

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392486 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.11.03

(22) Дата подачи заявки
2022.03.17

(51) Int. Cl. *A61K 39/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/40 (2006.01)
A61K 39/44 (2006.01)
A61K 47/50 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К ALPP/ALPPL2 И КОНЪЮГАТЫ АНТИТЕЛО - ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

(31) 63/162,635; 63/301,574

(32) 2021.03.18; 2022.01.21

(33) US

(86) PCT/US2022/020697

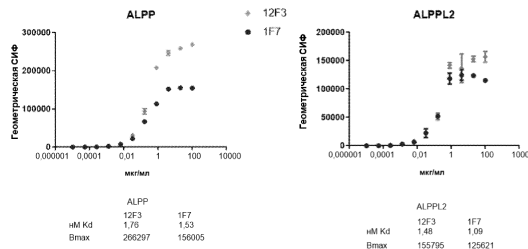
(87) WO 2022/197890 2022.09.22

(71) Заявитель:
СИДЖЕН ИНК. (US)

(72) Изобретатель:
Ринкон Арано Эктор Де Хесус,
Райорден Андерсон Сара Энн, Шерер
Эрин Маргарет, Вестендорф Лори,
Биндман Ной, Окили Николь, Сентер
Питер, Авастхи Дивья (US)

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

(57) Предложены антигенсвязывающие белки, такие как антитела и их фрагменты, которые связывают ALPP и/или ALPPL2. Также предложены нуклеиновые кислоты, кодирующие такие антигенсвязывающие белки, а также векторы и клетки, применимые в получении таких антигенсвязывающих белков. Эти антигенсвязывающие белки применимы в ряде способов, включая лечение рака яичника.



202392486

A1

A1

202392486

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579023EA/042

АНТИТЕЛА К ALPP/ALPPL2 И КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО - ЛЕКАРСТВЕННЫЙ ПРЕПАРАТ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Данная заявка испрашивает приоритет по предварительной заявке США № 63/162635, поданной 18 марта 2021 г., и предварительной заявке США № 63/301574, поданной 21 января 2022 г., каждая из которых в полном объеме и во всех целях включена посредством ссылки.

ССЫЛКА НА ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

[0002] Данная заявка включает перечень последовательностей в электронном формате в файле под названием 5620-00112PC_ST25, созданном 4 марта 2022 г. и составляющем 106 Кбайт, который включен в данный документ посредством ссылки.

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0003] Настоящее изобретение относится к новым антителам к ALPP/ALPPL2 и конъюгатам антитело - лекарственный препарат, а также способам применения таких антител к ALPP/ALPPL2 и конъюгатов антитело - лекарственный препарат для лечения рака.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0004] ALPP, который также известен как плацентарная щелочная фосфатаза, и ALPPL2, который также известен как плацентарный подобный щелочной фосфатазе белок 2, являются генами-паралогами, на высоких уровнях экспрессируемыми в плаценте. ALPP и ALPPL2 представляют собой мембраносвязанные белки, участвующие в рециклинге АТФ из внеклеточного пространства. Уровень ALPP повышен при многих видах рака, включая рак яичника, рак легкого, рак эндометрия, рак мочевого пузыря и рак желудка. Уровень ALPPL2 также повышен при многих видах рака, включая рак яичника, рак легкого, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак желудка и рак яичка. Рак яичника занимает пятое место среди гинекологических злокачественных образований, и существует потребность в улучшенных вариантах лечения для этого заболевания.

[0005] Все ссылки, цитируемые в данном документе, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки, как если бы было специально и отдельно указано, что каждая отдельная ссылка включена посредством ссылки.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

В данном документе предложены антитела к ALPP и ALPP-направленные конъюгаты антитело - лекарственный препарат (ADC), а также антитела к ALPPL2 и ALPPL2-направленные ADC. Также в данном документе предложены антитела, которые могут связывать как ALPP, так и ALPPL2 (антитела к ALPP/ALPPL2), и ADC, направленные как на ALPP, так и на ALPPL2 (ALPP/ALPPL2-направленные ADC). Также в данном документе предложены способы применения ALPP/ALPPL2-направленных

антител и ADC для лечения ALPP- и/или ALPPL2-экспрессирующих расстройств, включая рак. В некоторых вариантах осуществления антитела к ALPP/ALPPL2 содержат последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 56, 57 и 58 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 63, 64 и 65 согласно определению по нумерации Kabat. В некоторых вариантах осуществления антитела к ALPP/ALPPL2 содержат последовательности CDR тяжелой цепи SEQ ID NO: 60, 61 и 62 и последовательности CDR легкой цепи SEQ ID NO: 66, 67 и 68 согласно определению по нумерации IMGT.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На Фиг. 1 показана оценка цитотоксичности ALPP/ALPPL2-специфических антител в виде ADC с использованием нагрузки с и без посторонней активности в отношении опухолевых клеток COV644 и NCI-H1651.

На Фиг. 2А-2С показана остаточная жизнеспособность линий клеток CAO3, COV644 и NCI-H1651 после оценки цитотоксичности лучших ALPP/ALPPL2-специфических антител в виде ADC с использованием нагрузки без посторонней активности.

На Фиг. 3 показана аффинность связывания ALPP/ALPPL2-специфических антител.

На Фиг. 4 приведен полный профиль связывания для антител 1F7 и 12F3 с экспрессирующими как ALPP, так и ALPPL2 клетками HEK293 по данным проточной цитометрии.

На Фиг. 5 показано выравнивание последовательностей вариантов по вариабельной области тяжелой цепи h12F3 с человеческой акцепторной последовательностью тяжелой цепи IGHV3-49/HJ4.

На Фиг. 6 показано выравнивание вариабельного домена вариантов по вариабельной области тяжелой цепи h12F3.

На Фиг. 7 показано выравнивание последовательностей вариантов по вариабельной области легкой цепи h12F3 с человеческой акцепторной последовательностью каппа IGKV1-33/KJ2.

На Фиг. 8 показано выравнивание вариабельного домена вариантов по легкой цепи h12F3.

На Фиг. 9 показан процент жизнеспособных клеток CAO3. С левой стороны фигуры показан процент жизнеспособности как кривая доза - ответ для ADC, содержащих гуманизированные варианты легкой цепи F с разными тяжелыми цепями. С правой стороны фигуры показана жизнеспособность для ADC, содержащих гуманизированную тяжелую цепь D с разными вариантами легкой цепи.

На Фиг. 10 показана корреляция *in vitro* эффективности между гуманизированными вариантами, имеющими лекарственный линкер mp-dLAE-MMAE(4).

На Фиг. 11 приведен профиль цитотоксичности h12F3 HGLF ADC на 3D сфероиды *in vitro*, а также приведены кривые кинетики связывания и значения для h12F3 HGLF и вариантов HFLD с Fc-слиянными ALPP и ALPPL2.

На Фиг. 12 показана кинетика интернализации h12F3 HGLF при разных концентрациях антитела.

На Фиг. 13 приведены кривые кинетики связывания и значения для h12F3 HGLF и вариантов HFLD с Fc-слияниями ALPP и ALPPL2.

На Фиг. 14 приведены кривые кинетики связывания и значения при pH 7,4 и pH 6 для h12F3 HGLF и HFLD с Fc-слияниями ALPP и ALPPL2.

На Фиг. 15 показана *in vivo* противоопухолевая активность h12F3 HGLF-dLAE-MMAE и HFLD-dLAE-MMAE в мышинных моделях CAOV3.

На Фиг. 16 показана *in vivo* противоопухолевая активность h12F3 HGLF-dLAE-MMAE и HFLD-dLAE-MMAE в мышинных моделях NCI-N87.

На Фиг. 17 показана *in vivo* противоопухолевая активность h12F3 HFLD-dLAE-MMAE и HFLD-vc-MMAE в мышинных моделях NCI-N87.

На Фиг. 18 показана *in vivo* противоопухолевая активность h12F3 HFLD-dLAE-MMAE и HFLD-vc-MMAE в мышинных моделях H1651.

На Фиг. 19 показан % изменения объема опухоли в семи ксенотрансплантатных моделях после обработки h12F3 ADC, конъюгированными с vc-MMAE и dLAE-MMAE.

На Фиг. 20 показана *in vivo* противоопухолевая активность в модели рака желудка NCI-N87 со стороны конъюгатов h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE по сравнению с их соответствующими изотипическими контрольными ADC.

На Фиг. 21 показана *in vivo* противоопухолевая активность в модели рака желудка NCI-N87 со стороны конъюгатов h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE по сравнению с их соответствующими изотипическими контрольными ADC.

На Фиг. 22 приведены обобщенные данные по ингибированию роста опухолей в четырех ксенотрансплантатных моделях, включая рак поджелудочной железы (HPAC), желудка (NCI-N87), яичника (CAOV3) и легкого (SNU-2535), со стороны h12F3-HGLF mc-vc-MMAE и mp-dLAE-MMAE. Усредненные данные по нецелевым ADC показаны пунктирной линией.

На Фиг. 23 показана противоопухолевая активность в отношении ксенотрансплантатов, полученных от пациентов с раком яичника, обработанных h12F3-HDLF-mc-vc-MMAE. На А) приведены обобщенные данные по ингибированию роста опухолей в двенадцати ксенотрансплантатах, тогда как на В) и С) приведены примеры двух обработанных конъюгатами моделей по сравнению с необработанными когортами.

На Фиг. 24 показана аффинность связывания h12F3 HGLF и HFLD в отношении человеческого ALPP и обезьяньего ортолога ALPP.

На Фиг. 25 приведено эпителиальное картирование h12F3 HGLF на экспрессирующих химерный крысиный/человеческий ALPP клетках HEK293.

На Фиг. 26 приведены сенсограммы, демонстрирующие связывание h12F3, h12F3-HGLF-mc-vc-MMAE, h12F3-mp-dLAE-MMAE или положительного контрольного mAb (изменение по рядам) с человеческими Fc-рецепторами (изменение по колонкам). Равновесные константы диссоциации приведены в верхнем правом углу каждой

сенсограммы.

На Фиг. 27 показан лизис клеток LoVo по определению в анализе высвобождения хрома после инкубации $\text{Na}_2[51\text{Cr}]O_4$ (Cr-51)-меченных клеток с НК-клетками в присутствии конъюгатов h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE.

На Фиг. 28 показана фагоцитарная активность макрофагов, которые инкубировали с клетками LoVo в присутствии конъюгатов h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE по сравнению с положительным (блокирующим функцию антителом к CD47) или изотипическим контролем.

На Фиг. 29 показана опосредованная $Fc\gamma RIII$ активация люминесцентного репортера антителом h12F3 HGLF и ADC.

На Фиг. 30 показана активация двух сигнальных путей, вовлеченных в иммуногенную гибель клеток, конъюгатами h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE в двух разных концентрациях.

На Фиг. 31 показано высвобождение АТФ в среду клетками LoVo, обработанными 1-10 мг/мл конъюгатов h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE, по сравнению со свободным цитотоксином MMAE, в течение 24 или 48 ч.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Заголовки разделов, используемые в данном документе, предназначены исключительно для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный предмет изобретения.

Способы и процедуры, описанные или упомянутые в данном документе, в общем случае хорошо известны и широкоприменимы специалистами в данной области техники с использованием традиционных методологий, таких как, например, широко используемые методологии, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 4th edition (2012) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor N.Y.; *Current Protocols In Molecular Biology* (F. M. Ausubel, et al. eds., (2003)); серии *METHODS IN ENZYMOLOGY* (Academic Press, Inc.); *PCR 2: A Practical Approach* (M. J. MacPherson, B. D. Hames and G. R. Taylor eds. (1995)); Greenfield, ed. (2013) *Antibodies, A Laboratory Manual*, 2nd edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; *Oligonucleotide Synthesis* (M. J. Gait, ed., 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J. E. Cellis, ed., 1998) Academic Press; *Animal Cell Culture* (R. I. Freshney), ed., 1987); *Introduction to Cell and Tissue Culture* (J. P. Mather and P. E. Roberts, 1998) Plenum Press; *Cell and Tissue Culture Laboratory Procedures* (A. Doyle, J. B. Griffiths, and D. G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons; *Handbook of Experimental Immunology* (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds.); *Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987); *PCR: The Polymerase Chain Reaction*, (Mullis et al., eds., 1994); *Current Protocols in Immunology* (J. E. Coligan et al., eds., 1991); *Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999); *Immunobiology* (C. A. Janeway and P. Travers, 1997); *Antibodies* (P. Finch, 1997); *Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty., ed., IRL Press, 1988-1989);

Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999); The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995); Cancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J.B. Lippincott Company, 1993); и их обновленных версиях. Каждая из вышеприведенных ссылок в этом параграфе в полном объеме включена в данный документ посредством ссылки.

I. Определения

Если не указано иное, все используемые в данном документе технические и научные термины имеют общепринятые значения, понятные специалисту в области техники, к которой относится данное изобретение. Например, Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 5th ed., 2013, Academic Press; and the Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 2nd ed., 2006, Oxford University Press, обеспечивают специалиста общим словарем многих терминов, используемых в данном описании.

Если иное не требуется по контексту или явно не указано, термины в единственном числе включают множественное число, а термины в единственном числе включают единственное число.

Понятно, что аспекты и варианты осуществления изобретения, описанные в данном документе, включают «содержащий», «состоящий» и/или «состоящий преимущественно из» аспектов и вариантов осуществления.

В контексте данного документа форму единственного числа следует понимать как относящуюся к «одному или более» перечисленных или пронумерованных компонентов, если не указано иное.

В контексте данного документа термин «и/или» следует рассматривать как конкретное описание каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин «и/или» в контексте такого выражения, как «А и/или В», подразумевает включение «А и В», «А или В»; «А» (отдельно) и «В» (отдельно). Аналогично, термин «и/или» в контексте такого выражения, как «А, В и/или С», подразумевает охват каждого из следующих аспектов: А, В и С; А, В или С; А или С; А или В; В или С; А и С; А и В; В и С; А (отдельно); В (отдельно) и С (отдельно).

Термин «около» относится к значению или композиции, которые находятся в пределах допустимого диапазона погрешности для конкретных значения или композиции, определяемого специалистом в данной области техники, что будет частично зависеть от того, как значение или композицию измеряют или определяют, т. е. ограничений системы измерения. Как понятно специалисту в данной области техники, употребление термина «около» в отношении значения или параметра в данном документе включает (и описывает) варианты осуществления, которые направлены на эти значение или параметр как таковые. Например, описание, относящееся к «около Х», включает описание «Х».

Как описано в данном документе, любой диапазон концентраций, процентный

диапазон, диапазон соотношений или целочисленный диапазон следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его дробных частей (например, одной десятой и одной сотой части целого числа), если не указано иное.

Когда в данном документе используется торговое наименование, ссылка на торговое наименование также относится к составу продукта, воспроизведенному лекарственному препарату и активным фармацевтическим ингредиентам продукта под торговым наименованием, если в контексте не указано иное.

Термины «ALPP», «щелочная фосфатаза», «плацентраная щелочная фосфатаза», «ALPaза» или «PLAP» взаимозаменяемо используются в данном документе и, если не указано иное, включают любые встречающиеся в природе варианты (например, сплайс-варианты, аллельные варианты), изоформы и гомологи ALPP человека от других видов позвоночных. Этот термин охватывает «полноразмерный» непротессированный ALPP, а также любую форму ALPP, которая является результатом процессинга в клетке. Аминокислотная последовательность типового ALPP человека приведена в Uniprot ID: P05187 или RefSeq ID: NM_001632. Аминокислотная последовательность одного конкретного примера зрелого белка ALPP человека приведена в SEQ ID NO: 2.

Термины «ALPPL2», «белок 2, подобный плацентарной щелочной фосфатазе» или «щелочная фосфатаза зародышевых клеток» взаимозаменяемо используются в данном документе и, если не указано иное, включают любые встречающиеся в природе варианты (например, сплайс-варианты, аллельные варианты), изоформы и гомологи ALPPL2 человека от других видов позвоночных. Этот термин охватывает «полноразмерный» непротессированный ALPPL2, а также любую форму ALPPL2, которая является результатом процессинга в клетке. Аминокислотная последовательность типового ALPPL2 человека приведена в Uniprot ID: P10696 или RefSeq ID: NM_031313. Аминокислотная последовательность одного конкретного примера зрелого белка ALPPL2 человека приведена в SEQ ID NO: 4.

В контексте данного документа «антигенсвязывающий белок» («ABP») означает любой белок, который связывает конкретный целевой антиген, отличный от встречающихся в природе когнатных лигандов или фрагментов таких лигандов, которые связывают конкретный антиген. В настоящей заявке конкретный целевой антиген представляет собой ALPP и/или ALPPL2 или фрагмент ALPP и/или ALPPL2. «Антигенсвязывающий белок» включает белки, которые содержат по меньшей мере одну антигенсвязывающую область или домен (например, по меньшей мере одну гипервариабельную область (HVR) или определяющую комплементарность область (CDR) по определению в данном документе). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит остов, такой как полипептид или полипептиды, в который внедрены и/или к которому присоединены одна или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) HVR или CDR, как описано в данном документе. В некоторых антигенсвязывающих белках HVR или CDR внедрены в «каркасную» область, которая

ориентирует HVR или CDR так, чтобы обеспечить надлежащие антигенсвязывающие свойства CDR. В случае некоторых антигенсвязывающих белков остовом являются тяжелая и/или легкая цепь(и) иммуноглобулина из антитела или его фрагмента. Дополнительные примеры остовов включают, но не ограничиваются этим, фибронектин человека (например, 10-ый внеклеточный домен фибронектина человека III), неокарциностагин CBM4-2, антикарины, полученные из липокалинов, сконструированные домены анкириновых повторов (DARPin), домен протеина-A (протеин Z), домены Кунитца, Im9, белки TPR, цинк-пальцевые домены, рVIII, GC4, трансферрин, В-домен SPA, Sac7d, А-домен, домен SH3 Fyn-киназы и лектин-подобные домены С-типа (смотрите, например, Gebauer and Skerra (2009) *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255; Binz et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1257-1268; и Yu et al. (2017) *Annu Rev Anal Chem* 10:293-320, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки). Соответственно, антигенсвязывающие белки включают, но не ограничиваются этим, моноклональные антитела, биспецифические антитела, минитела, доменные антитела, такие как нанотела®, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слияния антител и их части и фрагменты, соответственно. В некоторых случаях антигенсвязывающий белок представляет собой функциональный фрагмент полного антитела (например, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv, доменное антитело или минитело). Пептитела представляют собой другой пример антигенсвязывающих белков. В некоторых вариантах осуществления термин «антигенсвязывающий белок» включает производные, например, антигенсвязывающий белок, который был химически модифицирован, например, антигенсвязывающий белок, который связан с другим агентом, таким как метка или цитотоксический или цитостатический агент (например, конъюгат антигенсвязывающего белка, такой как конъюгат антитело-лекарственный препарат).

«Антигенсвязывающий фрагмент» (или просто «фрагмент») или «антигенсвязывающий домен» антигенсвязывающего белка (например антитела) в контексте данного документа относится к одному или более фрагментам антигенсвязывающего белка (например, антитела) вне зависимости от того, как они получены или синтезированы, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связываемым целым антигенсвязывающим белком. Примеры фрагментов антител включают Fv; Fab; Fab'; Fab'-SH; F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Фрагмент «Fv» включает нековалентно связанный димер одного переменного домена тяжелой цепи и одного переменного домена легкой цепи. Фрагмент «Fab» включает константный домен легкой цепи и первый константный домен (C_{H1}) тяжелой цепи, помимо переменных доменов тяжелой и легкой цепи фрагмента Fv. Фрагмент «F(ab')₂» включает два фрагмента Fab, соединенных вблизи шарнирной области дисульфидными связями.

Термины «полипептид» и «белок» используются взаимозаменяемо для обозначения

полимера из аминокислотных остатков и не ограничены минимальной длиной. Такие полимеры из аминокислотных остатков могут содержать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки и включают, но не ограничиваются этим, димеры, тримеры, пептиды, олигопептиды и мультимеры аминокислотных остатков. В это определение включены как полноразмерные белки, так и их фрагменты. Эти термины также включают пост-экспрессионные модификации полипептида, например, гликозилирование, сиалилирование, ацетилирование, фосфорилирование и т. п. Термин «полипептид» также относится к белку, который содержит модификации, такие как делеции, добавления и замены (в общем случае консервативные по природе) в нативной последовательности при условии, что белок сохраняет необходимую активность. Термины «полипептид» и «белок» охватывают антигенсвязывающие белки ALPP и/или ALPPL2, включая антитела, фрагменты антител или последовательности, имеющие делеции, добавления и/или замены одной или более аминокислот антигенсвязывающего белка.

Полипептид с «нативной последовательностью» или «встречающийся в природе» полипептид включает полипептид, имеющий такую же аминокислотную последовательность, что и полипептид, встречающийся в природе. Таким образом, полипептид с нативной последовательностью может иметь аминокислотную последовательность встречающегося в природе полипептида от любого млекопитающего. Такой полипептид с нативной последовательностью можно выделять из природного источника или получать рекомбинантным или синтетическим путем. Термин полипептид с «нативной последовательностью» явным образом включает встречающиеся в природе усеченные или секретируемые формы (например, последовательность внеклеточного домена), встречающиеся в природе варианты формы (например, формы с альтернативным сплайсингом) и встречающиеся в природе аллельные варианты полипептида.

«Вариант» полипептида означает биологически активный полипептид (например, антигенсвязывающий белок или антитело), имеющий по меньшей мере около 70%, 80% или 90% идентичности аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной или эталонной последовательностью после выравнивания последовательностей и внесения, при необходимости, гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета любых консервативных замен как части идентичности последовательности. Такие варианты включают, например, полипептиды, в которых один или более аминокислотных остатков добавлены или удалены на N- или C-конце полипептида. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет по меньшей мере около 80% идентичности аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет по меньшей мере около 90% идентичности аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления вариант имеет по меньшей мере около 95% идентичности аминокислотной последовательности с полипептидом с нативной последовательностью.

В контексте данного документа термин «процент (%) идентичности и гомологии

аминокислотной последовательности» в отношении последовательности пептида, полипептида или антигенсвязывающего белка (например, антитела) определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности после выравнивания последовательностей и внесения, при необходимости, гэпов для достижения максимального процента идентичности последовательностей и без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательностей. Выравнивание в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно осуществлять различными способами, известными специалисту в данной области техники, например, с помощью общедоступного программного обеспечения, такого как BLAST, BLAST-2, ALIGN или MEGALIGN™ (DNASTAR). Специалисты в данной области техники могут определить соответствующие параметры для измерения выравнивания, включая любые алгоритмы, необходимые для обеспечения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности последовательности заданной аминокислотной последовательности А относительно, с или по сравнению с заданной аминокислотной последовательностью В (что в альтернативном варианте можно сформулировать как заданная аминокислотная последовательность А, которая имеет или содержит определенный % идентичности последовательности относительно, с или по сравнению с заданной аминокислотной последовательности В) рассчитывают следующим образом:

100 умножить на отношение X/Y,

где X представляет число аминокислотных остатков, засчитанных как идентичные совпадения по последовательности в программном выравнивании А и В, и где Y представляет общее число аминокислотных остатков в В. Если не указано иное, все значения % идентичности аминокислотных последовательностей, используемые в данном документе, рассчитаны в соответствии с этой формулой с использованием компьютерной программы ALIGN-2. Следует понимать, что если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности последовательности А к В не будет равен % идентичности последовательности В к А.

