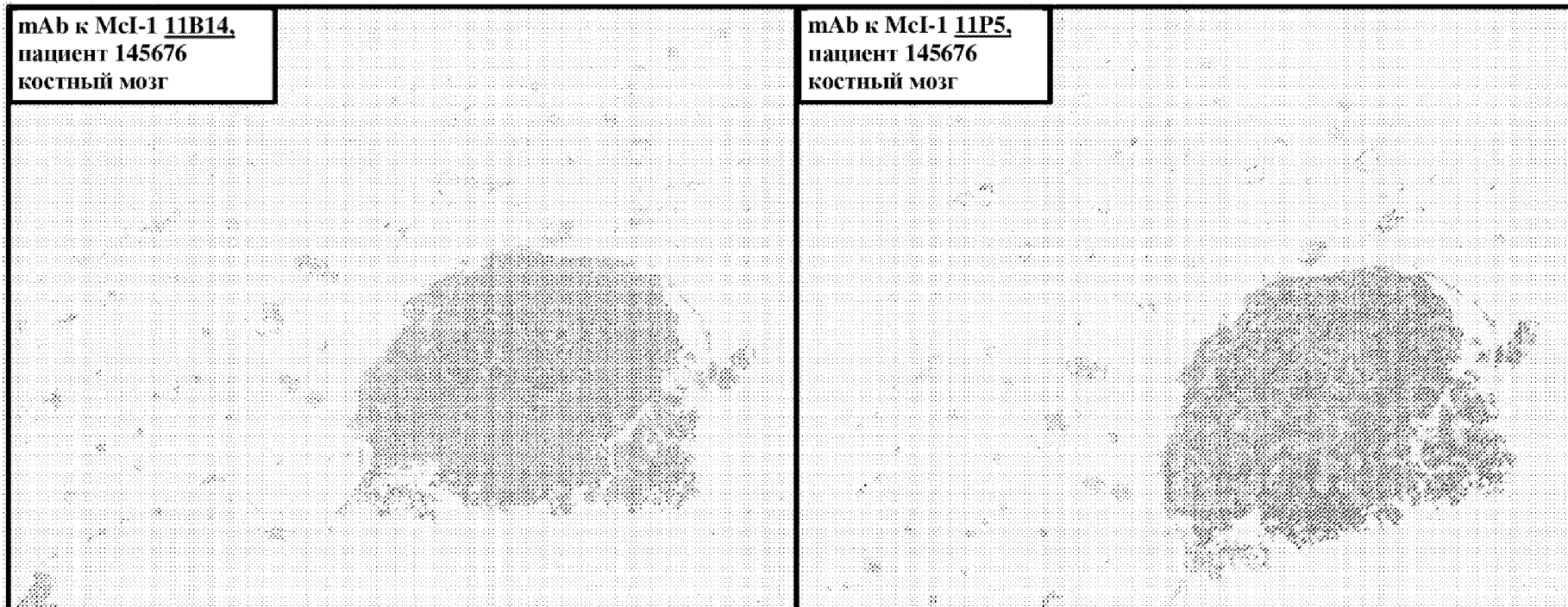
16/24

Фигура 16



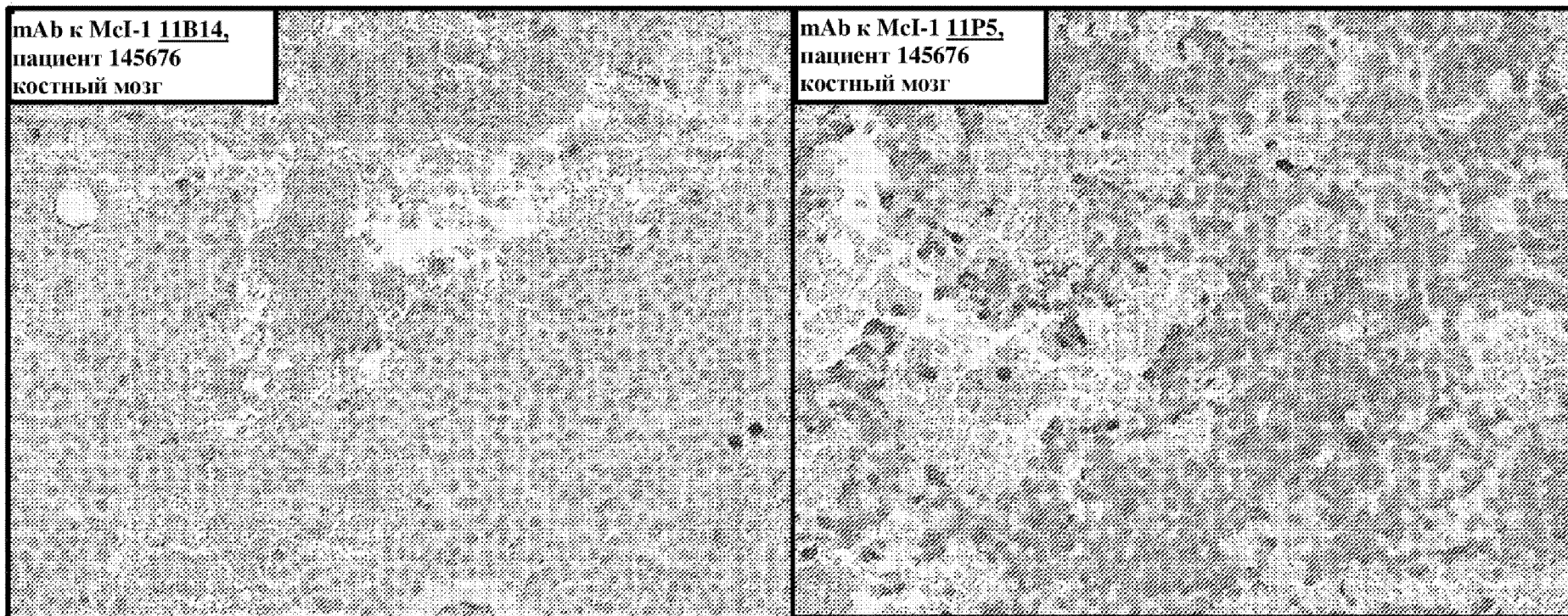
17/24

Фигура 17



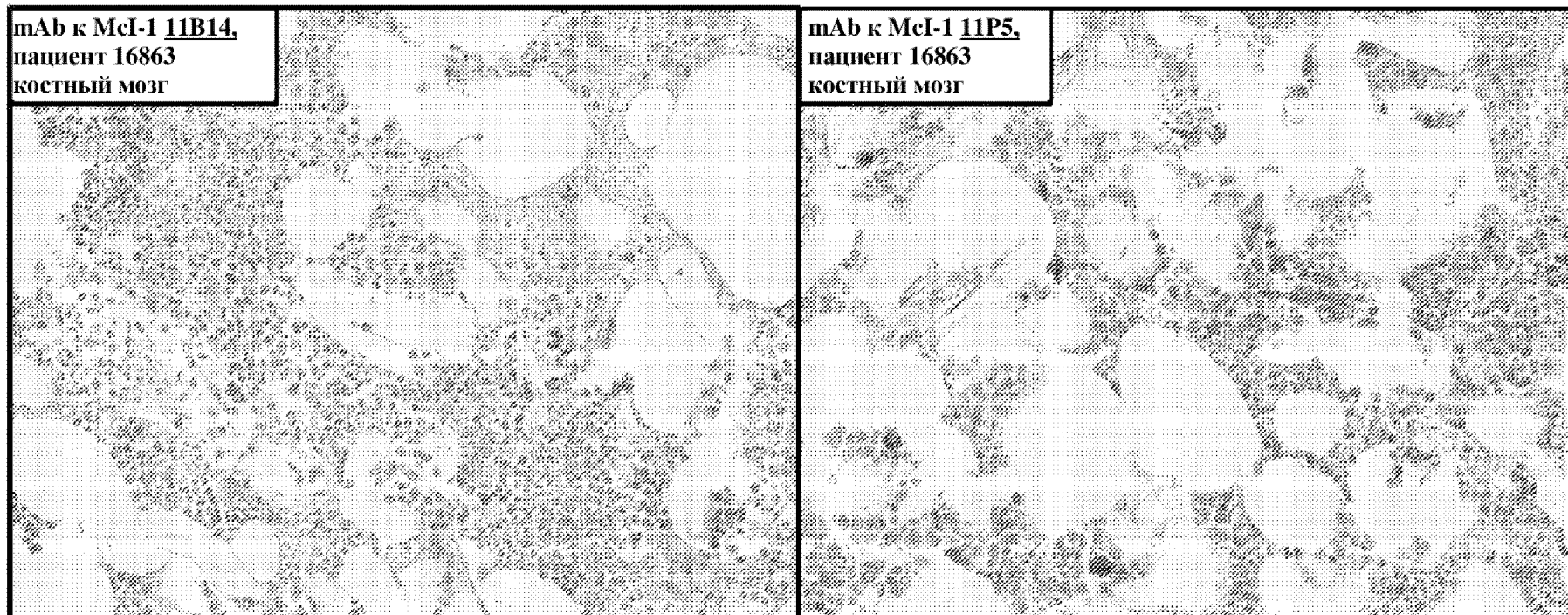
18/24

Фигура 18