Термин «лидерная последовательность» относится к последовательности аминокислотных остатков, расположенных на N-конце полипептида, которая облегчает секрецию полипептида из клетки млекопитающего. Лидерная последовательность может отщепляться при экспорте полипептида из клетки млекопитающего с образованием зрелого белка. Лидерные последовательности могут быть природными или синтетическими, и могут быть гетерологичными или гомологичными белку, к которому они присоединены.

Термин «иммуноглобулин» относится к классу структурно родственных гликопротеинов, состоящих из двух пар полипептидных цепей, одной пары легких (L)

низкомолекулярных цепей и одной пары тяжелых (H) цепей, причем все четыре цепи связаны между собой дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо изучена. Смотрите, например, *Fundamental Immunology* (Paul, W., ed., 7th ed. Raven Press, N.Y. (2013)). Вкратце, каждая тяжелая цепь, как правило, состоит из вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как V_H или VH) и константной области тяжелой цепи (C_H или CH). Константная область тяжелой цепи, как правило, состоит из трех доменов, C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Тяжелые цепи в общем случае связаны между собой дисульфидными связями в так называемой «шарнирной области». Каждая легкая цепь, как правило, состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в данном документе как V_L или VL) и константной области легкой цепи (C_L или CL). Константная область легкой цепи, как правило, состоит из одного домена C_L . C_L может относиться к изотипу κ (каппа) или λ (лямбда). Термины «константный домен» и «константная область» взаимозаменяемо используются в данном документе. Иммуноглобулин может относиться к любому из общеизвестных изотипов, включая, но не ограничиваясь этим, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалистам в данной области и включают, но не ограничиваются этим, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. «Изотип» относится к классу или подклассу антител (например, IgM или IgG1), который кодируется генами константной области тяжелой цепи.

Термин «антитело» используется в самом широком смысле и, в частности, включают, например, моноклональные антитела (включая полноразмерные или интактные моноклональные антитела), антитела с полиэпитопной или моноэпитопной специфичностью, поликлональные или одновалентные антитела, мновалентные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела при условии, что они проявляют необходимую биологическую активность), одноцепочечные антитела и фрагменты вышеуказанных антител, как описано ниже. Антитело может быть человеческим, гуманизированным, химерным и/или иметь созревшую аффинность, а также антителом от других видов, например мыши и кролика, и т. д. Таким образом, термин «антитело» включает полипептидный продукт В-клеток в рамках иммуноглобулинового класса полипептидов, который способен связываться с конкретным молекулярным антигеном и состоит из двух идентичных пар полипептидных цепей, при этом каждая пара содержит одну тяжелую цепь (около 50-70 кДа) и одну легкую цепь (около 25 кДа), каждая аминоконцевая часть каждой цепи содержит вариабельную область от около 100 до около 130 или более аминокислот, а каждая карбокси-концевая часть содержит константную область. Смотрите, например, *Antibody Engineering* (Vorrebaeck ed., 2d ed. 1995); and Kuby, *Immunology* (3d ed. 1997). Термин «антитело» также включает, но не ограничивается этим, синтетические антитела, рекомбинантно полученные антитела, верблюдизированные антитела, интратела, анти-идиотипические (анти-Id) антитела и функциональные фрагменты (например, антигенсвязывающие фрагменты) любых из вышеперечисленных антител, что относится к части полипептида

тяжелой и/или легкой цепи антитела, которая сохраняет некоторую часть или всю активность связывания антитела, из которого был получен фрагмент. Неограничивающие примеры функциональных фрагментов (например, антигенсвязывающих фрагментов) включают одноцепочечные Fv (scFv) (например, включая моноспецифические, биспецифические и т. д.), фрагменты Fab, фрагменты F(ab'), фрагменты F(ab)₂, фрагменты F(ab')₂, дисульфид-связанные Fv (dsFv), фрагменты Fd, фрагменты Fv, диатело, триатело, тетратело и минитела. В частности, предложенные в данном документе антитела включают молекулы иммуноглобулина и иммунологически активные части молекул иммуноглобулина, например, антигенсвязывающие домены или молекулы, которые содержат антигенсвязывающий сайт, который связывается с антигеном (например, одну или более CDR антитела). Такие фрагменты антител можно найти, например, в Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (1989); Mol. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference (Myers ed., 1995); Huston et al., 1993, Cell Biophysics 22:189-224; Plückthun and Skerra, 1989, Meth. Enzymol. 178:497-515; и Day, Advanced Immunochemistry (2d ed. 1990). Предложенные в данном документе антитела могут относиться к любому классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA) или любому подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) молекул иммуноглобулина.

В контексте данного документа термин «гипервариабельная область» или «HVR» относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которые являются гипервариабельными по последовательности. HVR могут образовывать структурно определенные петли («гипервариабельные петли»). В общем случае нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR; три в VH (H1, H2, H3) и три в VL (L1, L2, L3). В нативных антителах H3 и L3 демонстрируют наибольшее разнообразие из шести HVR, и в частности, считается, что H3 играет уникальную роль в придании высокой специфичности антителам. Смотрите, например, Xu et al., Immunity 13:37-45 (2000); Johnson and Wu, в Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003). Действительно, встречающиеся в природе антитела верблюдовых, состоящие только из тяжелой цепи, являются функциональными и стабильными в отсутствие легкой цепи. Смотрите, например, Hamers-Casterman et al., Nature 363:446-448 (1993); Sheriff et al., Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996).

HVR в общем случае содержат аминокислотные остатки из гипервариабельных петель и/или из «определяющих комплементарность областей» (CDR), причем CDR характеризуются наибольшей вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигенов. В данной области техники известен ряд схем для определения границ заданной CDR. Например, определяющие комплементарность области (CDR) по Kabat основаны на вариабельности последовательности и используются наиболее часто (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). В отличие от этого, нумерация по Chothia основана на расположении структурных петель (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). CDR по AbM представляют собой компромиссный вариант между

CDR по Kabat и структурными петлями по Chothia, и используются в программном обеспечении для моделирования антител AbM от Oxford Molecular. CDR по «Contact» основаны на анализе доступных кристаллических структур комплексов. Дополнительные подробности в отношении вышеуказанных схем, а также другие системы нумерации приведены в следующих ссылках: Al-Lazikani et al., (1997) J. Mol. Biol. 273: 927-948 (схема нумерации «Chothia»); MacCallum et al., (1996) J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), (схема нумерации «Contact»); Lefranc M-P., et al., (2003) Dev. Comp. Immunol. 27:55-77 (схема нумерации «IMGT»); и Honegger A. & Pluckthun A. (2001) J. Mol. Biol. 309:657-70, (схема нумерации АНо).

В некоторых вариантах осуществления области HVR и связанные с ними последовательности являются такими же, как и области CDR и связанные с ними последовательности, на основании одной из вышеуказанных схем нумерации. Поэтому остатки для типовых HVR и/или CDR приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1: Общая информация по разным схемам нумерации CDR

Петля	IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
CDR-H1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
CDR-H2	56-65	50-65	50-58	52-56	47-58
CDR-H3	105-117	95-102	95-102	95-102	93-101
CDR-L1	27-38	24-34	24-34	24-34	30-36
CDR-L2	56-65	50-56	50-56	50-56	46-55
CDR-L3	105-117	89-97	89-97	89-97	89-96

В некоторых вариантах осуществления HVR могут включать расширенные HVR следующим образом: 24-36 или 24-34 (L1), 46-56 или 50-56 (L2) и 89-97 или 89-96 (L3) в VL, и 26-35 (H1), 50-65 или 49-65 (H2) и 93-102, 94-102 или 95-102 (H3) в VH. Остатки переменного домена пронумерованы согласно Kabat et al., выше, для каждого из этих определений.

Если не указано иное, термины «CDR» и «определяющая комплементарность область» заданного антитела или его области, такой как переменная область, а также отдельные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2) антитела или его области следует понимать как включающие определяющую комплементарность область по определению по любой из известных схем, описанных выше в данном документе. В некоторых случаях указана схема идентификации конкретной CDR или конкретных CDR, например CDR по определению IMGT, Kabat, AbM, Chothia или Contact. В других случаях приведена конкретная аминокислотная последовательность CDR.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR и/или HVR по определению по системе IMGT. В других вариантах

осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR или HVR по определению по системе Kabat. В других вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR или HVR по определению по системе AbM. В дополнительных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит CDR или HVR по определению по системе Chothia. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит остатки CDR и/или HVR, указанные на Фиг. 5-8 или приведенные в другом месте данного документа.

Термин «вариабельная область» или «вариабельный домен» относится к домену тяжелой или легкой цепи антигенсвязывающего белка (например, антитела), который участвует в связывании антигенсвязывающего белка (например, антитела) с антигеном. Вариабельные области или домены тяжелой и легкой цепи (VH и VL, соответственно) антигенсвязывающего белка, такого как антитело, можно дополнительно разделить на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут быть гипервариабельными по последовательности и/или образованными из структурно определенных петель), такие как гипервариабельные области (HVR) или определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся областями, являющимися более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). В общем случае существует по три HVR (HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3) или CDR (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) в каждой вариабельной области тяжелой цепи и по три HVR (HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3) или CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) в каждой вариабельной области легкой цепи. «Каркасные области» или «FR» известны в данной области техники и относятся к отличным от HVR или CDR частям вариабельных областей тяжелой и легкой цепей. В общем случае существует четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области тяжелой цепи (FR-H1, FR-H2, FR-H3 и FR-H4) и четыре FR в каждой полноразмерной вариабельной области легкой цепи (FR-L1, FR-L2, FR-L3 и FR-L4). В каждой VH и VL три HVR или CDR и четыре FR, как правило, упорядочены от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, HVR1, FR2, HVR2, FR3, HVR3, FR4 в случае HVR или FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 в случае CDR (также смотрите Chothia and Lesk J. *Mot. Biol.*, 195, 901-917 (1987)). Одного домена VH или VL может быть достаточно для придания антигенсвязывающей специфичности. Кроме того, антитела, которые связывают конкретный антиген, можно выделять, используя домен VH или VL из антитела, которое связывает антиген, для скрининга библиотеки комплементарных доменов VL или VH, соответственно. Смотрите, например, Portolano et al. *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

В контексте данного документа термин «вариабельная область тяжелой цепи» (VH) относится к области, содержащей HVR-H1, FR-H2, HVR-H2, FR-H3 и HVR-H3 тяжелой цепи. Например, вариабельная область тяжелой цепи может содержать CDR-H1, FR-H2, CDR-H2, FR-H3 и CDR-H3 тяжелой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи также содержит по меньшей мере часть FR-H1 и/или по меньшей мере часть FR-H4.

В контексте данного документа термин «константная область тяжелой цепи» относится к области, содержащей по меньшей мере три константных домена тяжелой цепи C_{H1} , C_{H2} и C_{H3} . Неограничивающие примеры константных областей тяжелой цепи включают γ , δ и α . Неограничивающие примеры константных областей тяжелой цепи также включают ϵ и μ . Каждая константная область тяжелой цепи соответствует изотипу антитела. Например, антитело, содержащее константную область γ , представляет собой антитело IgG, антитело, содержащее константную область δ , представляет собой антитело IgD, а антитело, содержащее константную область α , представляет собой антитело IgA. Кроме того, антитело, содержащее константную область μ , представляет собой антитело IgM, и антитело, содержащее константную область ϵ , представляет собой антитело IgE. Некоторые изотипы можно дополнительно подразделить на подклассы. Например, антитела IgG включают, но не ограничиваются этим, антитела IgG1 (содержащие константную область γ_1), IgG2 (содержащие константную область γ_2), IgG3 (содержащие константную область γ_3) и IgG4 (содержащие константную область γ_4); антитела IgA включают, но без ограничения этим, антитела IgA1 (содержащие константную область α_1) и антитела IgA2 (содержащие константную область α_2); и антитела IgM включают, но не ограничиваются этим, IgM1 и IgM2.

В контексте данного документа термин «тяжелая цепь» (HC) относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере вариабельную область тяжелой цепи, с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах осуществления тяжелая цепь содержит по меньшей мере часть константной области тяжелой цепи. В контексте данного документа термин «полноразмерная тяжелая цепь» относится к полипептиду, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, с лидерной последовательностью или без нее.

В контексте данного документа термин «вариабельная область легкой цепи» (VL) относится к области, содержащей HVR-L1, FR-L2, HVR-L2, FR-L3 и HVR-L3 легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит CDR-L1, FR-L2, CDR-L2, FR-L3 и CDR-L3 легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи также содержит FR-L1 и/или FR-L4.

В контексте данного документа термин «константная область легкой цепи» относится к области, содержащей константный домен легкой цепи C_L . Неограничивающие примеры константных областей легкой цепи также включают λ и κ .

В контексте данного документа термин «легкая цепь» (LC) относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере вариабельную область легкой цепи, с лидерной последовательностью или без нее. В некоторых вариантах осуществления легкая цепь содержит по меньшей мере часть константной области легкой цепи. В контексте данного документа термин «полноразмерная легкая цепь» относится к полипептиду, содержащему вариабельную область легкой цепи и константную область легкой цепи, с лидерной последовательностью или без нее.

«Систему нумерации EU» или «индекс EU» в общем случае используют для

обозначения остатка в константной области тяжелой цепи иммуноглобулина (например, индекс EU описан в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). «Индекс EU в соответствии с Kabat» относится к нумерации EU остатков человеческого антитела IgG1. Если не указано иное, ссылки на номера остатков в константном домене антител означают нумерацию остатков по системе нумерации EU.

В контексте данного документа термин «моноклональное антитело» относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т. е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высоко специфическими, при этом они направлены против одного антигенного сайта. В отличие от препаратов поликлональных антител, которые могут включать разные антитела, направленные против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене.

В контексте данного документа «биспецифические» антитело относится к антителу, имеющему специфичность связывания в отношении по меньшей мере двух антигенных эпитопов. В одном варианте осуществления эпитопы принадлежат одному антигену. В другом варианте осуществления эпитопы принадлежат разным антигенам. Способы получения биспецифических антител известны в данной области техники. Например, биспецифические антитела можно получать рекомбинантно, используя коэкспрессию двух пар тяжелая цепь/легкая цепь иммуноглобулина. Смотрите, например, Milstein et al., *Nature* 305:537-39 (1983). В альтернативном варианте биспецифические антитела можно получать, используя химическое связывание. Смотрите, например, Brennan, et al., *Science* 229:81 (1985). Биспецифические антитела включают фрагменты биспецифических антител. Смотрите, например, Hollinger, et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-48 (1993), Gruber, et al., *J. Immunol.* 152:5368 (1994).

«Имуноглобулин с двойным вариабельным доменом» или «DVD-Ig» относится к мультиспецифическим связывающим белкам, описанным, например, в DiGiammarino et al., *Methods Mol. Biol.* 899:145-156, 2012; Jakob et al., *MABs* 5:358-363, 2013; и патентах США №№ 7612181; 8258268; 8586714; 8716450; 8722855; 8735546; и 8822645, которые все в полном объеме включены посредством ссылки.

«Перенацеливающий белок с двойной аффинностью» или «DART» представляет собой форму биспецифического антитела, в котором вариабельный домен тяжелой цепи из одного антитела связан с вариабельным доменом легкой цепи другого с ассоциацией двух цепей, как описано, например, в Garber, *Nature Reviews Drug Discovery* 13:799-801, 2014.

«Привлекающий Т-клетки биспецифический активатор» или «BiTE®» представляет собой генетическое слияние двух фрагментов scFv, которое приводит к получению тандемных молекул scFv, как описано, например, в Baeuerle et al., *Cancer Res.*

69: 4941-4944, 2009.

В контексте данного документа термин «химерное антитело» относится к антителу, в котором фрагмент тяжелой и/или легкой цепи получен из конкретного источника или вида, в то время как часть тяжелой и/или легкой цепи получены из другого источника или вида. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело относится к антителу, содержащему по меньшей мере одну переменную область от первого вида (такого как мышь, крыса, яванский макак и т. д.) и по меньшей мере одну константную область от второго вида (такого как человек, яванский макак и т. д.). В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит по меньшей мере одну переменную область мыши и по меньшей мере одну константную область человека. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит по меньшей мере одну переменную область яванского макака и по меньшей мере одну константную область человека. В некоторых вариантах осуществления все переменные области химерного антитела получены от первого вида, а все константные области химерного антитела получены от второго вида.

В контексте данного документа термин «гуманизированное антитело» относится к генетически сконструированному нечеловеческому антителу, которое содержит константные домены человеческого антитела и нечеловеческие переменные домены, модифицированные так, чтобы иметь высокий уровень гомологии последовательности с человеческими переменными доменами. Это можно обеспечить путем прививания шести определяющих комплементарность областей (CDR) нечеловеческого антитела в гомологичную человеческую акцепторную каркасную область (FR) (смотрите WO92/22653 и EP0629240). Чтобы полностью восстановить аффинность связывания и специфичность родительского антитела, может быть необходима замена остатков каркасной области из родительского антитела (т. е. нечеловеческого антитела) на человеческие каркасные области (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, которые важны для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать нечеловеческие последовательности CDR, преимущественно человеческие каркасные области, необязательно содержащие одну или более аминокислотных обратных мутаций на нечеловеческую аминокислотную последовательность, и полностью человеческие константные области. Необязательно, можно использовать дополнительные аминокислотные модификации, которые не обязательно являются обратными мутациями, чтобы получить гуманизированное антитело с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

В контексте данного документа термин «человеческое антитело» относится к антителам, вырабатываемым у людей, антителам, вырабатываемым у отличных от человека животных, которые содержат гены иммуноглобулина человека, таких как XenoMouse[®], и антителам, отобранным *in vitro* методами, такими как фаговый дисплей,

при этом репертуар антител основан на человеческой последовательности иммуноглобулина. «Человеческое антитело» представляет собой антитело, имеющее переменные области, в которых как FR, так и CDR получены из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела по изобретению могут содержать аминокислотные остатки, не кодируемые последовательностями иммуноглобулина человеческой зародышевой линии (например, мутации, внесенные за счет случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). При этом в контексте данного документа подразумевается, что термин «человеческое антитело» не включает антитела, в которых последовательности CDR получены из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, и привитые в человеческие каркасные последовательности. Термины «человеческие антитела» и «полностью человеческие антитела» используются как синонимы.

«Акцепторная человеческая каркасная область» в целях данного документа представляет собой каркасную область, содержащую аминокислотную последовательность каркасной области переменного домена легкой цепи (VL) или каркасной области переменного домена тяжелой цепи (VH), полученную из каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области по определению ниже. Акцепторная человеческая каркасная область, полученная из каркасной области человеческого иммуноглобулина или человеческой консенсусной каркасной области, может содержать такую же аминокислотную последовательность, или она может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления, число аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления акцепторная человеческая каркасная область VL идентична по последовательности каркасной области VL человеческого иммуноглобулина человека или последовательности человеческой консенсусной каркасной области.

Антитело с «созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более гиперпеременных областях (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не имеет таких изменений, при этом такие изменения приводят к повышению аффинности антитела в отношении антигена. В некоторых примерах антитело с «созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более определяющих комплементарность областях (CDR) по сравнению с родительским антителом, которое не имеет таких изменений, при этом такие изменения приводят к повышению аффинности антитела в отношении антигена.

Термин «производное» относится к молекуле (например, антигенсвязывающему белку, такому как антитело или его фрагмент), которая содержит химическую

модификацию, отличную от вставки, делеции или замены аминокислот (или нуклеиновых кислот). В некоторых вариантах осуществления производные содержат ковалентные модификации, включая, но не ограничиваясь этим, химическое связывание с полимерами, липидами или другими органическими или неорганическими фрагментами. В определенных вариантах осуществления производное конкретного антигенсвязывающего белка может иметь больший период полужизни в циркуляции, чем антигенсвязывающий белок, который не был химически модифицирован. В определенных вариантах осуществления производное может обладать улучшенной нацеливающей способностью в отношении необходимых клеток, тканей и/или органов. В определенных вариантах осуществления производное антигенсвязывающего белка ковалентно модифицировано для включения одного или более полимеров, включая, но не ограничиваясь этим, монометокси-полиэтиленгликоль, декстран, целлюлозу или другие углеводные полимеры, поли-(N-винилпирролидон)-полиэтиленгликоль, гомополимеры пропиленгликоля, сополимер полипропиленоксид/этиленоксид, полиоксиэтилированные полиолы (например, глицерин) и поливиниловый спирт, а также смеси таких полимеров. Смотрите, например, патенты США №№ 4640835, 4496689, 4301144, 4670417, 4791192 и 4179337.

В контексте данного документа термин «эпитоп» относится к сайту на антигене (например, ALPP или ALPPL2), с которым связывается антигенсвязывающий белок (например, антитело или его фрагменты), который нацелен на антиген. Эпитопы часто состоят из а химически активных поверхностных групп молекул, таких как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные или сульфонильные группы, и имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики. Эпитопы могут быть образованы из смежных или несмежных аминокислот антигена, которые располагаются рядом за счет третичного сворачивания. Эпитопы, образованные из смежных остатков, как правило, сохраняются при воздействии денатурирующих растворителей, тогда как эпитопы, образованные за счет третичного сворачивания, обычно устраняются обработкой денатурирующими растворителями. В определенных вариантах осуществления эпитоп может включать, но не ограничивается этим, по меньшей мере 3, по меньшей мере 4, по меньшей мере 5, по меньшей мере 6, по меньшей мере 7 аминокислот в уникальном пространственном упорядочении. В некоторых вариантах осуществления эпитоп относится к 3-5, 4-6 или 8-10 аминокислотам в уникальном пространственном упорядочении. В дополнительных вариантах осуществления длина эпитопа составляет менее чем 20 аминокислот, менее чем 15 аминокислот, менее чем 12 аминокислот, менее чем 10 аминокислот или менее чем 8 аминокислот. В одном варианте осуществления эпитоп антитела к ALPP/ALPPL2 по изобретению содержит SEQ ID NO: 73 и/или SEQ ID NO: 74. Эпитоп может содержать аминокислотные остатки, непосредственно участвующие в связывании (также называемые иммунодоминантным компонентом эпитопа), и другие аминокислотные остатки, которые непосредственно не участвуют в связывании, включая аминокислотные остатки, которые эффективно блокируются или охватываются антигенсвязывающей

молекулой (т. е. аминокислоты находятся в пределах области узнавания антитела антигенсвязывающей молекулы). Способы определения пространственной конформации эпитопов включают, например, рентгеновскую кристаллографию, двухмерный ядерный магнитный резонанс и HDX-MS (смотрите, например, Epitope Mapping Protocols in *Methods in Molecular Biology*, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)). После определения необходимого эпитопа антигена можно создавать антигенсвязывающие белки (например, антитела или их фрагменты) к этому эпитопу, используя общепринятые технологии. Затем можно проводить скрининг полученных антигенсвязывающих белков в конкурентных анализах, чтобы идентифицировать антигенсвязывающие белки, которые связывают одинаковые или перекрывающиеся эпитопы. Способы сортировки антител на основе исследования перекрестной конкуренции описаны в WO 03/48731.

«Нелинейный эпитоп» или «конформационный эпитоп» содержит несмежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в пределах антигенного белка, с которым связывается антитело, специфическое к эпитопу.

«Линейный эпитоп» содержит смежные полипептиды, аминокислоты и/или сахара в пределах антигенного белка, с которым связывается антигенсвязывающий белок (например, антитело, или его фрагмент), специфический к эпитопу.

Термин «конкурировать», используемый в контексте антигенсвязывающих белков (например, антител или их фрагментов), которые конкурируют за один и тот же эпитоп, означает конкуренцию между антигенсвязывающими белками по определению в анализе, в котором исследуемый антигенсвязывающий белок (например, антитело или его фрагмент) (например, исследуемое антитело) предотвращает или ингибирует (частично или полностью) специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка (например, эталонного антитела) с общим антигеном (например, ALPP или ALPPL2 или его фрагментом). Для определения, конкурирует ли один антигенсвязывающий белок с другим, можно использовать многочисленные типы анализов конкурентного связывания, включая различные биосенсорные подходы без использования меток, такие как анализ методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (смотрите, например, Abdiche, et al., 2009, *Anal. Biochem.* 386:172-180; Abdiche, et al., 2012, *J. Immunol Methods* 382:101-116; и Abdiche, et al., 2014 *PLoS One* 9:e92451. Другие анализы, которые можно использовать, включают: твердофазный прямой или непрямой радиоиммуноанализ (РИА), твердофазный прямой или непрямой иммуноферментный анализ (ИФА), конкурентный сэндвич-анализ (смотрите, например, Stahli et al., 1983, *Methods in Enzymology* 9:242-253); твердофазный прямой ИФА с биотином-авидином (смотрите, например, Kirkland et al., 1986, *J. Immunol.* 137:3614-3619); твердофазный анализ с прямым мечением, твердофазный сэндвич-анализ с прямым мечением (смотрите, например, Harlow and Lane, 1988, *Antibodies, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press); твердофазный прямой РИА с мечением меткой I-125 (смотрите, например, Morel et al., 1988, *Mol. Immunol.* 25:7-15); твердофазный прямой ИФА с биотином-авидином (смотрите, например, Cheung, et al., 1990, *Virology* 176:546-552); прямой РИА с мечением (Moldenhauer et al., 1990, *Scand. J.*

Immunol. 32:77-82). Как правило, исследуемый антигенсвязывающий белок присутствует в избытке (например, по меньшей мере 2x, 5x, 10x, 20x или 100x). Обычно, когда конкурирующий антигенсвязывающий белок присутствует в избытке, он будет ингибировать специфическое связывание эталонного антигенсвязывающего белка с общим антигеном по меньшей мере на 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 100%. В случаях, когда каждый антигенсвязывающий белок (например, антитело или его фрагмент) выявляемо ингибирует связывание другого антигенсвязывающего белка с его когнатным эпитопом, в той же, большей или меньшей степени, говорят, что антигенсвязывающие белки «перекрестно конкурируют» друг с другом за связывание со своими соответствующими эпитопами или «перекрестно блокируют» друг друга. Как правило, такие исследования перекрестной конкуренции проводят, используя условия и способы, описанные выше для конкурентных исследований, при этом степень блокирования составляет по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40% или по меньшей мере 50% в каждую сторону. Дополнительные подходы и подробности способов для идентификации конкурирующих антигенсвязывающих белков описаны в примерах данного документа.

«Аффинность» относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между одним сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y обычно можно представить константой диссоциации (K_d). Аффинность можно измерять обычными способами, известными в данной области техники, включая описанные в данном документе.

Антитело с «созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более гипервариабельных областях (HVR) по сравнению с родительским антителом, которое не имеет таких изменений, при этом такие изменения приводят к повышению аффинности антитела в отношении антигена. В некоторых примерах антитело с «созревшей аффинностью» относится к антителу с одним или более изменениями в одной или более определяющих комплементарность областях (CDR) по сравнению с родительским антителом, которое не имеет таких изменений, при этом такие изменения приводят к повышению аффинности антитела в отношении антигена.

В контексте данного документа термин «специфически связывает», «связывающийся» или просто «связывает» или другие схожие термины в контексте связывания антигенсвязывающего белка с его целевым антигеном означают, что антигенсвязывающий белок демонстрирует по существу фоновое связывание с нецелевыми молекулами. Антигенсвязывающий белок, который специфически связывает целевой антиген (например, ALPP и/или ALPPL2), может при этом перекрестно реагировать с белками ALPP и/или ALPPL2 от других видов. Как правило, антигенсвязывающий белок к ALPP/ALPPL2 специфически связывает ALPP и/или ALPPL2 человека, когда константа диссоциации (K_D) равна 10^{-7} М или менее, например около 10^{-8} М или менее, например около 10^{-9} М или менее, около 10^{-10} М или менее, около

10^{-11} М или менее, или около 10^{-12} или даже менее по данным измерения методом поверхностного плазмонного резонанса (ППР) (например, BIAcore, GE-Healthcare Uppsala, Sweden) с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве аналита.

В контексте данного документа термин « K_D » (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антигенсвязывающий белок - антиген (например, взаимодействия антитело - антиген). В контексте данного документа аффинность и K_D обратно пропорциональны, так что большая аффинность означает меньшую K_D , а меньшая аффинность означает большую K_D .

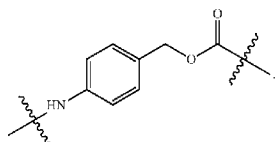
«Конъюгат антитело-лекарственный препарат» или просто «ADC» относится к антителу, конъюгированному с цитотоксическим агентом или цитостатическим агентом. Конъюгат антитело-лекарственный препарат, как правило, связывается с целевым антигеном (например, ALPP и/или ALPPL2) на клеточной поверхности с последующей интернализацией конъюгата антитело-лекарственный препарат в клетку, где происходит высвобождение лекарственного препарата.

Сокращения «vc» и «val-cit» относятся к дипептиду валин-цитруллин.

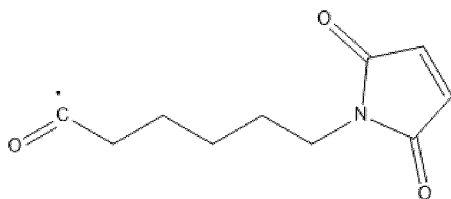
Сокращение LAE относится к трипептидному линкеру лейцин-аланин-глутаминовая кислота. Сокращение dLAE относится к трипептидному линкеру D-лейцин-аланин-глутаминовая кислота, при этом лейцин в трипептидном линкере находится в D-конфигурации.

Сокращение VKG относится к трипептидному линкеру валин-лизин-глицин.

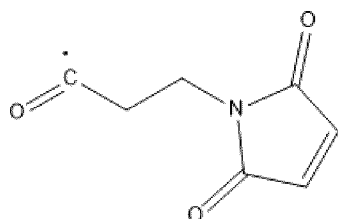
Сокращение «PABC» относится к самоуничтожающемуся спейсеру:



Сокращение «mc» относится к звену растяжения на основе малеимидакапроила:



Сокращение «mp» относится к звену растяжения на основе малеимидапропионила:



В контексте данного документа звено «PEG» относится к органическому фрагменту, состоящему из повторяющихся этиленокси-подзвеньев (PEG или подзвеньев PEG), который может быть полидисперсным, монодисперсным или дискретным (т. е. иметь дискретное число этиленокси-подзвеньев). Полидисперсные PEG представляют собой гетерогенную смесь размеров и молекулярных масс, тогда как монодисперсные PEG, как правило, очищены из гетерогенных смесей и, следовательно, обеспечивают одинаковую длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные звенья PEG включают дискретные PEG, соединения, которые синтезированы поэтапным образом, а не посредством процесса полимеризации. Дискретные PEG обеспечивают наличие единообразных молекул с определенной и конкретной длиной цепи.

Звено PEG, предложенное в данном документе, содержит одну или несколько цепей полиэтиленгликоля, каждая из которых состоит из одного или более этиленокси-подзвеньев, ковалентно присоединенных друг к другу. Цепи полиэтиленгликоля могут быть связаны вместе, например, в линейной, разветвленной или звездчатой конфигурации. Как правило, по меньшей мере одну из цепей полиэтиленгликоля перед включением в конъюгат камптотецина дериватизируют в одном конце алкильным фрагментом, замещенным электрофильной группой, для ковалентного присоединения к карбаматному атому азота метилен-карбаматного звена (т. е. представляет случай R). Как правило, концевое этиленокси-подзвено в каждой цепи полиэтиленгликоля, не участвующей в ковалентном присоединении к остатку линкерного звена, модифицируют кэспирующим звеном PEG, как правило, необязательно замещенным алкилом, таким как -CH₃, CH₂CH₃ или CH₂CH₂CO₂H. Предпочтительное звено PEG имеет одну цепь полиэтиленгликоля с 2-24 подзвеньями -CH₂CH₂O-, ковалентно присоединенными группами и оканчивающимися в одном конце кэспирующим звеном PEG.

«Цитотоксический эффект» относится к истощению, элиминации и/или уничтожению целевой клетки.

«Цитотоксический агент» относится к агенту, который оказывает цитотоксический эффект на клетку.

«Цитостатический эффект» относится к ингибированию пролиферации клеток.

«Цитостатический агент» относится к агенту, который оказывает цитостатический эффект на клетку, тем самым ингибируя рост и/или размножение конкретной подгруппы клеток. Цитостатические агенты можно конъюгировать с антителом или вводить в комбинации с антителом.

Термин «Fc-область» в данном документе используется для определения C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере часть константной области. Этот термин включает Fc-области с нативной последовательностью и варианты Fc-области. В одном варианте осуществления Fc-область тяжелой цепи человеческого IgG простирается от Cys226 или от Pro230 до карбоксильного конца тяжелой цепи. При этом C-концевой лизин (Lys447) Fc-области может присутствовать или нет. Если не указано иное, нумерация аминокислотных

остатков Fc-области или константной области соответствует системе нумерации EU, также называемой индексом EU, описанной в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991.

«Функциональная Fc-область» обладает «эффektorной функцией» Fc-области с нативной последовательностью. Типовые «эффektorные функции» включают связывание Fc-рецептора; связывание C1q; комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ); понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, В-клеточного рецептора; BCR) и т. д. Для таких эффektorных функций обычно необходимо, чтобы Fc-область была объединена со связывающим доменом (например, переменным доменом антитела), и их можно оценить, используя различные анализы.

«Fc-область с нативной последовательностью» содержит аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности Fc-области, встречающейся в природе. Нативная последовательность Fc-областей человека включает нативную последовательность Fc-области IgG1 человека (аллотипы не А и А); нативную последовательность Fc-области IgG2 человека; нативную последовательность Fc-области IgG3 человека; и нативную последовательность Fc-области IgG4 человека, а также встречающиеся в природе варианты указанных последовательностей.

«Вариантная Fc-область» содержит аминокислотную последовательность, которая отличается от нативной последовательности Fc-области за счет по меньшей мере одной аминокислотной модификации.

Термины «Fc-рецептор» или «FcR» описывают рецептор, который связывается с Fc-областью антитела. В некоторых вариантах осуществления FcγR представляет собой нативный человеческий FcR. В некоторых вариантах осуществления FcR представляет собой рецептор, который связывает антитело IgG (гамма-рецептор) и включает рецепторы подклассов FcγRI, FcγRII и FcγRIII, включая аллельные варианты и формы этих рецепторов с альтернативным сплайсингом. FcγRII-рецепторы включают FcγRIIA («активирующий рецептор») и FcγRIIB («ингибирующий рецептор»), которые содержат аналогичные аминокислотные последовательности, отличающиеся преимущественно цитоплазматическими доменами. Активирующий FcγRIIA-рецептор содержит иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM) в своем цитоплазматическом домене. Ингибирующий FcγRIIB-рецептор содержит иммунорецепторный тирозиновый ингибирующий мотив (ITIM) в своем цитоплазматическом домене (смотрите, например, Daeron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234 (1997)). Обзор FcR приведен, например, в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92 (1991); Capel et al., *Immunomethods* 4:25-34 (1994); и de Haas et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41 (1995). Другие FcR, включая те, которые будут идентифицированы в будущем, включены в термин «FcR» в данном документе. Термин «Fc-рецептор» или «FcR» также

включает неонатальный рецептор, FcRn, отвечающий за перенос материнских IgG в плод (Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) и Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)) и регуляцию гомеостаза иммуноглобулинов. Способы измерения связывания с FcRn являются известными (смотрите, например, Ghetie and Ward., *Immunol. Today* 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., *Nature Biotechnology*, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6216 (2004); WO 2004/92219 (Hinton et al.).

«Эффекторные функции» относятся к биологической активности, связанной с Fc-областью антитела, и варьируются в зависимости от изотипа антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: связывание C1q и комплементзависимую цитотоксичность (КЗЦ); связывание Fc-рецептора; антителозависимую клеточноопосредованную цитотоксичность (АЗКЦ); антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ); понижающую регуляцию рецепторов клеточной поверхности (например, B-клеточного рецептора); и активацию B-клеток. На такие функции может влиять, например, связывание Fc-эффекторных доменов с Fc-рецептором на иммунной клетке с фагоцитарной или литической активностью или связывание Fc-эффекторных доменов с компонентами системы комплемента. Как правило, эффекты, опосредованные Fc-связывающими клетками или компонентами комплемента приводят к ингибированию и/или истощению целевых клеток CD33. Fc-области антител могут рекрутировать экспрессирующие Fc-рецептор (FcR) клетки и пространственно совмещать их с покрытыми антителами целевыми клетками. Клетки, экспрессирующие поверхностный FcR для IgG, включая FcγRIII (CD16), FcγRII (CD32) и FcγRI (CD64), могут действовать как эффекторные клетки для разрушения покрытых IgG клеток. Такие эффекторные клетки включают моноциты, макрофаги, естественные клетки-киллеры (NK), нейтрофилы и эозинофилы. Привлечение FcγR со стороны IgG активирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ) или антителозависимый клеточный фагоцитоз (АЗКФ). АЗКЦ опосредуется CD16⁺ эффекторными клетками за счет секреции мембранных порообразующих белков и протеаз, тогда как фагоцитоз опосредуется CD32⁺ и CD64⁺ эффекторными клетками (смотрите, например, *Fundamental Immunology*, 4th ed., Paul ed., Lippincott-Raven, N.Y., 1997, Chapters 3, 17 и 30; Uchida et al., 2004, *J. Exp. Med.* 199:1659-69; Akewanlop et al., 2001, *Cancer Res.* 61:4061-65; Watanabe et al., 1999, *Breast Cancer Res. Treat.* 53:199-207).

«Человеческие эффекторные клетки» представляют собой лейкоциты, которые экспрессируют один или более FcR и осуществляют эффекторные функции. В определенных вариантах осуществления, такие клетки экспрессируют по меньшей мере FcγRIII и осуществляют эффекторную функцию АЗКЦ. Примеры человеческих лейкоцитов, которые опосредуют АЗКЦ, включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК), естественные клетки-киллеры (NK), моноциты, цитотоксические Т-клетки и нейтрофилы. Эффекторные клетки можно выделять из нативного источника, например, из крови.

«Антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность» или «АЗКЦ»

относится к механизму цитотоксичности, в котором Fc-область антител, связанных с антигеном на поверхности целевых клеток, взаимодействует с Fc-рецепторами (FcR), присутствующими на определенных цитотоксических эффекторных клетках (например, NK-клетках, нейтрофилах и макрофагах). Это взаимодействие обеспечивает возможность последующего уничтожения этими цитотоксическими эффекторными клетками целевых клеток цитотоксинами. Первичные клетки для опосредования АЗКЦ, NK-клетки, экспрессируют только FcγRIII, тогда как моноциты экспрессируют FcγRI, FcγRII и FcγRIII. Экспрессия FcR на гемопоэтических клетках приведена в таблице 3 на странице 464 в Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol* 9:457-92 (1991). Для оценки АЗКЦ-активности представляющей интерес молекулы можно проводить *in vitro* анализ АЗКЦ, например, описанный в патентах США №№ 5500362, или 5821337, или патенте США № 6737056 (Presta). Применимые эффекторные клетки для таких анализов включают мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) и NK-клетки. АЗКЦ-активность представляющей интерес молекулы можно также оценивать *in vivo*, например, в животной модели, например, как описано в Clynes et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 95:652-656 (1998). Дополнительные варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области (полипептидов с вариантной Fc-областью) и повышенной или сниженной АЗКЦ-активностью описаны, например, в патенте США № 7923538 и патенте США № 7994290.

«Комплементзависимая цитотоксичность» или «КЗЦ» относится к лизису целевой клетки в присутствии комплемента. Активация классического пути комплемента инициируется связыванием первого компонента системы комплемента (C1q) с Fc-областью антител (соответствующего подкласса), которые связаны со своим когнатным антигеном на целевой клетке. Это связывание активирует ряд ферментативных реакций, приводящих к образованию отверстий в мембране целевой клетки и последующей гибели клетки. Активация комплемента также может приводить к размещению компонентов комплемента на поверхности целевой клетки, что облегчает АЗКЦ за счет связывания рецепторов комплемента (например, CR3) на лейкоцитах. Для оценки активации комплемента можно проводить анализ КЗЦ, например, как описано в Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996). Варианты полипептидов с измененными аминокислотными последовательностями Fc-области (полипептидов, таких как антитело с вариантной Fc-областью) и повышенной или сниженной способностью связывать C1q описаны, например, в патенте США № 6194551 B1, патенте США № 7923538, патенте США № 7994290 и WO 1999/51642. Также смотрите, например, et al., *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Термин «антителозависимый клеточный фагоцитоз» или просто «АЗКФ» относится к процессу, посредством которого покрытые антителами клетки интернализуются, полностью или частично, фагоцитарными иммунными клетками (например, макрофагами, нейтрофилами и дендритными клетками), которые связываются с Fc-областью Ig.

Вариант полипептида с «измененной» аффинностью связывания FcR или АЗКЦ-

активностью (например, антитела) представляет собой такой, в котором увеличена или уменьшена активность связывания FcR и/или АЗКЦ-активность по сравнению с родительским полипептидом или с полипептидом, содержащим Fc-область с нативной последовательностью. Вариант полипептида, который «демонстрирует повышенное связывание» с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с большей аффинностью, чем родительский полипептид. Вариант полипептида, который «демонстрирует сниженное связывание» с FcR, связывает по меньшей мере один FcR с меньшей аффинностью, чем родительский полипептид. В некоторых вариантах осуществления такие варианты, которые демонстрируют сниженное связывание с FcR, могут характеризоваться незначительным или отсутствующим значительным связыванием с FcR, например 0-20% связыванием с FcR, по сравнению с IgG с нативной последовательностью Fc-области.

Термины «молекула нуклеиновой кислоты», «нуклеиновая кислота» и «полинуклеотид» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к полимеру из нуклеотидов любой длины. Такие полимеры из нуклеотидов могут содержать природные и/или неприродные нуклеотиды и включают, но не ограничиваются этим, ДНК, РНК и ПНК. «Нуклеотидная последовательность» относится к линейной последовательности нуклеотидов, которые составляют молекулу нуклеиновой кислоты или полинуклеотид.

Термин «вектор» означает любую молекулу или частицу (например, нуклеиновую кислоту, плазмиду, бактериофаг или вирус), применяемую для переноса молекулы нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина. Как правило, вектор содержит молекулу нуклеиновой кислоты, сконструированную так, чтобы содержать клонированные полинуклеотид или полинуклеотиды, кодирующие представляющие интерес полипептид или полипептиды, которые могут размножаться в клетке-хозяине. Примеры векторов включают, но не ограничиваются этим, плазмиды, вирусные векторы и экспрессионные векторы, например, рекомбинантные экспрессионные векторы. Вектор может содержать один или более следующих элементов: точку начала репликации, одну или более регуляторных последовательностей (таких как, например, промоторы и/или энхансеры), которые регулируют экспрессию представляющего интерес полипептида, и/или один или более генов селективных маркеров. Этот термин включает векторы, которые представляют собой самореплицирующиеся молекулы нуклеиновой кислоты, а также векторы, встроенные в геном клетки-хозяина, в которую они были внесены.

Термин «экспрессионный вектор» относится к вектору, который подходит для трансформации клетки-хозяина и который можно использовать для экспрессии представляющего интерес полипептида в клетке-хозяине.

Термины «клетка-хозяин» или «линия клеток-хозяев» взаимозаменяемо используются в данном документе и относятся к клетке или популяции клеток, которые могут быть или были реципиентами вектора или выделенного полинуклеотида. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими клетками или эукариотическими клетками. Типовые эукариотические клетки включают клетки млекопитающих, такие как клетки

приматов или отличных от приматов животных; клетки грибов, таких как дрожжи; клетки растений и клетки насекомых. Неограничивающие типовые клетки млекопитающих включают, но не ограничиваются этим, клетки NSO, клетки PER.C6[®] (Crucell) и клетки 293 и CHO, а также их производные, например, клетки 293-6E и DG44, соответственно. Такие термины относятся не только к оригинальной клетке, но также к потомству такой клетки. В последующих поколениях могут возникать определенные модификации вследствие, например, мутаций или влияния окружающей среды. Такое потомство также охвачено указанными терминами при условии, что клетки имеют такие же функцию или биологическую активность, что и оригинальные клетки.

Термин «регуляторная последовательность» относится к полинуклеотидной последовательности, которая влияет на экспрессию и процессинг кодирующей последовательности, к которой она лигирована. 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. Регуляторные последовательности для эукариот могут включать, например, промоторы, содержащие один или множество сайтов распознавания для факторов транскрипции, последовательности энхансеров транскрипции и последовательности терминации транскрипции. «Регуляторные последовательности» могут включать лидерные последовательности и/или последовательности партнеров по слиянию.