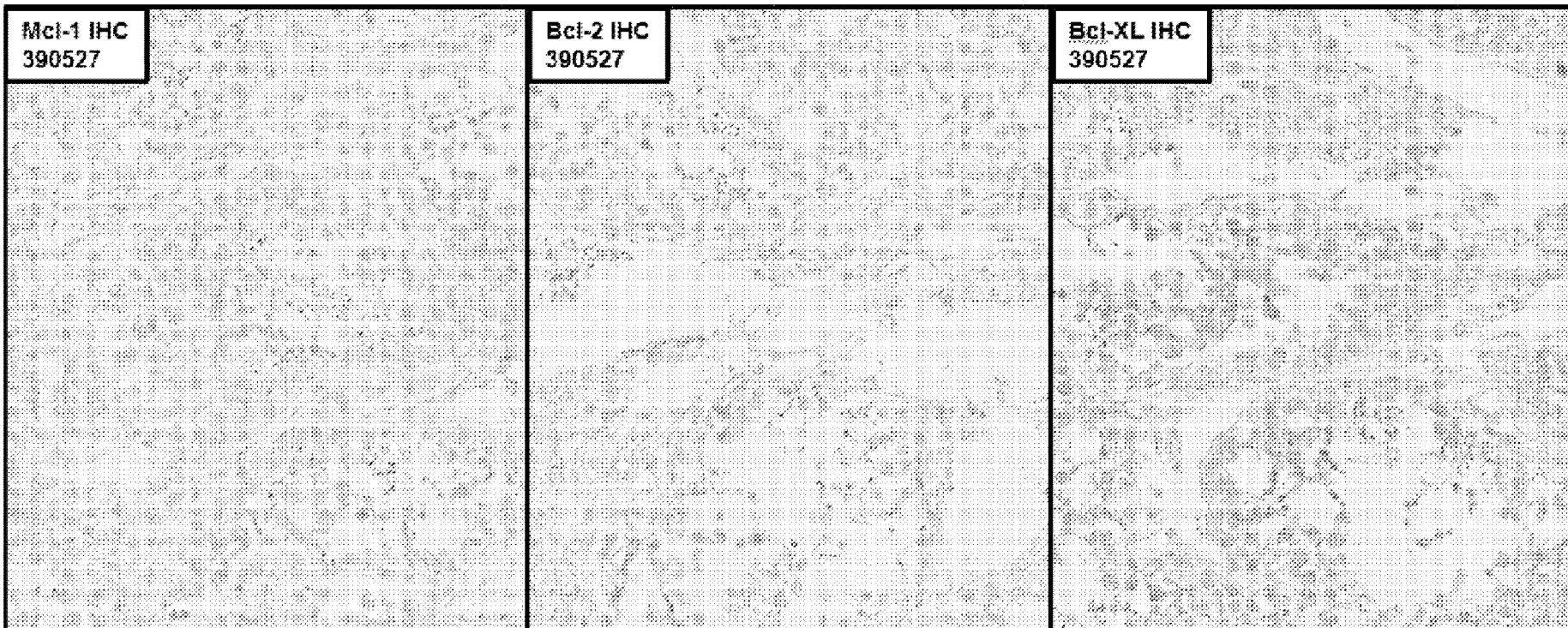
19/24

Фигура 19



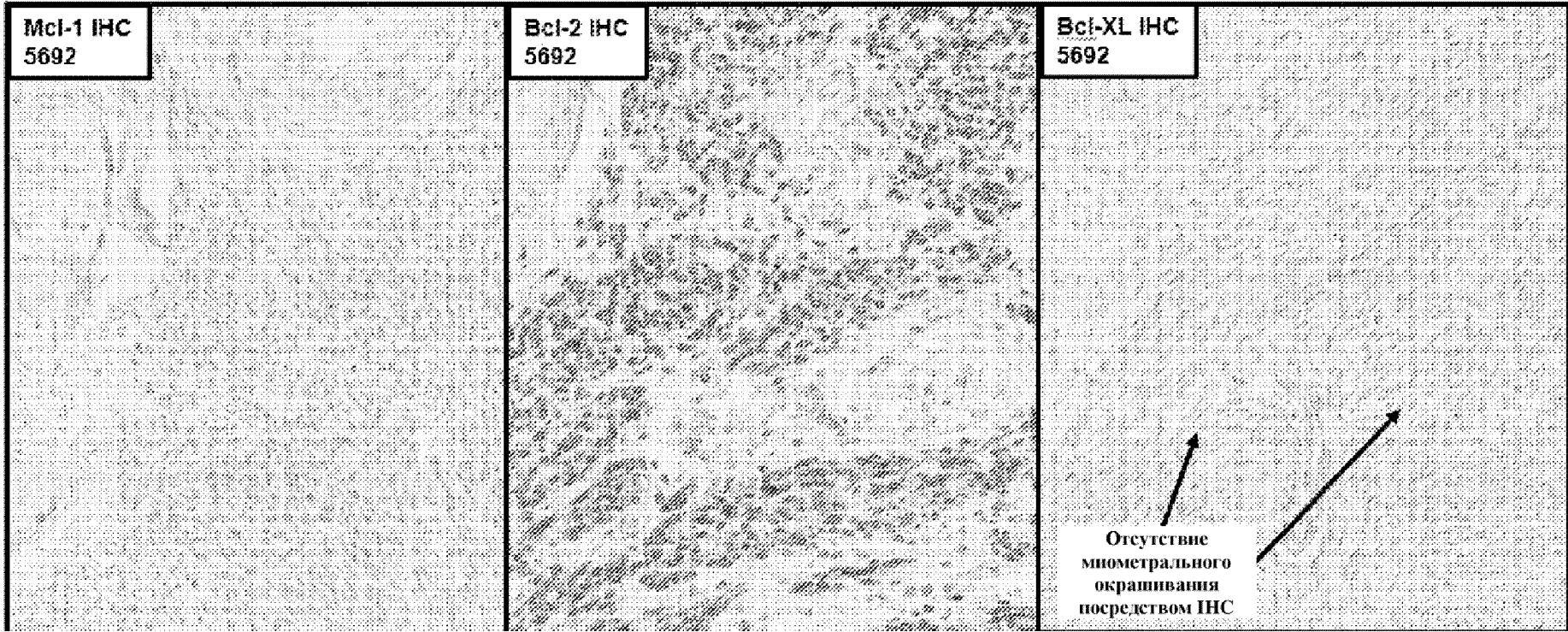
20/24