В контексте данного документа термин «функционально связанный» означает, что компоненты, к которым относится данный термин, находятся в взаимосвязи, которая позволяет им осуществлять присущие им функции в подходящих условиях. Например, регуляторная последовательность в векторе, которая «функционально связана» с кодирующей белок последовательностью, лигирована так, что экспрессия кодирующей белок последовательности обеспечивается в условиях, совместимых с транскрипционной активностью регуляторных последовательностей. В случае, когда две кодирующие последовательности функционально связаны, данное выражение означает, что два фрагмента ДНК или две кодирующие последовательности соединены так, что аминокислотные последовательности, кодируемые двумя фрагментами, остаются в рамке считывания.

Термин «трансфекция» означает поглощение чужеродной или экзогенной ДНК клеткой, при этом клетка была «трансфицирована», когда экзогенная ДНК была внесена внутрь клеточной мембраны. Ряд методик трансфекции хорошо известен в данной области и описан в данном документе. Смотрите, например, Graham et al., 1973, *Virology* 52:456; Sambrook et al., 2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, выше; Davis et al., 1986, *Basic Methods in Molecular Biology*, Elsevier; Chu et al., 1981, *Gene* 13:197. Такие методики можно использовать для внесения одного или более фрагментов экзогенной ДНК в подходящие клетки-хозяев.

Термин «трансформация» относится к изменению генетических характеристик

клетки, при этом клетка была трансформирована, если она была модифицирована для содержания новых ДНК или РНК. Например, клетка трансформирована, если она генетически модифицирована относительно своего нативного состояния путем внесения нового генетического материала посредством трансфекции, трансдукции или других методик. После трансфекции или трансдукции трансформирующая ДНК может рекомбинировать с ДНК клетки путем физической интеграции в хромосому клетки, или может поддерживаться временно в виде эписомального элемента без репликации, или может независимо реплицироваться как плазида. Клетка считается «стабильно трансформированной», если трансформирующая ДНК реплицируется с последующим делением клетки.

В контексте данного документа термин «выделенный» относится к молекуле, которая была отделена по меньшей мере от некоторых компонентов, с которыми она обычно встречается в природе или вырабатывается. Например, полипептид называется «выделенным», когда он отделен по меньшей мере от некоторых компонентов клетки, в которой он был выработан. В случае, когда полипептид секретируется клеткой после экспрессии, физическое отделение супернатанта, содержащего полипептид, от клетки, которая его вырабатывает, считается «выделением» полипептида. Аналогично, полинуклеотид называется «выделенным», если он не является частью большего полинуклеотида (такого как, например, геномная ДНК или митохондриальная ДНК, в случае полинуклеотида ДНК), в котором он обычно встречается в природе, или если он отделен от по меньшей мере некоторых из компонентов клетки, в которой он был выработан, например, в случае полинуклеотида РНК. Таким образом, полинуклеотид ДНК, который содержится в векторе внутри клетки-хозяина, может называться «выделенным».

Термины «индивид», «субъект» или «пациент» взаимозаменяемо используются в данном документе для обозначения животного, например, млекопитающего. В некоторых вариантах осуществления предложены способы лечения млекопитающих, включая, но не ограничиваясь этим, людей, грызунов, обезьян, кошачьих, собачьих, лошадиных, крупный рогатый скот, свиней, овец, коз, лабораторных млекопитающих животных, сельскохозяйственных млекопитающих животных, спортивных млекопитающих животных и домашних млекопитающих животных. В некоторых случаях «индивид» или «субъект» представляет собой человека. В некоторых примерах «индивид» или «субъект» относится к индивиду или субъекту (например, человеку), нуждающемуся в лечении заболевания или расстройства.

В контексте данного документа «заболевание» или «расстройство» относится к состоянию, при котором необходимо лечение.

В контексте данного документа «рак» и «опухоль» являются взаимозаменяемыми терминами, которые относятся к любому аномальному росту или пролиферации клеток или тканей у животного. В контексте данного документа термины «рак» и «опухоль» охватывают солидный и гематологический/лимфатический рак, а также охватывают

злокачественный, предзлокачественный и доброкачественный рост, такой как дисплазия. Солидная опухоль представляет собой аномальный рост или массу ткани, которая обычно не содержит кист или жидких участков. Примеры рака включают, но не ограничиваются этим, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные неограничивающие примеры таких видов рака включают плоскоклеточный рак, мелкоклеточный рак легкого, рак гипофиза, рак пищевода, астроцитому, саркому мягких тканей, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого, плоскоклеточный рак легкого, рак брюшной полости, гепатоцеллюлярный рак, рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, рак шейки матки, рак яичника, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, колоректальный рак, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки, рак печени, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, карциному печени, рак головного мозга, рак эндометрия, рак яичка, холангиокарциному, рак желчного пузыря, рак желудка, меланому и различные типы рака головы и шеи.

«Опухолевая нагрузка» относится к общему количеству опухолевого материала, распределенному по организму. Опухолевая нагрузка относится к общему количеству раковых клеток или общему размеру опухоли(ей) по всему организму, включая лимфатические узлы и костный мозг. Опухолевую нагрузку можно определять рядом способов, известных в данной области техники, например, путем измерения размеров опухоли(ей) после удаления из организма субъекта, например, используя штангенциркуль, или в организме, используя технологии визуализации, например, ультразвук, сканирование костей, компьютерную томографию (КТ) или магнитно-резонансную томографию (МРТ).

Термины «метастатический рак» и «метастатическое заболевание» означают раковые заболевания, которые распространились от места происхождения в другой участок организма, например, в регионарные лимфатические узлы или в отдаленные участки.

Термины «распространенный рак», «локально распространенный рак», «распространенное заболевание» и «локально распространенное заболевание» означают раковые заболевания, которые расширились за релевантную тканевую капсулу. Как правило, для пациентов с локально распространенным заболеванием не рекомендуется хирургическое вмешательство, и эти пациенты имеют значительно менее благоприятные результаты по сравнению с пациентами, имеющими клинически локализованный (ограниченный органом) рак.

В контексте данного документа «лечение» представляет собой подход для получения благоприятных или необходимых клинических результатов. В контексте данного документа «лечение» включает любое введение или применение терапевтического средства против заболевания у млекопитающего, включая человека. Благоприятные или необходимые клинические результаты включают, но не ограничиваются этим, одно или более из: облегчения одного или более симптомов,

уменьшения степени заболевания, предотвращения или замедления распространения (например, метастазирования, например метастазирования в легкие или лимфатические узлы) заболевания, предотвращения или замедления повторного появления заболевания, задержки или замедления прогрессирования заболевания, облегчения состояния заболевания, ингибирования заболевания или прогрессирования заболевания, ингибирования или замедления заболевания или его прогрессирования, прекращения развития и ремиссии (частичной или полной). Термин «лечение» также включает уменьшение патологических последствий пролиферативного заболевания.

В контексте рака термин «лечение» включает любое или все из: ингибирования роста раковых клеток, ингибирования репликации раковых клеток, уменьшения числа раковых клеток, уменьшения скорости инфильтрации раковых клеток в периферические органы, уменьшения скорости или степени метастазирования опухоли, уменьшения общей опухолевой нагрузки и облегчения одного или более симптомов, связанных с раком.

В контексте аутоиммунного заболевания термин «лечение» включает любое или все из: предотвращения репликации клеток, связанных с состоянием аутоиммунного заболевания, включая, но не ограничиваясь этим, клеток, способных вырабатывать аутоиммунное антитело, уменьшения нагрузки аутоиммунными антителами и облегчение одного или более симптомов аутоиммунного заболевания.

В контексте инфекционного заболевания термин «лечение» включает любое или все из предотвращения роста, размножения или репликации патогена, который вызывает инфекционное заболевание, и облегчение одного или более симптомов инфекционного заболевания.

Термины «ингибирование» или «ингибировать» относятся к уменьшению или устранению любой фенотипической характеристики или к снижению или устранению частоты, степени или вероятности этой характеристики. «Снижать» или «ингибировать» означает уменьшать, снижать или прекращать активность, функцию и/или количество по сравнению с эталоном. В определенных вариантах осуществления под «снижением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 20% или более. В другом варианте осуществления под «снижением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 50% или более. В другом варианте осуществления под «снижением» или «ингибированием» подразумевается способность вызывать общее снижение на 75%, 85%, 90%, 95% или более.

В контексте данного документа «эталон» относится к любому образцу, стандарту или уровню, который используют в сравнительных целях. Эталон может быть получен из здорового и/или не пораженного заболеванием образца. В некоторых примерах эталон может быть получен из необработанного образца. В некоторых примерах эталон получен из не пораженного заболеванием или необработанного образца субъекта. В некоторых примерах эталон получен от одного или более здоровых индивидов, которые не являются субъектом или пациентом.

В контексте данного документа «замедление развития заболевания» означает

отсрочку, задержку, замедление, стабилизацию, подавление и/или отложение развития заболевания (такого как рак). Это замедление может иметь различную продолжительность в зависимости от истории болезни и/или индивида, подлежащего лечению. Как очевидно специалисту в данной области техники, достаточное или значительное замедление может по существу охватывать предотвращение, так что у индивида не будет развиваться заболевание. Например, можно отсрочить рак поздней стадии, такой как развитие метастазов.

В контексте данного документа «предотвращение» включает обеспечение профилактики в отношении появления или повторного появления заболевания у субъекта, который может быть предрасположен к заболеванию, но у которого еще не было диагностировано это заболевание.

В контексте данного документа «подавлять» функцию или активность означает снижать функцию или активность по сравнению с в ином одинаковыми состояниями, за исключением представляющего интерес состояния или параметра, или, в альтернативном варианте, по сравнению с другим состоянием. Например, антитело, которое подавляет рост опухоли, снижает скорость роста опухоли по сравнению со скоростью роста опухоли в отсутствие антитела.

«Эффективное количество», «терапевтически эффективное количество» или «терапевтически эффективная дозировка» лекарственного препарата или терапевтического агента представляет собой любое количество лекарственного препарата или агента, которое при применении отдельно или в комбинации с другим терапевтическим агентом обеспечивает эффект лечения, такой как защита субъекта от возникновения заболевания, или способствует регрессии заболевания, о чем свидетельствует уменьшение тяжести симптомов заболевания, увеличение частоты и продолжительности периодов без симптомов заболевания, или предотвращению нарушений или недееспособности вследствие заболевания. Способность терапевтического агента способствовать регрессии заболевания можно оценивать, используя ряд способов, известных квалифицированному практикующему врачу, например, у субъектов-людей во время клинических исследований, в животных модельных системах, прогнозирующих эффективность у людей, или путем анализа активности агента в *in vitro* анализах.

В качестве примера для лечения опухолей, в одном варианте осуществления терапевтически эффективное количество противоракового агента ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на около 10%, по меньшей мере на около 20%, по меньшей мере на около 30%, по меньшей мере на около 40%, по меньшей мере на около 50%, по меньшей мере на около 60%, по меньшей мере на около 70%, по меньшей мере на около 80%, по меньшей мере на около 90%, по меньшей мере на около 95%, по меньшей мере на около 96%, по меньшей мере на около 97%, по меньшей мере на около 98% или по меньшей мере на около 99% у проходящих лечение субъектов (например, одного или более проходящих лечение субъектов) по сравнению с не проходящими лечение субъектами (например, одним или более не проходящими лечение субъектами). В

некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество противоракового агента ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100% у проходящих лечение субъектов (например, одного или более проходящих лечение субъектов) по сравнению с не проходящими лечение субъектами (например, одним или более не проходящими лечение субъектами). В других вариантах осуществления изобретения регрессия опухоли может наблюдаться и продолжаться в течение периода по меньшей мере около 20 дней, по меньшей мере около 30 дней, по меньшей мере около 40 дней, по меньшей мере около 50 дней или по меньшей мере около 60 дней.

Терапевтически эффективное количество лекарственного препарата включает «профилактически эффективное количество», которое представляет собой любое количество лекарственного препарата, которое при введении отдельно или в комбинации с противораковым агентом субъекту с риском развития рака (например, субъекту, имеющему предзлокачественное состояние) или с рецидивом рака ингибирует развитие или рецидив рака. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает развитие или рецидив рака. «Ингибирование» развития или рецидива рака означает уменьшение вероятности развития или рецидива рака или полное предотвращение развития или рецидива рака.

В контексте данного документа термин «субтерапевтическая доза» означает дозу терапевтического соединения, которая ниже обычной или типичной дозы терапевтического соединения при отдельном его введении для лечения гиперпролиферативного заболевания (например, рака).

Термин «введение» относится к физическому внесению терапевтического агента субъекту с использованием любых из различных способов и систем доставки, известных специалистам в данной области техники. Типовые пути введения включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, внутривентриальный, спинальной или другие парентеральные пути введения, например путем инъекции или инфузии (например, внутривенной инфузии). Введение также можно проводить, например, один раз, много раз и/или в течение одного или более продленных периодов.

В контексте данного документа термин «монотерапия» означает, что антитело к ALPP/ALPPL2 или ADC по изобретению является единственным противораковым агентом, вводимым субъекту во время курса лечения. При этом субъекту можно вводить другие терапевтические агенты. Например, противовоспалительные агенты или другие агенты, вводимые субъекту с раком для лечения симптомов, связанных с раком, но не самого рака, включая, например, воспаление, боль, потерю массы и общее недомогание, можно вводить во время периода монотерапии.

Введение «в комбинации с» одним или более дополнительными терапевтическими средствами включает одновременное (параллельное) и последовательное введение в любом порядке.

Термин «одновременно» используется в данном документе для обозначения введения двух или более терапевтических агентов, когда по меньшей мере часть введения

перекрывается во времени или когда введение одного терапевтического агента происходит в течение короткого периода времени относительно введения другого терапевтического агента. Например, два или более терапевтических агентов вводят одновременно или с разделением во времени, составляющим не более чем около 60 минут, например, не более чем около 30, 15, 10, 5 или 1 минута.

Термин «последовательно» используется в данном документе для обозначения введения двух или более терапевтических агентов, когда введение одного или более агента(ов) продолжается после прекращения введения одного или более других агентов. Например, два или более терапевтических агентов вводят с разделением во времени, составляющим не более чем около 15 минут, например около 20, 30, 40, 50 или 60 минут, 1 день, 2 дня, 3 дня, 1 неделю, 2 недели, 1 месяц или более.

Термин «химиотерапевтический агент» относится ко всем химическим соединениям, которые эффективно ингибируют рост опухоли. Неограничивающие примеры химиотерапевтических агентов включают алкилирующие агенты (например, азотистые иприты, соединения этиленмина и алкилсульфонаты); антиметаболиты (например, антагонисты фолиевой кислоты, пурина или пиримидина); митотические ингибиторы (например, антитубулиновые агенты, такие как алкалоиды барвинка, ауристатины и производные подофиллотоксина); цитотоксические антибиотики; соединения, которые повреждают или препятствуют экспрессии или репликации ДНК (например, агенты, связывающие малую бороздку ДНК); и антагонисты рецепторов фактора роста, а также цитотоксические или цитостатические агенты.

Выражение «фармацевтически приемлемый» указывает на то, что вещество или композиция являются химически и/или токсикологически совместимыми с другими ингредиентами, составляющими состав, и/или субъектом, которого ими лечат.

Термины «фармацевтический состав» и «фармацевтическая композиция» относятся к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, и который не содержит каких-либо дополнительных компонентов, которые являются неприемлемо токсичными для субъекта, которому будут вводить состав. Такие составы могут быть стерильными.

«Фармацевтически приемлемый носитель» относится к нетоксичному твердому, полутвердому или жидкому наполнителю, разбавителю, инкапсулирующему материалу, вспомогательному составу или носителю, традиционному в данной области техники для применения с терапевтическим агентом, что вместе составляет «фармацевтическую композицию» для введения субъекту. Фармацевтически приемлемый носитель нетоксичен для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и совместим с другими ингредиентами состава. Фармацевтически приемлемый носитель подходит для применяемого состава.

В контексте данного документа выражение «фармацевтически приемлемая соль» относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Типовые соли включают, но не ограничиваются этим, такие

соли, как сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфат, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентисинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат, «мезилат», этансульфонат, бензолсульфонат, п-толуолсульфонат, памоат (т. е. 4,4'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)), соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может подразумевать включение другой молекулы, такой как ацетат-ион, сукцинат-ион или другой противоион. Противоион может быть любым заряженным органическим или неорганическим фрагментом, который стабилизирует противоположный заряд исходного соединения. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь более одного заряженного атома в своей структуре. Случаи, когда несколько заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут включать наличие нескольких противоионов. Следовательно, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Различные аспекты изобретения более подробно описаны в следующих разделах.

II. Обзор

В изобретении предложены конъюгаты антитело-лекарственный препарат, содержащие антитела к ALPP, конъюгированные с vcMMAE (иногда называемым в данном документе mc-vc-PABC-MMAE или mc-vc-MMAE) или dLAE-MMAE (иногда называемым в данном документе mp-dLAE-PABC-MMAE или mp-dLAE-MMAE), которые являются в особенности эффективными в уничтожении экспрессирующих ALPP+ клеток. В изобретении также предложены конъюгаты антитело-лекарственный препарат, содержащие антитела к ALPPL2, конъюгированные с vcMMAE или dLAE-MMAE, которые являются в особенности эффективными в уничтожении экспрессирующих ALPPL2+ клеток. В предпочтительных вариантах осуществления в изобретении предложены антитела, которые связывают как ALPP, так и ALPPL2 (антитела к ALPP/ALPPL2), конъюгированные с vcMMAE или dLAE-MMAE, которые являются в особенности эффективными в уничтожении экспрессирующих как ALPP+, так и ALPPL2+ клеток. Было показано, что как ALPP, так и ALPPL2 экспрессируются при ряде видов рака, включая рак яичника, рак легкого, рак эндометрия, рак яичка и рак желудка.

В данном документе предложены антигенсвязывающие белки (ABP), включая их антигенсвязывающие фрагменты (например, антитела и их антигенсвязывающие фрагменты), которые связывают ALPP/ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки и фрагменты содержат антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с ALPP, в том числе с ALPP человека (например, SEQ ID NO: 2). В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки и фрагменты содержат антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с ALPPL2, в том числе с ALPPL2 человека (например, SEQ ID NO: 4). В некоторых вариантах

осуществления антигенсвязывающие белки и фрагменты содержат антигенсвязывающий домен, который специфически связывается с как с ALPP, так и с ALPPL2, в том числе с ALPP человека (например, SEQ ID NO: 2) и ALPPL2 человека (например, SEQ ID NO: 4).

III. Анти-ALPP/ALPPL2 антигенсвязывающие белки, включая фрагменты

В данном документе предложен ряд антигенсвязывающих белков, которые более подробно описаны ниже. Антигенсвязывающие белки, описанные в данном документе, как правило, содержат остов, такой как полипептид или полипептиды, в который внедрены, привиты и/или присоединены одна или более (например, 1, 2, 3, 4, 5 или 6) гипервариабельных областей (HVR) или определяющих комплементарность областей (CDR). В некоторых антигенсвязывающих белках HVR или CDR внедрены, привиты или присоединены в «каркасную» область, которая ориентирует HVR или CDR так, чтобы обеспечить надлежащие антигенсвязывающие свойства HVR или CDR. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок содержит один или более доменов VH и/или VL.

В некоторых антигенсвязывающих белках последовательности HVR или CDR внедрены, привиты или присоединены в белковый остов или другой биосовместимый полимер. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой антитело или получен из антитела. Соответственно, предложенные антигенсвязывающие белки включают, но не ограничиваются этим, моноклональные антитела, мультиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), минитела, доменные антитела, синтетические антитела (иногда называемые в данном документе «миметиками антител»), химерные антитела, гуманизированные антитела, человеческие антитела, слияния антител, конъюгаты антител и части и фрагменты каждого из вышеприведенного. Примеры предложенных в данном документе антигенсвязывающих белков, которые являются фрагментами, включают, но не ограничиваются этим, Fab, Fab', F(ab')₂, scFv и доменное антитело.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки связываются с ALPP с аффинностью (например, K_D) менее чем 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 250 пМ, 200 пМ, 150 пМ, 130 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 25 пМ, 10 пМ или 1 пМ. В некоторых вариантах осуществления АВР связывается с ALPP с аффинностью 1 пМ - 10 нМ, 1 пМ - 5 нМ, 1 пМ - 1 нМ, 100-200 пМ, 100-150 пМ или 120-140 пМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания с ALPP определяют в соответствии с анализами, описанными в примерах. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающие белки связываются с ALPPL2 с аффинностью (например, K_D) менее 10 нМ, 5 нМ, 2 нМ, 1 нМ, 500 пМ, 250 пМ, 100 пМ, 50 пМ, 44 пМ, 25 пМ, 10 пМ или 1 пМ. В некоторых вариантах осуществления АВР связывается с ALPPL2 с аффинностью 0,1 пМ - 5 нМ, 0,1 пМ - 1 нМ, 1 пМ - 1 нМ, 1-100 пМ, 1-75 пМ, 10-75 пМ, 10-50 пМ или 30-50 пМ. В некоторых вариантах осуществления аффинность связывания с ALPPL2 определяют в соответствии с анализами, описанными в примерах.

A. Типовые антигенсвязывающие белки, включая фрагменты

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению включает антитело 12F3, описанное в примерах в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок по изобретению включает мышинные, химерные, гуманизированные и/или человеческие антитела 12F3.

В одном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 56-58 или 60-62, соответственно; и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63-65 или 68-70, соответственно. В дополнительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 56-58, соответственно, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 63-65, соответственно, при этом CDR определены по Kabat. В дополнительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, содержит CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 60-62, соответственно, и CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, содержащие аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 68-70, соответственно, при этом CDR определены по IMGT.

В дополнительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, содержит VH, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и VL, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

В дополнительном варианте осуществления антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, содержит HC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

В других вариантах осуществления предложенные антигенсвязывающие белки содержат или получены из одной или более CDR, переменных областей тяжелой цепи, переменных областей легкой цепи, тяжелых цепей и/или легких цепей антител, описанных ниже.

В другом варианте осуществления АВР содержит (a) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VH, при этом последовательности CDR VH представляют собой/выбраны из (i) CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60; (ii) CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61; и (iii) CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 62, и (b) домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VL, при этом последовательности CDR VL представляют собой/выбраны из (i) CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 68; (ii) CDR-L2, содержащей

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 69; и (iii) CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 70, при условии, что в вариантах осуществления, в которых АВР содержит несколько CDR, каждая CDR выбрана из отличной группы.

В другом варианте осуществления АВР содержит (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VH, при этом последовательности CDR VH представляют собой/выбраны из (i) CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; (ii) CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и (iii) CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, и (b) а VL домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VL, при этом последовательности CDR VL представляют собой/выбраны из (i) CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63; (ii) CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и (iii) CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65, при этом CDR определены по Kabat, и при условии, что в вариантах осуществления, в которых АВР содержит несколько CDR, каждая CDR выбрана из отличной группы.