Фигура 20



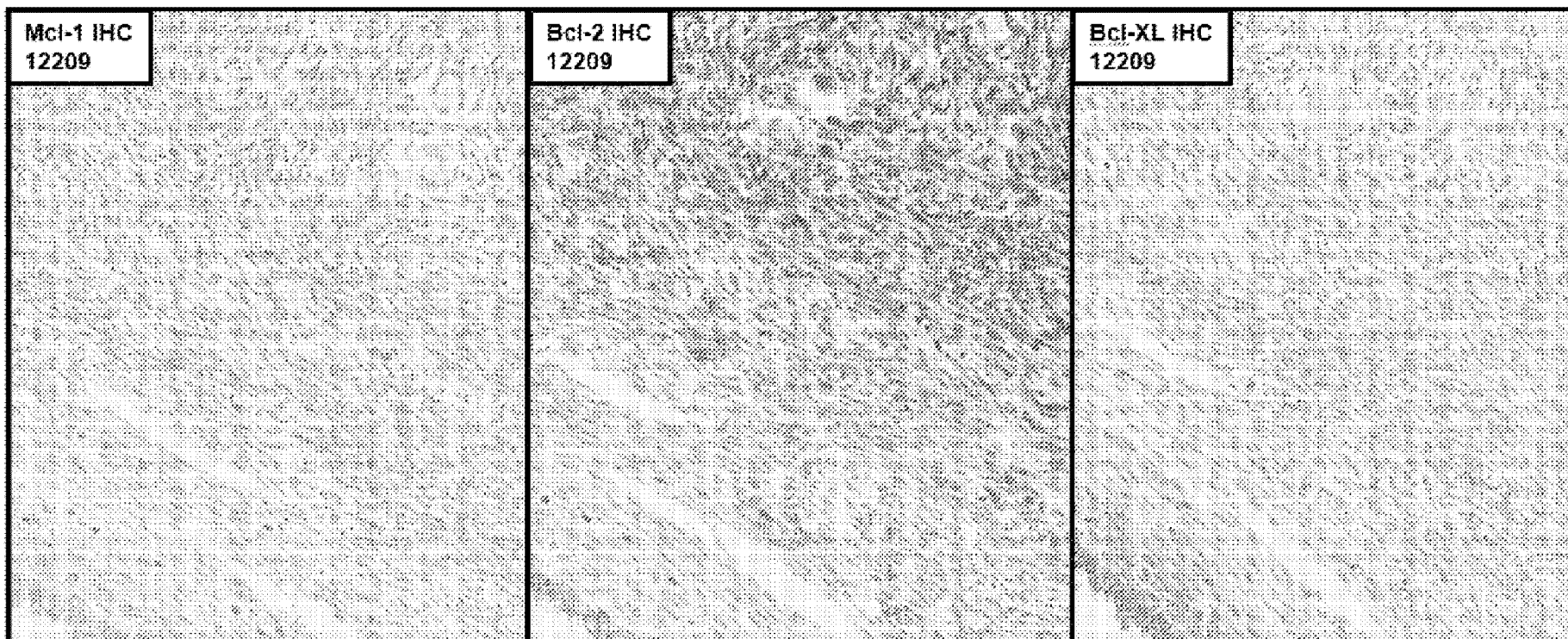
21/24

Фигура 21



22/24

Фигура 22



23/24

Фигура 23

Рав, отр. контроль 12400	MSE, отр. контроль 12400	Mci-1 ИС 12400

24/24

Фигура 24