В другом варианте осуществления АВР содержит (а) домен VH, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VH, при этом последовательности CDR VH представляют собой/выбраны из (i) CDR-H1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; (ii) CDR-H2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и (iii) CDR-H3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62, и (b) а VL домен VL, содержащий по меньшей мере одну, по меньшей мере две или все три последовательности CDR VL, при этом последовательности CDR VL представляют собой/выбраны из (i) CDR-L1, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; (ii) CDR-L2, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и (iii) CDR-L3, содержащей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70, при этом CDR определены по IMGT, и при условии, что в вариантах осуществления, в которых АВР содержит несколько CDR, каждая CDR выбрана из отличной группы.

В другом варианте осуществления АВР содержит (а) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60; (b) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61; и (c) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 62; (d) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 68 ;(e) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 69; и (f) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 70.

В другом варианте осуществления АВР содержит (а) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; (b) CDR-H2, содержащую

аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; и (c) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58, (d) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 (e) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64; и (f) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; при этом CDR определены по Kabat.

В другом варианте осуществления ABP содержит (a) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; (b) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; и (c) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; (d) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68; (e) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69; и (f) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; при этом CDR определены по IMGT.

Определенные ABP содержат VH, содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, при этом CDR VH вместе имеют не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных изменений по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и при этом эталонная последовательность CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60, эталонная последовательность CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61, а эталонная последовательность CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 62. В таких вариантах осуществления аминокислотные изменения, как правило, представляют собой вставки, делеции и/или замены. В некоторых из этих вариантов осуществления общее число аминокислотных изменений составляет 1-3; в других вариантах осуществления общее число аминокислотных изменений составляет 1 или 2. В определенных из вышеприведенных вариантов осуществления изменения представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В других вариантах осуществления ABP содержит VL, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом CDR VL вместе имеют не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных изменений по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и при этом эталонная последовательность CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 68, эталонная последовательность CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 69, а эталонная последовательность CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 70. В таких вариантах осуществления аминокислотные изменения, как правило, представляют собой вставки, делеции и/или замены. В некоторых из этих вариантов осуществления общее число аминокислотных изменений составляет 1-3; в других вариантах осуществления общее число аминокислотных изменений составляет 1 или 2. В определенных из вышеприведенных вариантов осуществления изменения представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В другом варианте осуществления ABP содержит (a) VH, содержащую VH,

содержащую CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, при этом CDR VH вместе имеют не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных изменений по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и при этом эталонная последовательность CDR-H1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60, эталонная последовательность CDR-H2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61, а эталонная последовательность CDR-H3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 62, и (b) VL, содержащую CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, при этом CDR VL вместе имеют не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных изменений по сравнению с соответствующей эталонной последовательностью CDR, и при этом эталонная последовательность CDR-L1 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 68, эталонная последовательность CDR-L2 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 69, а эталонная последовательность CDR-L3 имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 70. В таких вариантах осуществления аминокислотные изменения, как правило, представляют собой вставки, делеции и/или замены. В некоторых из этих вариантов осуществления общее число аминокислотных изменений составляет 1-3; в других вариантах осуществления общее число аминокислотных изменений составляет 1 или 2. В определенных из вышеприведенных вариантов осуществления изменения представляют собой консервативные аминокислотные замены.

В другом варианте осуществления АВР содержит домен VH, при этом последовательность домена VH имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 9-16, при условии, что АВР сохраняет способность связываться с ALPP и/или ALPPL2. В определенных вариантах осуществления такой АВР содержит замены (например, консервативные замены), вставки и/или делеции по сравнению с эталонной последовательностью (т. е. одной из SEQ ID NO: 9-16), при условии, что такой АВР сохраняет способность связываться с ALPP и/или ALPPL2. В определенных вариантах осуществления было заменено, вставлено и/или удалено 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот в любой из SEQ ID NO: 9-16. В некоторых вариантах осуществления было заменено, вставлено и/или удалено 1-5 или 1-3 аминокислоты в последовательности VH. В определенных из таких вариантов осуществления такие замены, вставки или делеции находятся в областях за пределами CDR (т. е. в FR).

В другом варианте осуществления АВР содержит домен VL, при этом последовательность домена VL имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 22-33, при условии, что АВР сохраняет способность связываться с ALPP и/или ALPPL2. В определенных вариантах осуществления такой АВР содержит замены (например, консервативные замены), вставки

и/или делеции по сравнению с эталонной последовательностью (т. е. одной из SEQ ID NO: 22-33), при условии, что такой АВР сохраняет способность связываться с ALPP и/или ALPPL2. В определенных вариантах осуществления было заменено, вставлено и/или удалено 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 аминокислот в любой из SEQ ID NO: 22-33. В некоторых вариантах осуществления было заменено, вставлено и/или удалено 1-5 или 1-3 аминокислоты в последовательности VL. В определенных из таких вариантов осуществления такие замены, вставки или делеции находятся в областях за пределами CDR (т. е. в FR).

В дополнительном варианте осуществления АВР содержит (а) домен VH, при этом последовательность домена VH имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 9-16, и (б) домен VL, при этом последовательность домена VL имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью, выбранной из любой из SEQ ID NO: 22-33, при условии, что АВР сохраняет способность связываться с ALPP и/или ALPPL2.

В дополнительном варианте осуществления АВР содержит (а) домен VH, при этом последовательность домена VH имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и (б) домен VL, при этом последовательность домена VL имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30, при условии, что АВР сохраняет способность связываться с ALPP и/или ALPPL2.

Антигенсвязывающий белок в любом из вышеприведенных вариантов осуществления может представлять собой антитело в любой форме. Таким образом, антигенсвязывающий белок, описанный в любом из вышеприведенных вариантов осуществления, может представлять собой, например, моноклональное антитело, мультиспецифические антитело, человеческое, гуманизированное или химерное антитело, ALPP-связывающие фрагменты любого из вышеперечисленного, такие как одноцепочечное антитело, фрагмент Fab, фрагмент F(ab') или фрагмент, полученный из экспрессионной библиотека Fab. Антитела могут относиться к любому изотипу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу иммуноглобулина.

В определенных вариантах осуществления АВР с последовательностями CDR и/или варибельного домена, описанными в данном документе, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент (например, человеческие антигенсвязывающие фрагменты) и включает, но не ограничивается этим, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, дисульфид-связанные Fv (sdFv) и фрагменты, содержащие домен VL или VH. Антигенсвязывающие фрагменты, включая

одноцепочечные антитела, могут содержать вариабельную(ые) область(и), отдельно или в комбинации с фрагментом или частью следующего: шарнирной области, доменов CH1, CH2, CH3 и CL. Также в настоящее изобретение включены антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию вариабельной(ых) области(ей) с шарнирной областью, доменами CH1, CH2, CH3 и CL.

ABP может быть моноспецифическим, биспецифическим, триспецифическим или более мультиспецифическим. Мультиспецифические антитела могут быть специфическими в отношении разных эпитопов ALPP и/или ALPPL2 или могут быть специфическими в отношении как ALPP, так и ALPPL2, а также в отношении гетерологичного белка. Смотрите, например, публикации PCT WO 93/17715; WO 92/08802; WO 91/00360; WO 92/05793; Tutt, et al., 1991, J. Immunol. 147:60-69; патенты США №№ 4474893; 4714681; 4925648; 5573920; 5601819; и Kostelny et al., 1992, J. Immunol. 148:1547-1553.

В любом из описанных в данном документе вариантов осуществления одна или несколько аминокислот (например, 1, 2, 3 или 4) на амино- или карбокси-конце легкой и/или тяжелой цепи, таких как С-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или быть дериватизированными в некоторых или всех молекулах в композиции. Одним конкретным примером такой модификации является ABP, в котором отсутствует карбокси-концевой лизин тяжелой цепи (например, как часть посттрансляционной модификации). Кроме того, следует понимать, что любые из описанных в данном документе последовательностей, включают посттрансляционные модификации конкретной последовательности во время экспрессии ABP в культуре клеток (например, в культуре клеток CHO).

В. Химерные антигенсвязывающие белки

В определенных вариантах осуществления предложенный в данном документе антигенсвязывающий белок представляет собой химерное антитело. В некоторых вариантах осуществления химерное антитело содержит нечеловеческую вариабельную область (например, вариабельную область, полученную от мыши, крысы, кролика или отличного от человека примата, такого как обезьяна) и человеческую константную область. В дополнительном примере химерное антитело представляет собой антитело с «переключенным классом», класс или подкласс которого был изменен по сравнению с родительским антителом. Определенные химерные антитела описаны, например, в патенте США № 4816567; и Morrison et al., (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Химерные антитела включают их антигенсвязывающие фрагменты.

Неограничивающие типовые химерные антитела, включают химерные антитела, содержащие любые из вариабельных областей тяжелой и/или легкой цепей, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления вариабельные домены тяжелой и/или легкой цепи выбраны из Дополнительные неограничивающие типовые химерные антитела включают химерные антитела, содержащие последовательности HVR тяжелой цепи (например, CDR) или их части и последовательности HVR легкой цепи

(например, CDR) , предложенные в данном документе.

С. Гуманизированные антигенсвязывающие белки

В определенных вариантах осуществления АВР представляет собой гуманизированное антитело, которое связывает ALPP и/или ALPPL2. Как правило, нечеловеческое антитело гуманизируют для снижения иммуногенности для человека с сохранением при этом специфичности и аффинности родительского нечеловеческого антитела. Гуманизированное антитело представляет собой генетически сконструированное антитело, в котором HVR (например, CDR) или их части из нечеловеческого «донорного» антитела привиты в последовательности человеческого «акцепторного» антитела (смотрите, например, Queen, US 5530101 и 5585089; Winter, US 5225539; Carter, US 6407213; Adair, US 5859205; и Foote, US 6881557).

Акцепторные последовательности антитела могут представлять собой, например, последовательность зрелого человеческого антитела, композицию таких последовательностей, консенсусную последовательность последовательностей человеческого антитела или последовательность зародышевой области. Человеческие акцепторные последовательности можно выбирать на основании высокой степени идентичности последовательностей в каркасных областях варибельной области с донорными последовательностями для совпадения канонических форм между акцепторными и донорными HVR или CDR, помимо других критериев. Таким образом, гуманизированное антитело представляет собой антитело, имеющее HVR или CDR, полученные полностью или преимущественно из донорного антитела, и каркасные последовательности варибельной области и константные области, при наличии, полученные полностью или преимущественно из последовательностей человеческого антитела. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь, как правило, имеет все три HVR или CDR, полученные полностью или преимущественно из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность варибельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, при наличии, полученные преимущественно из человеческих последовательностей каркасной области варибельной области и константной области тяжелой цепи. Аналогично, гуманизированная легкая цепь обычно имеет все три CDR, полученные полностью или преимущественно из легкой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность варибельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, при наличии, полученные преимущественно из человеческих последовательностей каркасной области варибельной области и константной области легкой цепи. HVR или CDR в гуманизированном антителе получены преимущественно из соответствующих HVR или CDR в нечеловеческом антителе, при этом по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (согласно определению Kabat) являются идентичными между соответствующими HVR или CDR. Каркасные последовательности варибельной области цепи антитела или константная область цепи антитела получены преимущественно из человеческой каркасной последовательности варибельной области или человеческой константной

области, соответственно, при этом по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков согласно определению Kabat являются идентичными.

Хотя гуманизированные антитела часто содержат все шесть HVR (например, CDR, предпочтительно согласно определению Kabat) из мышинового антитела, их также можно создавать с менее чем всеми HVR или CDR (например, по меньшей мере 3, 4 или 5 HVR или CDR) из мышинового антитела (например, Pascalis et al., *J. Immunol.* 169:3076, 2002; Vajdos et al., *Journal of Molecular Biology*, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., *Mol. Immunol.* 36:1079-1091, 1999; и Tamura et al., *Journal of Immunology*, 164:1432-1441, 2000).

Определенные аминокислоты из каркасных остатков человеческой вариабельной области можно выбирать для замены на основании их возможного влияния на конформацию HVR (например, CDR) и/или связывание с антигеном. Исследование таких возможных влияний осуществляют путем моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных локациях или на основании эмпирического наблюдения за эффектами замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, когда отличается аминокислота между мышинным каркасным остатком вариабельной области и выбранным человеческим каркасным остатком вариабельной области, человеческую каркасную аминокислоту можно замещать любой эквивалентной каркасной аминокислотой из мышинового антитела, когда целесообразно ожидать, что эта аминокислота:

- (1) нековалентно напрямую связывает антиген,
- (2) является смежной с областью HVR или CDR,
- (3) иным образом взаимодействует с областью HVR или CDR (например, в пределах около 6 Å от такой области);
- (4) опосредует взаимодействие между тяжелой и легкой цепями или
- (5) является результатом соматической мутации в мышинной цепи,
- (6) является сайтом гликозилирования.

Каркасные остатки из классов (1)-(3) иногда называются попеременно каноническими и верньерными остатками. Канонические остатки относятся к каркасным остаткам, определяющим канонический класс донорных петель CDR, определяющих структуру петли CDR (Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901-917 (1987), Thornton & Martin, *J. Mol. Biol.*, 263, 800-815, 1996). Верньерные остатки относятся к слою каркасных остатков, которые поддерживают конформацию антигенсвязывающей петли и играют роль в точном определении соответствия антитела антигену (Foote & Winter, 1992, *J Mol Bio.* 224, 487-499).

Обзор гуманизированных антител и способов их получения приведен, например, в Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13: 1619-1633, а дополнительное описание приведено, например, в Riechmann et al., (1988) *Nature* 332:323-329; Queen et al., (1989) *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86: 10029-10033; патентах США №№ 5821337, 7527791, 6982321 и 7087409; Kashmiri et al., (2005) *Methods* 36:25-34 (где описано прививание определяющей специфичность области (SDR)); Padlan, (1991) *Mol. Immunol.* 28:489-498

(где описано «изменение поверхности»); Dall'Acqua et al., (2005) *Methods* 36:43-60 (где описана «перетасовка FR»); и Osbourn et al., (2005) *Methods* 36:61-68 and Klimka et al., (2000) *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (где описан подход «направленного отбора» для перетасовки FR).

Человеческие каркасные области, которые можно использовать для гуманизации, включают, но не ограничиваются этим: каркасные области, выбранные с использованием метода «наилучшего соответствия» (смотрите, например, Sims et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2296); каркасные области, полученные из консенсусной последовательности человеческих антител определенной подгруппы переменных областей легкой или тяжелой цепи (смотрите, например, Carter et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285; и Presta et al. (1993) *J. Immunol.* 151:2623); зрелые человеческие каркасные области (соматически мутированные) или каркасные области человеческой зародышевой линии (смотрите, например, Almagro and Fransson, (2008) *Front. Biosci.* 13:1619-1633); и каркасные области, полученные из скрининговых библиотек FR (смотрите, например, Vasa et al., (1997) *J. Biol. Chem.* 272: 10678-10684 и Rosok et al., (1996) *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618).

Неограничивающие типовые гуманизированные антитела, включают гуманизированные антитела, содержащие или полученные из любых CDR и/или переменных областей тяжелой и/или легкой цепи, описанных в данном документе. Конкретный пример таких антител включает гуманизированные формы мышиного антитела 12F3. Один такой гуманизированный вариант мышиного антитела 12F3 обозначен как HGLF, который содержит зрелую переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и зрелую переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30. Гуманизированные антитела по изобретению включают варианты гуманизированного антитела HGLF, в которых гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичности с SEQ ID NO: 15, а гуманизированная зрелая переменная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичности последовательности с SEQ ID NO: 30. Предпочтительно в таких антителах сохранены некоторые или все обратные мутации в HGLF. Другими словами, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6 или предпочтительно все 7 позиций тяжелой цепи H30, H37, H48, H49, H73, H78 и H93 заняты T, V, L, A, N, L и A, соответственно. Аналогично, по меньшей мере 1, 2, 3, 4 или предпочтительно все 4 позиции легкой цепи L2, L38, L49 и L69 заняты T, Y, H и R, соответственно. HGLF более подробно описан в примерах и имеет последовательности, приведенные на Фиг. 5-8.

D. Типовые константные области антител

В случае тех вариантов осуществления, в которых АВР представляют собой антитела, переменные области тяжелой и легкой цепей описанных в данном документе антител могут быть связаны по меньшей мере с частью человеческой константной

области. В некоторых вариантах осуществления человеческая константная область тяжелой цепи относится к изотипу, выбранному из IgA, IgG и IgD. В некоторых вариантах осуществления человеческая константная область легкой цепи относится к изотипу, выбранному из κ и λ . В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область человеческого IgG. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область тяжелой цепи человеческого IgG4. В некоторых из этих вариантов осуществления описанное в данном документе антитело содержит мутацию S228P в константной области человеческого IgG4. В некоторых вариантах осуществления описанное в данном документе антитело содержит константную область человеческого IgG4 и человеческую легкую цепь κ .

В тексте настоящего описания и формуле изобретения, если иное явно не указано или не известно специалисту в данной области техники, нумерация остатков в тяжелой цепи иммуноглобулина соответствует индексу EU, описанному в Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991), которая в явном виде включена в данный документ посредством ссылки. «Индекс EU в соответствии с Kabat» относится к нумерации EU остатков человеческого антитела IgG1.

Человеческие константные области демонстрируют аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию среди разных индивидов, то есть константные области могут отличаться у разных индивидов в одной или более полиморфных позициях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотка, распознающая изоаллотип, связывается с непалиморфной областью а одного или более других изотипов. Упоминание человеческой константной области включает константную область с любым природным аллотипом или любой перестановкой остатков, занимающих полиморфные позиции в природных аллотипах. Также могут присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций по сравнению с природной человеческой константной областью, таких как указанные выше, для снижения связывания с Fc γ -рецептором или повышения связывания с FcRn.

В некоторых вариантах осуществления одна или несколько аминокислот на аминокислотном или карбокси-конце легкой и/или тяжелой цепи, таких как C-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать или быть дериватизированными в части молекул или во всех молекулах.

Выбор константной области частично зависит от того, необходимы ли антителозависимая клеточноопосредованная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или комплементзависимая цитотоксичность. Например, человеческие изотипы IgG1 и IgG3 обладают сильной комплементзависимой цитотоксичностью, человеческий изотип IgG2 обладает слабой комплементзависимой цитотоксичностью, а человеческий IgG4 не обладает комплементзависимой цитотоксичностью. Человеческие IgG1 и IgG3 также индуцируют более сильные клеточноопосредованные эффекторные функции, чем человеческие IgG2 и IgG4.

Константные области легкой цепи могут представлять собой лямбда или каппа.

Кроме того, как более подробно описано ниже, замены можно проводить в константных областях для снижения или повышения эффекторной функции, такой как комплементопосредованная цитотоксичность или АЗКЦ (смотрите, например, Winter et al., патент США № 5624821; Tso et al., патент США № 5834597; и Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), или для продления времени полужизни у людей (смотрите, например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

Е. Варианты

Предложенные в данном документе антигенсвязывающие белки также включают варианты по аминокислотной последовательности предложенных в данном документе антигенсвязывающих белков. В качестве примера, можно получать варианты с улучшенной аффинностью связывания и/или другими биологическими свойствами антитела. Варианты по аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка может можно получать посредством внесения соответствующих модификаций в нуклеотидную последовательность, кодирующую антигенсвязывающий белок, или посредством пептидного синтеза. Такие модификации включают, например, делеции из, и/или вставки в, и/или замены остатков в аминокислотных последовательностях антигенсвязывающего белка. Можно осуществлять любую комбинацию делеции, вставки и замены для получения конечной конструкции при условии, что конечная конструкция обладает необходимыми характеристиками, например, связывания антигена.

1. Варианты с заменами, вставками и делециями

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок представляет собой вариант, который имеет одну или более аминокислотных замен, делеций и/или вставок по сравнению с антигенсвязывающим белком, описанным в данном документе. В определенных таких вариантах осуществления вариант имеет одну или более аминокислотных замен. В дополнительных таких вариантах осуществления замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

Аминокислотная замена включает, но не ограничивается этим, замену одной аминокислоты в полипептиде другой аминокислотой. Консервативные аминокислотные замены могут включать не встречающиеся в природе аминокислотные остатки, которые, как правило, вносят путем химического пептидного синтеза, а не посредством синтеза в биологических системах. Встречающиеся в природе остатки можно разделить на классы на основании общих свойства боковых цепей:

- (1) гидрофобные: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) кислые: Asp, Glu;
- (4) основные: His, Lys, Arg;
- (5) остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;
- (6) ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Сайты, представляющие интерес для заместительного мутагенеза, включают CDR

и FR. Консервативные замены приведены в таблице 2 ниже под заголовком «предпочтительные замены». Более существенные изменения приведены в таблице 2 под заголовком «типовые замены» и дополнительно описаны ниже в связи с классами аминокислотных боковых цепей. Аминокислотные замены можно вносить в представляющее интерес антитело и проводить скрининг продуктов в отношении необходимой активности, например, сохранения/улучшения связывания антигена, снижения иммуногенности или улучшения АЗКЦ или КЗЦ.

Таблица 2

Оригинальный остаток	Типовые замены	Предпочтительные замены
Ala	Val; Leu; Ile	Val
Arg	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
Asp	Glu; Asn	Glu
Cys	Ser; Ala	Ser
Gln	Asn; Glu	Asn
Glu	Asp; Gln	Asp
Gly	Pro; Ala	Ala
His	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Норлейцин	Leu
Leu	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys	Arg; Gln; Asn	Arg
Met	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro	Ala	Ala
Ser	Thr; Ala; Cys	Thr
Thr	Val; Ser	Ser
Trp	Tyr; Phe	Tyr
Tyr	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe

Val	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu
-----	------------------------------------	-----

Неконсервативные замены включают замену представителя одного из этих классов представителем другого класса.

При изменении аминокислотной последовательности антигенсвязывающего белка (например, антитела к ALPP/ALPPL2) в некоторых вариантах осуществления может учитываться индекс гидропатичности аминокислот. Каждой аминокислоте был приписан индекс гидропатичности на основании ее гидрофобности и зарядовых характеристик следующим образом: изолейцин (+4,5); валин (+4,2); лейцин (+3,8); фенилаланин (+2,8); цистеин/цистин (+2,5); метионин (+1,9); аланин (+1,8); глицин (-0,4); треонин (-0,7); серин (-0,8); триптофан (-0,9); тирозин (-1,3); пролин (-1,6); гистидин (-3,2); глутамат (-3,5); глутамин (-3,5); аспарат (-3,5); аспарагин (-3,5); лизин (-3,9) и аргинин (-4,5).

Важность индекса гидропатичности аминокислот в придании интерактивной биологической функции белку понятна в данной области техники. Kyte et al., 1982, J. Mol. Biol., 157:105-131. Известно, что некоторые аминокислоты могут быть замещены другими аминокислотами, имеющими схожий индекс или показатель гидропатичности, и при этом сохранять схожую биологическую активность. При внесении изменений на основании индекса гидропатичности, в определенные варианты осуществления включена замена аминокислот, чьи индексы гидропатичности находятся в пределах ± 2 . В определенные варианты осуществления включены те, которые находятся в пределах ± 1 , а в определенные варианты осуществления включены те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$.

Также в данной области техники известно, что замену подобных аминокислот можно эффективно осуществлять на основании гидрофильности, в частности, если биологически функциональный белок или пептид (например, антитело), созданный таким образом, предназначен для применения в иммунологических вариантах осуществления, как в данном случае. В некоторых вариантах осуществления наибольшая локальная средняя гидрофильность белка, определяемая гидрофильностью соседних аминокислот, коррелирует с его иммуногенностью и антигенностью, т. е. с биологическим свойством белка.

Этим аминокислотным остаткам приписаны следующие значения гидрофильности: аргинин (+3,0); лизин (+3,0 \pm 1); аспарат (+3,0 \pm 1); глутамат (+3,0 \pm 1); серин (+0,3); аспарагин (+0,2); глутамин (+0,2); глицин (0); треонин (-0,4); пролин (-0,5 \pm 1); аланин (-0,5); гистидин (-0,5); цистеин (-1,0); метионин (-1,3); валин (-1,5); лейцин (-1,8); изолейцин (-1,8); тирозин (-2,3); фенилаланин (-2,5) и триптофан (-3,4). При внесении изменений на основании сходных значений гидрофильности, в определенных вариантах осуществления включена замена аминокислот, значения гидрофильности которых находятся в пределах ± 2 , в определенных вариантах включены те, которые находятся в пределах ± 1 , и в определенных вариантах осуществления включены те, которые находятся в пределах $\pm 0,5$. Можно также идентифицировать эпитопы из первичных аминокислотных последовательностей на основании гидрофильности. Эти области также называют

«эпитопными коровыми областями».

В CDR можно осуществлять изменения (например, замены), например, для улучшения аффинности антитела. Такие изменения можно осуществлять в «горячих точках» CDR, т. е. в остатках, кодируемых кодонами, которые с высокой частотой подвергаются мутациям в процессе соматического созревания (смотрите, например, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), и/или остатках, которые контактируют с антигеном, при этом полученный вариант VH или VL исследуют в отношении аффинности связывания. Созревание аффинности путем конструирования и повторного отбора из вторичных библиотек описано, например, в Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, N.J., (2001)). В некоторых вариантах осуществления созревания аффинности разнообразие вносят в переменные гены, выбранные для созревания, любым из ряда способов (например, ПЦР с внесением ошибок, перетасовки цепей или олигонуклеотид-направленного мутагенеза). Затем создают вторичную библиотеку. Затем проводят скрининг библиотеки для идентификации любых вариантов антител с необходимой аффинностью. Другой способ для внесения разнообразия включает подходы, направленные на CDR, в которых рандомизируют несколько остатков CDR (4-6 остатков за раз). Остатки CDR, участвующие в связывании антигена, можно, в частности, идентифицировать, например, используя аланин-сканирующий мутагенез или моделирование. В частности, мишенью часто являются CDR-H3 и CDR-L3.

В некоторых вариантах осуществления замены, вставки или делеции могут находиться в одной или более CDR при условии, что такие изменения существенно не снижают способность антитела связывать антиген. Например, в CDR можно проводить консервативные изменения (например, консервативные замены, предложенные в данном документе), которые существенно не снижают аффинность связывания. Такие изменения могут, например, находиться за пределами остатков в CDR, контактирующих с антигеном. В определенных вариантах осуществления вариантных последовательностей VH и VL, приведенных выше, каждая CDR либо не изменена, либо содержит не более одной, двух или трех аминокислотных замен.

Применимый способ идентификации остатков или областей антитела, которые могут быть мишенями для мутагенеза, называется «аланин-сканирующим мутагенезом», описанным в Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В этом способе идентифицируют остаток или группу целевых остатков (например, заряженных остатков, таких как arg, asp, his, lys и glu) и заменяют нейтральной или отрицательно заряженной аминокислотой (например, аланином или полиаланином) для определения, влияет ли это на взаимодействие антитела с антигеном. Дополнительные замены можно вносить в аминокислотные положения, демонстрирующие функциональную чувствительность к исходным заменам. В альтернативном или дополнительном варианте используют кристаллическую структуру комплекса антиген-антитело для идентификации точек контакта между антителом и антигеном. Такие контактные остатки и расположенные

рядом остатки можно использовать в качестве мишеней или удалять из кандидатов для замены. Можно проводить скрининг вариантов для определения, имеют ли они необходимые свойства.

Вставки в аминокислотную последовательность включают амино- и/или карбокси-концевые слияния, имеющие длину в диапазоне от одного остатка до полипептидов, содержащих сто или более остатков, а также вставки внутри последовательности одного или нескольких аминокислотных остатков. Примеры концевых вставок включают антитело с N-концевым остатком метионила. Другие инсерционные варианты молекулы антитела включают слияние N- или C-конца антитела с ферментом (например, для ADEPT) или полипептидом, который увеличивает сывороточное время полужизни антитела.

2. Варианты с модифицированной Fc-областью

Антитела со сниженной эффекторной функцией включают антитела с заменой одного или более остатков 238, 265, 269, 270, 297, 327 и 329 Fc-области (патент США № 6737056). Такие Fc-мутанты включают Fc-мутантов с заменами в двух или более аминокислотных позициях 265, 269, 270, 297 и 327, включая так называемый Fc-мутант «DANA» с заменой остатков 265 и 297 на аланин (патент США № 7332581).

В определенных вариантах осуществления получают вариант антитела, который обладает улучшенным или сниженным связыванием с FcR. (Смотрите, например, патент США № 6737056; WO 2004/056312 и Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001).) В некоторых вариантах осуществления вариант антитела содержит Fc-область с одной или более аминокислотными заменами, которые улучшают АЗКЦ, например, заменами в позициях 298, 333 и/или 334 Fc-области (нумерация остатков EU). Например, системная замена доступных для растворителя аминокислот Fc-области человеческого IgG1 привела к созданию вариантов IgG с измененной аффинностью связывания FcγR (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). По сравнению с родительским IgG1 подгруппа этих вариантов, содержащих замены в Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333/Lys334 на Ala, демонстрирует повышенные аффинность связывания в отношении FcγR и АЗКЦ-активность (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604; Okazaki et al., 2004, *J. Mol. Biol.* 336:1239-49).

В некоторых вариантах осуществления изменения в Fc-области осуществляют для изменения (т. е. повышения или снижения) связывания C1q и/или комплементзависимой цитотоксичности (КЗЦ), например, как описано в патенте США № 6194551, WO 99/51642 и Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000). Например, активность фиксации комплемента антител (как связывание C1q, так и КЗЦ-активность) можно улучшить заменами в Lys326 и Glu333 (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166:2571-2575). Те же самые замены в скелете человеческого IgG2 могут преобразовать изотип антитела, который плохо связывается с C1q и имеет серьезный дефицит активности активации комплемента, в изотип, который может одновременно связывать C1q и опосредовать КЗЦ (Idusogie et al., 2001, *J. Immunol.* 166:2571-75). Несколько других методов также применяли для

улучшения активности фиксации комплемента антител. Например, прививание 18-аминокислотного карбокси-концевого хвостового фрагмента IgM к карбокси-концу IgG значительно усиливает их КЗЦ-активность. Это наблюдается даже в случае IgG4, который обычно не имеет выявляемой КЗЦ-активности (Smith et al., 1995, *J. Immunol.* 154:2226-36). Также замена Ser444, расположенного вблизи карбокси-конца тяжелой цепи IgG1, на Cys индуцировала димеризацию IgG1 «хвост к хвосту» с 200-кратным повышением КЗЦ-активности по сравнению с мономерным IgG1 (Shopes et al., 1992, *J. Immunol.* 148:2918-22). Кроме того, биспецифическая конструкция диатела со специфичностью в отношении C1q также придает КЗЦ-активность (Kontermann et al., 1997, *Nat. Biotech.* 15:629-31).

Активность комплемента можно уменьшить посредством мутации по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи на остаток с другой боковой цепью, такой как Ala. Другие алкилзамещенные неионные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Tyr, Trp и Pro на месте любого из этих трех остатков, также уменьшают или устраняют связывание C1q. Ser, Thr, Cys и Met можно использовать в остатках 320 и 322, но не 318, для уменьшения или устранения активности связывания C1q. Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может модифицировать, но не устранить активность связывания C1q. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к устранению литической активности, но лишь незначительно снижает (примерно в три раза) аффинность в отношении C1q. Это изменение разрушает сайт гликозилирования и присутствие углеводов, необходимых для активации комплемента. Любая другая замена в этом сайте также разрушает сайт гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также снижают связывание C1q: D270A, K322A, P329A и P311S (смотрите WO 06/036291).

Период полужизни предложенного в данном документе антитела можно увеличивать или уменьшать для модификации его терапевтической активности. FcRn представляет собой рецептор, структурно сходный с антигеном ГКГС класса I, который нековалентно связывается с β 2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз в тканях (Ghetie and Ward, 2000, *Annu. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Взаимодействие IgG-FcRn происходит при pH 6,0 (pH внутриклеточных везикул), но не при pH 7,4 (pH крови); это взаимодействие позволяет возвращать IgG обратно в кровоток (Ghetie and Ward, 2000, *Ann. Rev. Immunol.* 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, *Immunol. Res.* 25:97-113). Была картирована область человеческого IgG₁, участвующая в связывании FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Замены на аланин в позициях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 человеческого IgG₁ повышают связывание FcRn (Shields et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276:6591-604). Молекулы IgG₁, имеющие эти замены, имеют более длительный сывороточный период полужизни. Следовательно, эти модифицированные молекулы IgG₁ могут выполнять свои эффекторные функции и, таким образом, проявлять свою терапевтическую эффективность в течение более длительного периода времени по сравнению с IgG₁. Другие иллюстративные замены для повышения связывания с FcRn

включают Gln в позиции 250 и/или Leu в позиции 428. Другие исследования показали, что связывание Fc-области с FcRn можно улучшить путем внесения одной или более замен в одном или более из следующих остатков Fc-области: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 или 434, например, замены остатка Fc-области 434 (смотрите, например, патент США № 7371826; и US 7361740).

3. Варианты антител с модифицированным гликозилированием

В определенных вариантах осуществления предложенное в данном документе антитело содержит одну или более модификаций для увеличения или уменьшения степени, в которой антитело является гликозилированным. Добавление или удаление сайтов гликозилирования в антителе можно легко осуществлять путем изменения аминокислотной последовательности так, чтобы создать или удалить один или более сайтов гликозилирования.

Если антитело содержит Fc-область, можно изменять присоединенный к ней углевод. Нативные антитела, вырабатываемые клетками млекопитающих, как правило, содержат разветвленный биантеннарный олигосахарид, который обычно присоединен N-связью к Asn297 домена CH2 Fc-области. Смотрите, например, Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32 (1997). Олигосахарид может включать различные углеводы, например, маннозу, N-ацетилглюкозамин (GlcNAc), галактозу и сиаловую кислоту, а также фукозу, присоединенную к GlcNAc в «стебле» биантеннарной структуры олигосахаридов.

Конструирование этой гликоформы на IgG может существенно улучшить IgG-опосредованную АЗКЦ. Добавление разделяющих пополам N-ацетилглюкозаминных модификаций (Umana et al., 1999, *Nat. Biotechnol.* 17:176-180; Davies et al., 2001, *Biotech. Bioeng.* 74:288-94) к этой гликоформе или удаление фукозы (Shields et al., 2002, *J. Biol. Chem.* 277:26733-40; Shinkawa et al., 2003, *J. Biol. Chem.* 278:6591-604; Niwa et al., 2004, *Cancer Res.* 64:2127-33) из этой гликоформы являются двумя примерами конструирования Fc IgG, которое улучшает связывание между IgG Fc и FcγR, тем самым повышая Ig-опосредованную АЗКЦ-активность. Антитела, содержащие такие замены или сконструированные таким образом, включены в некоторые из предложенных в данном документе вариантов осуществления.

В определенных вариантах осуществления предложены антитела, имеющие углеводную структуру, в которой отсутствует фукоза, присоединенная (прямо или непрямо) к Fc-области. Например, количество фукозы в таком антителе может составлять от 1% до 80%, от 1% до 65%, от 5% до 65% или от 20% до 40%. Количество фукозы определяют, рассчитывая среднее количество фукозы в сахарной цепи Asn297 относительно общего количества гликоструктур, присоединенных к Asn 297 (например, комплексных, гибридных или структур с высоким содержанием маннозы), согласно данным масс-спектрометрии MALDI-TOF, как описано, например, в WO 2008/077546. Asn297 относится к остатку аспарагина, расположенному в позиции 297 в Fc-области (нумерация EU остатков Fc-область); при этом Asn297 также может быть расположен на около ± 3 аминокислот выше или ниже позиции 297, т. е. между позициями 294 и 300,

вследствие незначительных вариаций последовательностей в антителах. Такие варианты по фукозилированию могут иметь улучшенную функцию АЗКЦ. Смотрите, например, патентные публикации США №№ US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Примеры публикаций, относящихся к «дефукозилированным» или «фукозо-дефицитным» вариантам антител, включают: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Примеры линий клеток, способных вырабатывать дефукозилированные антитела, включают клетки Lec13 CHO с дефицитом фукозилирования белка (Ripka et al. Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); патентная заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L; и WO 2004/056312 A1, Adams et al., в особенности пример 11), и линии клеток с нокаутом, например, клетки CHO с нокаутом гена альфа-1,6-фукозилтрансферазы, FUT8 (смотрите, например, Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); и WO2003/085107).

Дополнительно предложены другие антитела, которые содержат разделенные напололам олигосахариды, например, в которых биантеннарный олигосахарид, присоединенный к Fc-области антитела, разделен напололам GlcNAc. Такие антитела могут иметь сниженное фукозилирование и/или улучшенную функцию АЗКЦ. Примеры таких антител описаны, например, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенте США № 6602684 (Umana et al.); и US 2005/0123546 (Umana et al.). Также предложены антитела с по меньшей мере одним остатком галактозы в олигосахариде, присоединенном к Fc-области. Такие варианты антител могут иметь улучшенную функцию КЗЦ. Такие варианты антител описаны, например, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); и WO 1999/22764 (Raju, S.).

4. Варианты антител, сконструированные с цистеином

В некоторых вариантах осуществления предложенный в данном документе вариант антитела содержит замену нативной аминокислоты на остаток цистеина в аминокислотной позиции 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно мутацию S239C (замены константных областей соответствуют индексу EU) в человеческом изоотипе IgG1. Присутствие дополнительного остатка цистеина делает возможным образование межцепочечной дисульфидной связи. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызывать стерические затруднения, тем самым снижая аффинность взаимодействия связывания Fc-область - FcγR. Остатки цистеина, внесенные в Fc-область константной области IgG или вблизи нее, также могут служить сайтами для конъюгации с терапевтическими агентами (например, для сочетания цитотоксических препаратов с использованием тиол-специфических реагентов, таких как малеимидные производные препаратов). Присутствие терапевтического агента вызывает стерические затруднения, тем самым дополнительно снижая аффинность взаимодействия связывания Fc-область -

FcγR. Другие замены в любой из позиций 234, 235, 236 и/или 237 снижают аффинность в отношении Fcγ-рецепторов, в частности FcγRI-рецептора (смотрите, например, US 6624821, US 5624821).

В других сконструированных с цистеином вариантах антител одна или более реактивных тиольных групп помещены в доступных сайтах антитела и могут использоваться для конъюгации антитела с другими фрагментами, такими как лекарственные фрагменты или фрагменты линкер - лекарственный препарат, для создания иммуноконъюгата, как дополнительно описано в данном документе. В некоторых вариантах осуществления любой один или более из следующих остатков можно замещать цистеином: V205 (нумерация Kabat) легкой цепи; A118 (нумерация EU) тяжелой цепи; и 5400 (нумерация EU) Fc-области тяжелой цепи. Создание сконструированных с цистеином антител описано, например, в патенте США № 7521541.

5. Типовые Fc-варианты

Некоторые из предложенных АВР содержат следующие модификации в константной области.

Г. Конкурирующие антигенсвязывающие белки

Предложенные в данном документе антигенсвязывающие белки включают те, которые конкурируют с одним из типовых АВР или фрагментов, описанных выше, за специфическое связывание с ALPP и/или ALPPL2 (например, человеческим ALPP с SEQ ID NO: 2 и/или человеческим ALPPL2 с SEQ ID NO: 4). В некоторых из этих вариантов осуществления исследуемый и эталонный АВР перекрестно конкурируют друг с другом. Такие АВР могут связываться с тем же эпитопом, что и один из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, или с перекрывающимся эпитопом. В одном варианте осуществления такие АВР связываются с эпитопом, имеющим аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 и/или SEQ ID NO: 74. Ожидается, что АВР, включая фрагменты, которые конкурируют с типовыми АВР, будут демонстрировать сходные функциональные свойства (например, один или более видов активности, описанных выше).

В некоторых вариантах осуществления предложенные АВР включают те, которые конкурируют с антителом, имеющим: (a) все 6 CDR, приведенных для того же антитела в SEQ ID NO: 56-58 или 60-62 и 63-65 или 68-70; (b) VH и VL, приведенные для того же антитела в SEQ ID NO: 15 и 30; или (c) легкую цепь или тяжелую цепь, указанные для того же антитела в SEQ ID NO: 40 и 50.

Г. Антигенсвязывающие белки, которые связывают один и тот же эпитоп

В другом варианте осуществления предложенные антигенсвязывающие белки включают те, которые связывают тот же эпитоп, что и любой из АВР, описанных в данном документе. Доступен ряд методик для идентификации АВР, которые связываются с тем же эпитопом, что и один или более АВР, описанных в данном документе. Такие методы включают, например, конкурентные анализы, такие как описанные в данном документе, скрининг пептидных фрагментов, футпринтинг белков на основе МС, подходы

аланинового или глутаминового сканирования и рентгеноструктурный анализ кристаллов комплексов антиген:антигенсвязывающий белок, который обеспечивает атомарное разрешение эпитопа.

Один подход для определения эпитопа или эпитопной области («эпитопная область» представляет собой область, содержащую эпитоп или перекрывающуюся с эпитопом), связываемых конкретным антителом, включает оценку связывания АВР с пептидами, содержащими фрагменты ALPP и/или ALPPL2, например, неденатурированные или денатурированные фрагменты. Можно получать серию перекрывающихся пептидов, охватывающих последовательность ALPP и/или ALPPL2 (например, человеческого ALPP и/или человеческого ALPPL2) и исследовать в отношении связывания, например в прямом анализе ELISA, конкурентном анализе ELISA (в котором пептид оценивают в отношении его способности предотвращать связывание антитела с ALPP и/или ALPPL2, связанным с лункой микротитровального планшета) или на чипе. Такие методы пептидного скрининга могут не быть способны выявлять некоторые прерывистые эпитопы, т. е. функциональные эпитопы, которые включают аминокислотные остатки, не являющиеся непрерывными на протяжении первичной последовательности полипептидной цепи ALPP и/или ALPPL2.

В других вариантах осуществления область(и), содержащую(ие) остатки, которые находятся в контакте с антителом или погружены в него, можно идентифицировать посредством мутации конкретных остатков в ALPP и/или ALPPL2 и определения, может ли АВР связывать мутированный или вариантный белок ALPP и/или ALPPL2. Путем создания ряда индивидуальных мутаций можно идентифицировать остатки, которые играют роль в связывании или которые находятся в достаточной близости к антителу так, что мутация может влиять на связывание между антигенсвязывающим белком и антигеном. Зная эти аминокислотные остатки, можно определить домен(ы) или область(и) антигена, которые содержат остатки, контактирующие с АВР или покрываемые антителом. Такой домен может содержать эпитоп связывания АВР. Общий подход для таких методик исследования включает замену остатками аргинина и/или глутаминовой кислоты (как правило, по отдельности) аминокислоты в полипептиде дикого типа. Эти две аминокислоты, как правило, используют в таких методиках исследования, потому что они заряжены и имеют большой объем и, следовательно, потенциально могут нарушать связывание между АВР и ALPP и/или ALPPL2 в области ALPP и/или ALPPL2, в которую внесена мутация. Остатки аргинина, присутствующие в антигене дикого типа, заменяют глутаминовой кислотой. Получают ряд таких индивидуальных мутантов и анализируют полученные результаты по связыванию для определения, какие из остатков влияют на связывание (смотрите, например, Nanevicz, T., et al., 1995, *J. Biol. Chem.*, 270:37, 21619-21625 и Zupnick, A., et al., 2006, *J. Biol. Chem.*, 281:29, 20464-20473).

Альтернативным подходом для идентификации эпитопа является футпринтинг белков на основе МС, такой как масс-спектрометрия водородно-дейтериевого обмена (ВДО-МС) и быстрое фотохимическое окисление белков (БФОБ). Методы проведения

ВДО-МС описаны, например, в Wei et al. (2014) *Drug Discovery Today* 19:95. Методы проведения БФОБ описаны, например, в Hambley and Gross (2005) *J. American Soc. Mass Spectrometry* 16:2057.

Эпитоп, связываемый АВР, также можно определять структурными методами, такими как рентгеноструктурное определение кристаллической структуры, молекулярное моделирование и спектроскопия ядерного магнитного резонанса (ЯМР), включая ЯМР-определение скорости обмена H-D лабильных амидных атомов водорода в антигене в свободной и связанной в комплекс с АВР форме (смотрите, например, Zinn-Justin et al. (1992) *Biochemistry* 31, 11335-11347; и Zinn-Justin et al. (1993) *Biochemistry* 32, 6884-6891).

Рентгеноструктурный анализ можно проводить, используя любой из известных в данной области техники методов. Примеры методов кристаллизации описаны, например, в Giege et al. (1994) *Acta Crystallogr. D*50:339-350; and McPherson (1990) *Eur. J. Biochem.* 189:1-23). Такие кристаллизационные подходы включают кристаллизацию в микрообъеме (например, Chayen (1997) *Structure* 5:1269-1274), метод висячей капли с диффузией в парах (например, McPherson (1976) *J. Biol. Chem.* 251:6300-6303), метод затравки и диализ. После образования сами кристаллы АВР:антиген можно исследовать, используя хорошо известные методики рентгеновской дифракции, и уточнять, используя компьютерное программное обеспечение, такое как X-PLOR (Yale University, 1992, от Molecular Simulations, Inc.; смотрите, например, Blundell & Johnson (1985) *Meth. Enzymol.* 114 & 115, H. W. Wyckoff et al., eds., Academic Press; патентную публикацию США № 2004/0014194) и BUSTER (Bricogne (1993) *Acta Cryst. D*49:37-60; Bricogne (1997) *Meth. Enzymol.* 276A:361-423, Carter & Sweet, eds.; Roversi et al. (2000) *Acta Cryst. D*56:1313-1323).

В некоторых вариантах осуществления АВР связывает непрерывный эпитоп. В предпочтительном варианте осуществления АВР связывает эпитоп, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 73 и/или SEQ ID NO: 74.

Н. Другие типовые форматы

Антигенсвязывающий белок (например, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент) может представлять собой один полипептид или может содержать два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять (одинаковых или разных) полипептидов. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид, антитело или антигенсвязывающий фрагмент может содержать один антигенсвязывающий домен или два антигенсвязывающих домена. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид и содержит два антигенсвязывающих домена, первый и второй антигенсвязывающие домены могут быть идентичными или отличаться друг от друга (и могут специфически связываться с одним или разными антигенами или эпитопами).

Разные части антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе, можно располагать в различных конфигурациях для получения дополнительных

антигенсвязывающих белков. Например, в некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид, каждый из первого антигенсвязывающего домена и второго антигенсвязывающего домена (при наличии) могут быть независимо выбранными из группы из: домена V_H , домена V_{HN} , домена V_{NAR} и $scFv$. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид, антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут представлять собой $BiTE^{\circledR}$, $(scFv)_2$, нанотело, нанотело-HSA, а DART, TandAb, scDiabody, scDiabody-CH3, scFv-CH-CL-scFv, HSAbody, scDiabody-HAS, тандемный scFv, аднектин, DARPIn, фибронектин и конъюгат DEP. Дополнительные примеры антигенсвязывающих доменов, которые можно использовать, когда антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид, известны в данной области техники.

Домен V_{HN} представляет собой один мономерный переменный домен антитела, который встречается у верблюдов. Домен V_{NAR} представляет собой один мономерный переменный домен антитела, который встречается у хрящевых рыб. Неограничивающие аспекты доменов V_{HN} и доменов V_{NAR} описаны, например, в Cromie et al., *Curr. Top. Med. Chem.* 15:2543-2557, 2016; De Genst et al., *Dev. Comp. Immunol.* 30:187-198, 2006; De Meyer et al., *Trends Biotechnol.* 32:263-270, 2014; Kijanka et al., *Nanomedicine* 10:161-174, 2015; Kovaleva et al., *Expert. Opin. Biol. Ther.* 14:1527-1539, 2014; Krahl et al., *Immunopharmacol. Immunotoxicol.* 38:21-28, 2016; Mujic-Delic et al., *Trends Pharmacol. Sci.* 35:247-255, 2014; Muyldermans, *J. Biotechnol.* 74:277-302, 2001; Muyldermans et al., *Trends Biochem. Sci.* 26:230-235, 2001; Muyldermans, *Ann. Rev. Biochem.* 82:775-797, 2013; Rahbarizadeh et al., *Immunol. Invest.* 40:299-338, 2011; Van Audenhove et al., *EBioMedicine* 8:40-48, 2016; Van Bockstaele et al., *Curr. Opin. Investig. Drugs* 10:1212-1224, 2009; Vincke et al., *Methods Mol. Biol.* 911:15-26, 2012; и Wesolowski et al., *Med. Microbiol. Immunol.* 198:157-174, 2009.

В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид и содержит два антигенсвязывающих домена, как первый антигенсвязывающий домен, так и второй антигенсвязывающий домен могут представлять собой домены V_{HN} или по меньшей мере один антигенсвязывающий домен может представлять собой домен V_{HN} . В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид и содержит два антигенсвязывающих домена, как первый антигенсвязывающий домен, так и второй антигенсвязывающий домен могут представлять собой домены V_{NAR} или по меньшей мере один антигенсвязывающий домен представляет собой домен V_{NAR} . В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид, первый антигенсвязывающий домен представляет собой домен $scFv$. В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой один полипептид и содержит два антигенсвязывающих домена, как первый антигенсвязывающий домен, так и второй антигенсвязывающий домен могут

представлять собой домены scFv или по меньшей мере один антигенсвязывающий домен может представлять собой домен scFv.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент могут содержать два или более полипептидов (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидов). В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит два или более полипептидов, два, три, четыре, пять или шесть полипептидов из двух или более полипептидов могут быть идентичными.

В некоторых вариантах осуществления, в которых антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит два или более полипептидов (например, два, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять полипептидов), два или более полипептидов антитела или антигенсвязывающего фрагмента могут подвергаться сборке (например, нековалентной сборке) с образованием одного или более антигенсвязывающих доменов, например, антигенсвязывающего фрагмента антитела (например, любого из антигенсвязывающих белков антитела, описанного в данном документе), VHH-scAb, VHH-Fab, Dual scFab, F(ab')₂, диатела, crossMab, DAF (два в одном), DAF (четыре в одном), DutaMab, DT-IgG, общей легкой цепи с выступами и впадинами, конфигурации с выступами и впадинами, заряженной пары, обмена Fab-плечами, SEEDbody, LUZ-Y, Fcab, κλ-body, ортогонального Fab, DVD-IgG, IgG(H)-scFv, scFv-(H)IgG, IgG(L)-scFv, scFv-(L)IgG, IgG(L, H)-Fv, IgG(H)-V, V(H)-IgG, IgG(L)-V, V(L)-IgG, KiH IgG-scFab, 2scFv-IgG, IgG-2scFv, scFv4-Ig, зитела, DVI-IgG, диатела-CH3, тройного тела, миниантитела, минитела, минитела TriBi, scFv-CH3 KiH, Fab-scFv, F(ab')₂-scFv₂, scFv-KiH, Fab-scFv-Fc, четырехвалентного HCAb, scDiabody-Fc, Diabody-Fc, тандемного scFv-Fc, VHH-Fc, тандемного VHH-Fc, VHH-Fc KiH, Fab-VHH-Fc, интратела, системы «стыковки и фиксации», ImmTAC, конъюгата IgG-IgG, Cov-X-Body, scFv1-PEG-scFv2, аднектина, DARPin, фибронектина и конъюгата DEP. Смотрите, например, Spiess et al., *Mol. Immunol.* 67:95-106, 2015, в полном объеме включенную в данный документ в отношении описания этих элементов.

В некоторых вариантах осуществления в основе антигенсвязывающего белка лежит отличный от иммуноглобулина остов. Примеры других остовов, в которые можно вставлять или прививать связывающие домены (например, HVR или CDR), такие как описанные в данном документе, включают, но не ограничиваются этим, фибронектин человека (например, 10-ый внеклеточный домен фибронектина человека III), неокарциностагин CBM4-2, антикалины, полученные из липокалинов, сконструированные домены анкириновых повторов (DARPin), домен протеина-A (протеин Z), домены Кунитца, Im9, белки TPR, цинк-пальцевые домены, pVIII, GC4, трансферрин, B-домен SPA, Sac7d, A-домен, домен SH3 Fyn-киназы и лектин-подобные домены C-типа (смотрите, например, Gebauer and Skerra (2009) *Curr. Opin. Opin. Chem. Biol.*, 13:245-255; Binz et al. (2005) *Nat. Biotech.* 23:1257-1268; и Yu et al. (2017) *Annu Rev Anal Chem* 10:293-320, которые все в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки).

IV. Экспрессия и выработка антигенсвязывающего белка

A. Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антигенсвязывающие белки

Также предложены молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют описанные в данном документе антигенсвязывающие белки или их части. Такие нуклеиновые кислоты включают, например: 1) те, которые кодируют антигенсвязывающий белок (например, антитело или его фрагмент) или его производное или вариант; 2) полинуклеотиды, кодирующие тяжелую и/или легкую цепь, домены VH и/или VL или 1 или более HVR или CDR, расположенных в вариабельном домене (например, 1, 2 или все 3 из HVR или CDR VH или 1, 2 или все 3 из HVR или CDR VL); 3) полинуклеотиды, достаточные для применения в качестве гибридизационных зондов, ПЦР-праймеров или праймеров секвенирования, для идентификации, анализа, мутации или амплификации таких кодирующих полинуклеотидов; 4) антисмысловые нуклеиновые кислоты для ингибирования экспрессии таких кодирующих полинуклеотидов и 5) комплементарные последовательности вышеуказанного. Нуклеиновые кислоты могут иметь любую длину. Их длина может составлять, например, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 750 или 1000 или более нуклеотидов, и/или они могут составлять одну или более дополнительных последовательностей, например регуляторных последовательностей, и/или быть частью более крупной нуклеиновой кислоты, например, вектора. Нуклеиновые кислоты могут быть одноцепочечными или двухцепочечными.

Молекулы нуклеиновых кислот могут присутствовать в целых клетках, в клеточном лизате или находиться в частично очищенной или по существу очищенной форме. Нуклеиновая кислота является «выделенной» или «по существу очищенной», когда она очищена от клеточных компонентов или других примесей, например других клеточных нуклеиновых кислот (например, другой хромосомной ДНК, например, хромосомной ДНК, которая связана с выделенной ДНК в природе) или белков, стандартными методами, включая обработку щелочью/ДСН, расслоение с CsCl, колоночную хроматографию, рестрикционные ферменты, электрофорез в агарозном геле и другие методы, хорошо известные в данной области техники. Смотрите F. Ausubel, et al., ed. (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York. Описанная в данном документе нуклеиновая кислота может представлять собой, например, ДНК или РНК и может содержать интронные последовательности или нет. В определенных вариантах осуществления нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность VH антитела, предложенного в данном документе, содержит SEQ ID NO: 71. В другом варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует последовательность VL антитела, предложенного в данном документе, содержит SEQ ID NO: 72. В дополнительных вариантах осуществления молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют последовательности VH и VL антител,

предложенных в данном документе, содержат SEQ ID NO: 71 и SEQ ID NO: 72, соответственно.

Таким образом, предложены молекулы нуклеиновых кислот, содержащие полинуклеотиды, которые кодируют одну или более цепей АВР, такого как антитела к ALPP/ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, который кодирует тяжелую цепь или легкую цепь АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2). В некоторых вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит как полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь, так и полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2). В некоторых вариантах осуществления первая молекула нуклеиновой кислоты содержит первую полинуклеотидную последовательность, которая кодирует тяжелую цепь, а вторая молекула нуклеиновой кислоты содержит вторую полинуклеотидную последовательность, которая кодирует легкую цепь.

В одном варианте осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий VH одного из антител, предложенных в данном документе. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота содержит полинуклеотид, кодирующий VL одного из антител, предложенных в данном документе. В другом варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует как VH, так и VL одного из антител, предложенных в данном документе. В определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 или SEQ ID NO: 30.

В конкретном варианте осуществления нуклеиновая кислота кодирует вариант одной или более из вышеприведенных аминокислотных последовательностей (например, аминокислотные последовательности тяжелой цепи и/или легкой цепи, или аминокислотные последовательности VH и/или VL, описанные в данном документе), при этом вариант имеет не более 25 аминокислотных модификаций, например не более 20, например не более 15, 14, 13, 12 или 11 аминокислотных модификаций, например 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотную модификацию, такую как делеции или вставки, предпочтительно замены, такие как консервативные замены.

Также предложены молекулы нуклеиновых кислот, которые имеют по меньшей мере 80%, 85%, 90% (например, 95%, 96%, 97%, 98% или 99%) идентичности последовательности с любой из вышеприведенных последовательностей. Таким образом, например, в определенных вариантах осуществления молекула нуклеиновой кислоты содержит нуклеотидную последовательность, которая кодирует последовательность тяжелой и/или легкой цепи или последовательность VH и/или VL одного из антигенсвязывающих белков, описанных в данном документе.

После получения нуклеиновой кислоты, кодирующей сегменты VH и VL, эти нуклеиновые кислоты можно дополнительно обрабатывать стандартными методами рекомбинантных ДНК, например, для преобразования генов переменных областей в

гены полноразмерных цепей антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv. При такой обработке кодирующую VL или VH нуклеиновую кислоту функционально связывают с другой нуклеиновой кислотой, кодирующей другой полипептид, такой как константная область антитела или гибкий линкер.

Выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую область VH, можно преобразовать в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания кодирующей VH нуклеиновой кислоты с другой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей константные области тяжелой цепи (шарнирную область, CH1, CH2 и/или CH3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи человека известны в данной области техники (смотрите, например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), а фрагменты нуклеиновых кислот, охватывающие эти области, можно получать посредством стандартной ПЦР-амплификации. Константная область тяжелой цепи может быть константной областью IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD, например, областью IgG1. В случае гена тяжелой цепи Fab-фрагмента нуклеиновая кислота, кодирующая VH, может быть функционально связана с другой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей только константную область CH1 тяжелой цепи.

Выделенную молекулу нуклеиновой кислоты, кодирующая область VL, можно преобразовать в ген полноразмерной легкой цепи (а также ген легкой цепи Fab) путем оперативного связывания молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующей VL, с другой молекулой нуклеиновой кислоты, кодирующей константную область CL легкой цепи. Последовательности генов константной области легкой цепи человека известны в данной области техники (смотрите, например, Kabat, E. A., et al. (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242), а фрагменты нуклеиновых кислот, охватывающие эти области, можно получать посредством стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную область каппа или лямбда.

Для создания гена scFv фрагменты нуклеиновой кислоты, кодирующие VH и VL, функционально связывают с другим фрагментом, кодирующим гибкий линкер, например, кодирующим аминокислотную последовательность $(\text{Gly}_4\text{-Ser})_3$, чтобы последовательности VH и VL можно было экспрессировать в виде непрерывного одноцепочечного белка с областями VL и VH, соединенными гибким линкером (смотрите, например, Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426; Huston et al. (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883; McCafferty et al., (1990) *Nature* 348:552-554).

В другом аспекте также предложены молекулы нуклеиновых кислот, которые пригодны для использования в качестве праймеров или гибридизационных зондов для выявления последовательностей нуклеиновых кислот. Молекула нуклеиновой кислоты может содержать только часть последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей полноразмерный полипептид, например, такой фрагмент можно использовать как зонд

или праймер или фрагмент, кодирующий активную часть (например, ALPP- и/или ALPPL2-связывающую часть) полипептида.

Зонды на основе последовательности нуклеиновой кислоты можно использовать для выявления нуклеиновой кислоты или сходных нуклеиновых кислот, например, транскриптов, кодирующих полипептид. Зонд может содержать метящую группу, например, радиоактивный изотоп, флуоресцентное соединение, фермент или кофактор фермента. Такие зонды можно использовать для определения клетки, которая экспрессирует полипептид.

Также предложены векторы, включая экспрессионные векторы, содержащие одну или более нуклеиновых кислот, кодирующих один или более компонентов АВР (например, VH и/или VL; и легкие цепи и/или тяжелые цепи). Экспрессионный вектор может включать, но не ограничивается этим, последовательности, которые влияют на транскрипцию, трансляцию или регулируют их, и, если присутствуют интроны, влияют на сплайсинг РНК связанной с ними кодирующей области. Последовательности нуклеиновых кислот, необходимые для экспрессии в прокариотах, включают промотор, необязательно, последовательность оператора, сайт связывания рибосомы и, возможно, другие последовательности. Эукариотические клетки, как известно, используют промоторы, энхансеры и сигналы терминации и полиаденилирования.

Экспрессионный вектор также может содержать секреторную последовательность сигнального пептида, которая функционально связана с представляющей интерес кодирующей последовательностью, так, чтобы экспрессируемый полипептид мог секретироваться рекомбинантной клеткой-хозяином, для упрощения, при необходимости, выделения представляющего интерес полипептида из клетки.

Экспрессионные и клонирующие векторы по изобретению, как правило, содержат промотор, распознаваемый организмом-хозяином и функционально связанный с молекулой, кодирующей полипептид. Большое количество промоторов, распознаваемых рядом потенциальных клеток-хозяев, хорошо известны. Подходящий промотор функционально связан с ДНК, кодирующей, например, тяжелую цепь, легкую цепь или другой компонент антител и антигенсвязывающих фрагментов по изобретению, посредством удаления промотора из источника ДНК путем расщепления рестрикционным ферментом и вставки в вектор необходимой последовательности промотора. Подходящие промоторы для применения с дрожжевыми клетками-хозяевами также хорошо известны в данной области техники. Дрожжевые энхансеры предпочтительно используют с дрожжевыми промоторами. Подходящие промоторы для применения с клетками-хозяевами млекопитающих хорошо известны и включают, но не ограничиваются этим, полученные из геномов вирусов, таких как вирус полиомы, вирус оспы кур, аденовирус (такой как серотипы аденовируса 2, 8 или 9), вирус папилломы крупного рогатого скота, вирус саркомы птиц, цитомегаловирус, ретровирусы, вирус гепатита В и вирус обезьян 40 (SV40). Другие подходящие промоторы млекопитающих включают гетерологичные промоторы млекопитающих, например, промоторы белка теплового шока и промотор

актина.

Дополнительные конкретные промоторы, которые можно использовать, включают, но не ограничиваются этим: ранний промотор SV40 (Benoist and Chambon, 1981, *Nature* 290:304-310); промотор CMV (Thornsen et al., 1984, *Proc. Natl. Acad. U.S.A.* 81:659-663); промотор, содержащийся в 3' длинном концевом повторе вируса саркомы Рауса (Yamamoto et al., 1980, *Cell* 22:787-797); промотор тимидинкиназы вируса герпеса (Wagner et al., 1981, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78: 1444-1445); промотор и регуляторные последовательности из гена металлотинина (Prinster et al., 1982, *Nature* 296:39-42); и прокариотические промоторы, такие как промотор бета-лактамазы (Villa-Kamaroff et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75:3727-3731); или промотор tac (DeBoer et al., 1983, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80:21-25).

В определенных вариантах осуществления нуклеиновые кислоты, кодирующие разные компоненты АВР, можно вставлять в один экспрессионный вектор. Например, нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь или переменную область антитела к ALPP/ALPPL2, можно клонировать в тот же вектор, что и нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь или переменную область антитела к ALPP/ALPPL2. В таких вариантах осуществления две нуклеиновые кислоты могут быть разделены сайтом внутренней посадки рибосомы (IRES) и находиться под управлением одного промотора так, чтобы легкая цепь и тяжелая цепь экспрессировались из одного мРНК-транскрипта. В альтернативном варианте две нуклеиновые кислоты могут находиться под управлением двух отдельных промоторов так, чтобы легкая цепь и тяжелая цепь экспрессировались из двух отдельных мРНК-транскриптов. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь или переменную область антитела к ALPP/ALPPL2, клонируют в один экспрессионный вектор, а нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь или переменную область антитела к ALPP/ALPPL2, клонируют во второй экспрессионный вектор. В таких вариантах осуществления клетку-хозяина можно котрансфицировать обоими экспрессионными векторами для выработки полных антител или антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

В. Клетки-хозяева

После того как вектор был сконструирован, а одна или более молекул нуклеиновых кислот, кодирующих компоненты АВР, описанного в данном документе, были вставлены в надлежащий(е) сайт(ы) вектора или векторов, готовый(е) вектор(ы) можно вносить в подходящую клетку-хозяина для амплификации и/или экспрессии полипептида.

Таким образом, в другом аспекте предложены клетки-хозяева, содержащие молекулы нуклеиновых кислот или векторы, такие как описаны в данном документе. В различных вариантах осуществления тяжелые цепи и/или легкие цепи АВР можно экспрессировать в прокариотических клетках, таких как бактериальные клетки, или в эукариотических клетках, таких как клетки грибов (таких как дрожжи), клетки растений, клетки насекомых и клетки млекопитающих. Выбор подходящей клетки-хозяина зависит от различных факторов, таких как необходимые уровни экспрессии, модификации

полипептидов, которые являются желательными или необходимыми для активности (такой как гликозилирование или фосфорилирование) и простоты сворачивания в биологически активную молекулу.

Внесение одной или более нуклеиновых кислот в необходимую клетку-хозяина можно осуществлять любым способом, включая, но не ограничиваясь этим, трансфекцию с фосфатом кальция, опосредованную ДЭАЭ-декстраном трансфекцию, опосредованную катионными липидами трансфекцию, электропорацию, трансдукцию, инфекцию и т. д. Неограничивающие типовые способы описаны, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Нуклеиновые кислоты можно временно или стабильно трансфицировать в необходимые клетки-хозяев в соответствии с любым подходящим способом.

Типовые прокариотические клетки-хозяева включают эубактерии, такие как грамтрицательные или грамположительные организмы, например, Enterobacteriaceae, такие как *Escherichia*, например, *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, например, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, например, *Serratia marcescans* и *Shigella*, а также *Bacillus*, такие как *B. subtilis* и *B. licheniformis*, *Pseudomonas* и *Streptomyces*.

Дрожжи также можно использовать в качестве клеток-хозяев, включая, но не ограничиваясь этим, *S. cerevisiae*, *S. pombe* или *K. lactis*.

В качестве хозяев можно использовать ряд линий клеток млекопитающих, которые включают, но не ограничиваются этим, иммортализованные линии клеток, доступные от Американской коллекции типовых культур (АТСС), включая, но не ограничиваясь этим, клетки яичника китайского хомяка (СНО), включая клетки СНОК1 (АТСС CCL61), DXB-11, DG-44 и клетки яичника китайского хомяка/-DHFR (СНО, Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216, 1980); линию клеток почки обезьяны CV1, трансформированную SV40 (COS-7, АТСС CRL 1651); линию клеток почки эмбриона человека (293 или клетки 293, субклонированные для роста в суспензионной культуре (Graham et al., *J. Gen Virol.* 36: 59, 1977); клетки почки новорожденного хомяка (ВНК, АТСС CCL 10); клетки Сертоли мышей (ТМ4, Mather, *Biol. Reprod.* 23: 243-251, 1980); клетки почки обезьяны (CV1 АТСС CCL 70); клетки почки африканской зеленой марышки (VERO-76, АТСС CRL-1587); клетки карциномы шейки матки человека (HELA, АТСС CCL 2); клетки почки собаки (MDCK, АТСС CCL 34); клетки печени серой крысы (BRL 3A, АТСС CRL 1442); клетки легкого человека (W138, АТСС CCL 75); клетки гепатомы человека (Hep G2, HB 8065); клетки опухоли молочной железы мыши (ММТ 060562, АТСС CCL51); клетки ТМ (Mather et al., *Annals N.Y Acad. Sci.* 383: 44-68, 1982); клетки MRC 5 или клетки FS4; клетки миеломы млекопитающих и ряд других линий клеток.

После подготовки подходящей клетки-хозяина ее можно использовать для экспрессии необходимого АВР. Таким образом, в дополнительном аспекте также предложены способы получения описанного в данном документе АВР. В общем случае такие способы включают культивирование клетки-хозяина, содержащей один или более

экспрессионных векторов, описанных в данном документе, в культуральной среде в условиях, допускающих экспрессию АВР, кодируемого одним или более экспрессионными векторами; и выделение АВР из культуральной среды.

В некоторых вариантах осуществления АВР получают в бесклеточной системе. Неограничивающие примеры бесклеточных систем описаны, например, в Sitaraman et al., *Methods Mol. Biol.* 498: 229-44 (2009); Spirin, *Trends Biotechnol.* 22: 538-45 (2004); Endo et al., *Biotechnol. Adv.* 21: 695-713 (2003).

V. Конъюгаты антигенсвязывающего белка

АВР, предложенные в данном документе, можно конъюгировать с цитотоксическими или цитостатическими фрагментами (включая их фармацевтически совместимые соли) для образования конъюгата, такого как конъюгат антитело-лекарственный препарат (ADC). В особенности подходящими фрагментами для конъюгации с АВР (например, антителами) являются цитотоксические агенты (например, химиотерапевтические агенты), конвертирующие пролекарства ферменты, радиоактивные изотопы или соединения или токсины (эти фрагменты вместе называются терапевтическим агентом). Например, АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2) можно конъюгировать с цитотоксическим агентом, таким как химиотерапевтический агент, или токсином (например, цитостатическим или цитоцидальным агентом, таким как, например, абрин, ризин А, токсин синегнойной палочки или дифтерийный токсин). Примеры применимых классов цитотоксических агентов включают, например, агенты, связывающие малую бороздку ДНК, ДНК-алкилирующие агенты и ингибиторы тубулина. Типовые цитостатические агенты включают, например, ауристатины, камптотецины, калихеамицины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды (например, DM1, DM2, DM3, DM4), таксаны, бензодиазепины (например, пирроло[1,4]бензодиазепины, индолинобензодиазепины и оксазолидинобензодиазепины) и алкалоиды барвинка.

В одном варианте осуществления АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2) конъюгировано к конвертирующему пролекарство ферменту. Конвертирующий пролекарство фермент можно рекомбинантно сливать с антителом или конъюгировать к нему химически, используя известные способы. Типовыми конвертирующими пролекарство ферментами являются карбоксипептидаза G2, бета-глюкуронидаза, пенициллин-V-амидаза, пенициллин-G-амидаза, β -лактамаза, β -глюкозидаза, нитроредуктаза и карбоксипептидаза А.

Методики конъюгации терапевтических агентов с белками и, в частности, с антителами, хорошо известны. (Смотрите, например, Alley et al., *Current Opinion in Chemical Biology* 2010 14:1-9; Senter, *Cancer J.*, 2008, 14(3):154-169). Терапевтический агент можно конъюгировать способом, который снижает его активность до тех пор, пока он не будет отщеплен от антитела (например, посредством гидролиза, протеолитического расщепления или с помощью расщепляющего агента). В некоторых аспектах терапевтический агент присоединен к антителу с помощью расщепляемого линкера, который чувствителен к расщеплению во внутриклеточном окружении ALPP-

экспрессирующей раковой клетки, но практически не чувствителен к внеклеточному окружению, так что конъюгат отщепляется от антитела, когда он интернализуется ALPP-экспрессирующей раковой клеткой (например, в эндосомальном окружении или, например, за счет чувствительности к рН или чувствительности к протеазам, в лизосомальном окружении, или в кавеолярном окружении). В некоторых аспектах терапевтический агент также может быть присоединен к антителу с помощью нерасщепляемого линкера.

Как правило, ADC содержит линкерную область между терапевтическим агентом и анти-АВР (например, антителом к ALPP/ALPPL2). Линкер в общем случае является расщепляемым во внутриклеточных условиях так, что расщепление линкера приводит к высвобождению терапевтического агента из антитела во внутриклеточное окружение (например, в лизосоме, эндосоме или кавеоле). Линкер может представлять собой, например, пептидильный линкер, который расщепляется внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Расщепляющие агенты могут включать катепсины В и D и плазмин (смотрите, например, Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999). Наиболее типичными являются пептидильные линкеры, которые расщепляются ферментами, присутствующими в ALPP-экспрессирующих клетках. Например, можно использовать пептидильный линкер, который расщепляется тиол-зависимой протеазой катепсином В, которая на высоком уровне экспрессируется в раковой ткани (например, линкер, содержащий пептид Phe-Leu или Val-Cit).

Расщепляемый линкер может быть рН-чувствительным, т. е. чувствительным к гидролизу при определенных значениях рН. Как правило, рН-чувствительный линкер подвержен гидролизу в кислотных условиях. Например, можно использовать кислото-лабильный линкер, гидролизуемый в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь и т. п. (смотрите, например, патенты США №№ 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, Pharm. Therapeutics 83:67-123, 1999; Neville et al., Biol. Chem. 264:14653-14661, 1989)). Такие линкеры относительно стабильны в нейтральных условиях рН, таких как в крови, но нестабильны при рН ниже 5,5 или 5,0, приблизительноном рН лизосомы.

Другие линкеры расщепляются в восстановительных условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают те, которые могут быть образованы с SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)пропионат), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилтио)бутират) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуол), SPDB и SMPT. (Смотрите, например, Thorpe et al., Cancer Res. 47:5924-5931, 1987; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C. W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Также смотрите патент США № 4880935.)

Линкер также может представлять собой малонатный линкер (Johnson et al., Anticancer Res. 15:1387-93, 1995), малеимидобензоильный линкер (Lau et al., Bioorg-Med-

Chem. 3:1299-1304, 1995) или 3'-N-амидный аналог (Lau et al., Bioorg-Med-Chem. 3:1305-12, 1995).

В других вариантах осуществления линкер представляет собой нерасщепляемый линкер, такой как малеимидо-алкилен- или малеимид-арильный линкер, который напрямую присоединен к терапевтическому агенту и высвобождается за счет протеолитического разрушения антитела.

Как правило, линкер практически не чувствителен к внеклеточному окружению, что означает, что не более чем около 20%, как правило, не более чем около 15%, чаще не более чем около 10% и даже чаще не более чем около 5%, не более чем около 3% или не более чем около 1% линкеров в образце ADC расщепляется, когда ADC находится во внеклеточном окружении (например, в плазме). То, является ли линкер практически не чувствительным к внеклеточному окружению, можно определить, например, путем независимой инкубации с плазмой (а) ADC («образца ADC») и (b) эквивалентного молярного количества неконъюгированного антитела или терапевтического агента («контрольный образец») в течение предопределенного периода времени (например, 2, 4, 8, 16 или 24 часов), а затем сравнения количества неконъюгированного антитела или терапевтического агента, присутствующего в образце ADC, с количеством, присутствующим в контрольном образце, по данным измерения, например, методом высокоэффективной жидкостной хроматографии.

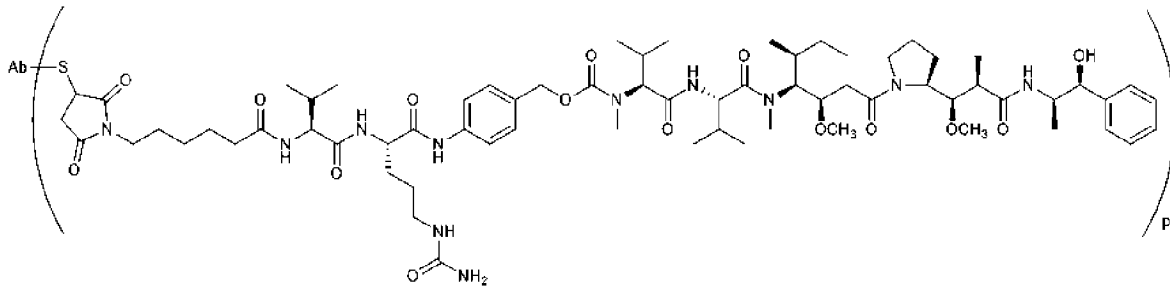
Линкер также может способствовать клеточной интернализации. Линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгации с терапевтическим агентом (т. е. в окружении фрагмента линкер - терапевтический агент ADC или производного ADC, как описано в данном документе). В альтернативном варианте линкер может способствовать клеточной интернализации при конъюгации как с терапевтическим агентом, так и с антигенсвязывающим белком (например, антителом к ALPP/ALPPL2) (т. е. в окружении ADC, как описано в данном документе).

Типовые конъюгаты антитело-лекарственный препарат включают конъюгаты антитело-лекарственный препарат на основе ауристатины, что означает, что лекарственным компонентом является препарат ауристин. Ауристины связывают тубулин, и было показано, что они препятствуют динамике микротрубочек и ядерному и клеточному делению и обладают противораковой активностью. Как правило, конъюгат антитело-лекарственный препарат на основе ауристатины содержит линкер между препаратом ауристином и АВР (например, антителом к ALPP/ALPPL2). Линкер может представлять собой, например, расщепляемый линкер (например, пептидильный линкер) или нерасщепляемый линкер (например, линкер, высвобождаемый за счет разрушения антитела). Ауристин может представлять собой ауристин E или его производное. Ауристин может представлять собой, например, сложный эфир, образуемый между ауристином E и кето-кислотой. Например, ауристин E можно приводить в реакцию с парацетилбензойной кислотой или бензоилвалерьяновой кислотой с получением АЕВ и АЕVB, соответственно. Другие типичные ауристины включают MMAF и MMAE.

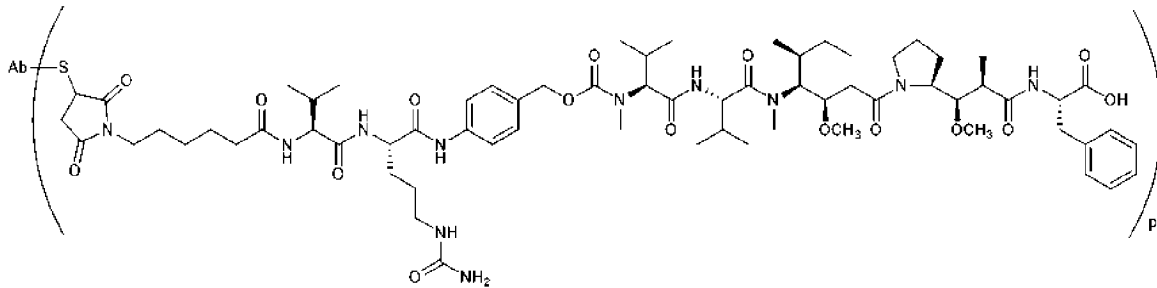
Синтез и структура типовых ауристатинов описаны в публикациях США №№ 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждая из которых в полном объеме и во всех целях включена в данный документ посредством ссылки.

Типовые конъюгаты антитело-лекарственный препарат на основе ауристатина включают mc-vc-PABC-MMAE (также называемый в данном документе vcMMAE, или 1006), mc-vc-PABC-MMAF, mc-MMAF и mp-dLAE-PABC-MMAE (также называемый в данном документе dLAE-MMAE, или mp-dLAE-MMAE, или 7092), конъюгаты антитело-лекарственный препарат, приведенные ниже, где Ab представляет собой АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2, описанное в данном документе) и val-cit (vc) представляет дипептид валин-цитруллин, а dLAE представляет трипептид

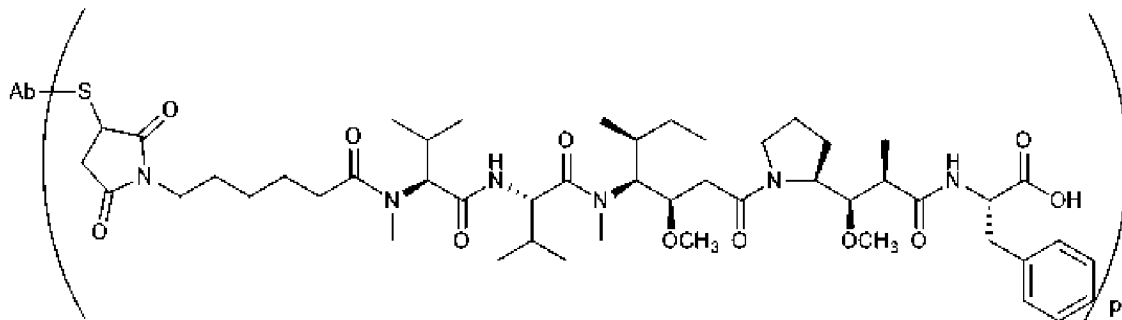
D-лейцин-аланин-глутаминовая кислота:



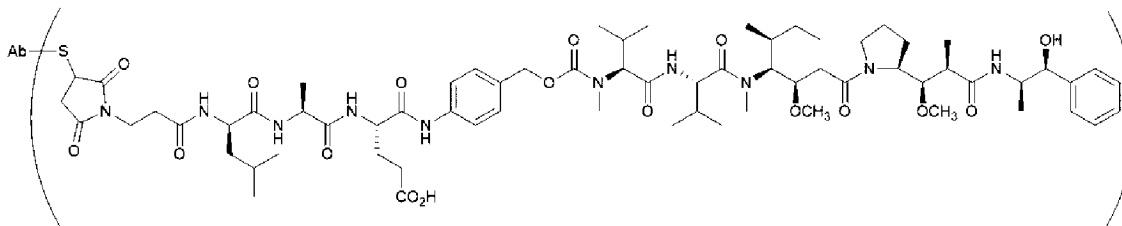
mc-vc-PABC-MMAE



mc-vc-PABC-MMAF



mc-MMAF



mp-dLAE-PABC-MMAE

или их фармацевтически приемлемую соль. Лекарственная нагрузка представлена r , числом молекул лекарственный препарат - линкер на антитело. В зависимости от контекста r может представлять среднее число молекул лекарственный препарат - линкер на антитело в композиции антител, что также называется средней лекарственной нагрузкой. r находится в диапазоне от 1 до 20 и предпочтительно составляет от 1 до 12 или от 1 до 8. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления, когда r представляет среднюю лекарственную нагрузку, r находится в диапазоне от около 2 до около 5. В некоторых вариантах осуществления r составляет около 2, около 3, около 4 или около 5. Среднее число лекарственных фрагментов на антитело можно определить традиционными способами, такими как масс-спектрометрия, ХГВ, анализ ELISA и ВЭЖХ. В некоторых аспектах АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2) присоединен к фрагменту лекарственный препарат - линкер посредством остатка цистеина антитела. В некоторых вариантах осуществления остаток цистеина является сконструированным в антителе. В других аспектах остаток цистеина представляет собой остаток цистеина межцепочечного дисульфида.

VI. Терапевтические применения

A. Способы лечения заболеваний

В другом аспекте предложены способы лечения расстройств, связанных с клетками, которые экспрессируют ALPP и/или ALPPL2, например, раков. Клетки могут экспрессировать или нет повышенные уровни ALPP и/или ALPPL2 по сравнению с клетками, которые не связаны с представляющим интерес расстройством. Таким образом, определенные варианты осуществления включают применение описанных в данном документе АВР (например, антител к ALPP/ALPPL2), как в виде оголенного антитела, так и конъюгата (например, конъюгата антитело-лекарственный препарат), для лечения субъекта, например, субъекта, имеющего рак. В некоторых из этих вариантов осуществления способ включает введение эффективного количества АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2) или ADC (например, анти-ALPP/ALPPL2 ADC), или композиции, содержащей такой АВР или конъюгат, нуждающемуся в этом субъекту. В определенных типовых вариантах осуществления способ включает лечение рака в клетке, ткани, органе, у животного или пациента. Чаще всего способ лечения включает лечение рака у человека. В некоторых вариантах осуществления лечение включает монотерапию. В других способах антигенсвязывающий белок вводят как часть комбинированной терапии с одним или более другими терапевтическими агентами, хирургическим вмешательством и/или лучевой терапией.

Положительные терапевтические эффекты при раке можно определять рядом способов (смотрите, например, W. A. Weber, J. Null. *Med.* 50:1S-10S (2009); and Eisenhauer et al., *Eur. J Cancer* 45:228-247 (2009)). В некоторых вариантах осуществления ответ на лечение АВР или конъюгатом оценивают, используя критерии RECIST 1.1. В некоторых вариантах осуществления лечение, обеспечиваемое терапевтически эффективным количеством, представляет собой любое из ингибирования дальнейшего роста опухоли,

индукции регрессии опухоли, частичного ответа (ЧО), полного ответа (ПО), выживаемости без прогрессирования (ВБП), выживаемости без заболевания (ВБЗ), объективного ответа (ОО) или общей выживаемости (ОВ). В некоторых вариантах осуществления лечение замедляет или предотвращает начало метастазирования. Прогресс лечения можно отслеживать, используя различные способы. Например, ингибирование может приводить к уменьшению размера опухоли и/или снижению метаболической активности в опухоли. Оба этих параметра можно измерять, например, с помощью МРТ или ПЭТ сканирования. Ингибирование также можно отслеживать по биопсии, чтобы определить уровень некроза, гибели опухолевых клеток и уровень васкуляризации в опухоли. Схема применения терапии, описанной в данном документе, которая является эффективной для лечения ракового пациента, может варьироваться в соответствии с такими факторами, как состояние заболевания, возраст и масса пациента, а также способность терапии вызывать противораковый ответ у субъекта. Хотя вариант осуществления способа лечения, лекарственных средств и применений по настоящему изобретению может не быть эффективными для обеспечения положительного терапевтического эффекта у каждого субъекта, он будет таким в случае статистически значимого количества субъектов согласно определению с помощью любого известного в данной области техники статистического критерия, такого как t-критерий Стьюдента, хи-2-критерий, U-критерий в соответствии с Манном и Уитни, критерий Краскела - Уоллиса (H-критерий), критерий Джонкхиера - Терпстра и критерий Уилкоксона.

В контексте данного документа «Критерии ответа RECIST 1.1» означают определения, приведенные в Eisenhauer et al., Eur. J Cancer 45:228-247 (2009) для целевых поражений или нецелевых поражений, в зависимости от ситуации, на основании контекста, в котором проводят определение ответа.

Эффективное количество АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2) или ADC можно вводить за одно или более введений, применений или в одной или более дозировках, что не подразумевает ограничения конкретным составом или путем введения. В общем случае терапевтически эффективное количество активного компонента находится в диапазоне от 0,1 мг/кг до 100 мг/кг, например, от 1 мг/кг до 100 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг.

Типовые дозировки для АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2) составляют, например, от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента, чаще от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг, от 1 мг/кг до 10 мг/кг¹, от 2 мг/кг до 30 мг/кг, от 2 мг/кг до 20 мг/кг, от 2 мг/кг до 15 мг/кг, от 2 мг/кг до 12 мг/кг, от 2 мг/кг до 10 мг/кг, от 3 мг/кг до 30 мг/кг, от 3 мг/кг до 20 мг/кг, от 3 мг/кг до 15 мг/кг, от 3 мг/кг до 12 мг/кг или от 3 мг/кг до 10 мг/кг.

Типовые дозировки для АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2) составляют, например, от 0,01 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,1 мг/кг до 10 мг/кг, от 0,3 мг/кг до 3 мг/кг, от 0,5 мг/кг до 3 мг/кг, от 1 мг/кг до 7,5 мг/кг, от 2 мг/кг до 7,5 мг/кг или от 3 мг/кг до 7,5 мг/кг массы тела субъекта, или 0,1-20 или 0,5-5 мг/кг массы тела (например, 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7,

8, 9 или 10 мг/кг), или 10-1500 или 200-1500 мг в качестве фиксированной дозировки. В некоторых способах пациенту вводят дозу, составляющую по меньшей мере 1,5 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг или по меньшей мере 3 мг/кг, один раз в три недели или чаще.

Вводимая дозировка может варьироваться в зависимости от известных факторов, таких как фармакодинамические характеристики конкретного агента, а также режим и путь его введения; возраст, состояние здоровья и масса реципиента; тип и степень заболевания или показания, подлежащего лечению, природа и степень симптомов, тип одновременного лечения, частота лечения и необходимый эффект. Начальную дозировку можно повышать выше верхнего уровня с целью быстрого достижения необходимого уровня в крови или уровня в ткани. В альтернативном варианте, начальная дозировка может быть меньше оптимальной, а суточную дозировку можно постепенно повышать во время курса лечения.

Частота введения зависит от времени полужизни АВР или АСВ в циркуляции, состояния пациента и пути введения, помимо прочих факторов. Частота может составлять, например, раз в день, раз в неделю, раз в месяц, раз в квартал или с нерегулярными интервалами в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование рака, подлежащего лечению. Типовая частота для внутривенного введения составляет от двух раз в неделю до одного раза в квартал в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. Другие типовые частоты для внутривенного введения составляют раз в неделю, через неделю, три раза в четыре недели или каждые три недели в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. В случае подкожного введения типовая частота введения составляет от раза в день до раза в месяц, хотя также возможно более или менее частое введение.

Число вводимых доз зависит от природы рака (например, как характеризующегося острыми или хроническими симптомами) и ответа расстройства на лечение. В некоторых аспектах для острых расстройств или острого ухудшения хронических расстройств часто достаточно от 1 до 10 доз. Иногда одной болюсной дозы, необязательно в разделенной форме, достаточно для острого расстройства или острого ухудшения хронического расстройства. Лечение можно повторять в случае рецидива острого расстройства или острого ухудшения. В случае хронических расстройств антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, раз в неделю, раз в две недели, раз в месяц, раз в квартал, раз в шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет жизни пациента.

Типовые виды рака, подходящие для лечения антигенсвязывающими белками, предложенными в данном документе, включают те, которые характеризуются экспрессией АLРР и/или АLРРL2 в раковой клетке или ткани. Примеры видов рака, которые можно лечить АВР или его конъюгатом, включают, но не ограничиваются этим, гемобласты, опухоли гемопоэтического происхождения, которые дают начало солидным опухолям, солидные опухоли, опухоли мягких тканей и метастатические поражения.

Типовые солидные опухоли, которые можно лечить, включают, но не ограничиваются этим, злокачественные образования, например, аденокарциномы и

карциномы различных систем органов, такие, как поражающие голову и шею (включая глотку), легкие (мелкоклеточная карцинома легкого (МККЛ) или немелкоклеточная карцинома легкого (НММКЛ)), молочную железу, желудочно-кишечный тракт (например, ротовую полость, пищевод, желудок, печень, поджелудочную железу, тонкий кишечник, ободочную и прямую кишку, анальный канал), гениталии и мочеполовой тракт (например, почки, уретерий, мочевого пузыря, яичники, матку, шейку матки, эндометрий, предстательную железу, яички), кожу (например, меланома) и т. п. В определенных вариантах осуществления солидная опухоль представляет собой положительную в отношении рецептора NMDA тератому. В других вариантах осуществления рак выбран из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы (например, нейроэндокринных опухолей поджелудочной железы (НЭОПЖ) или протоковой аденокарциномы поджелудочной железы (ПАКПЖ)), рака желудка, рака матки и рака яичника. В некоторых вариантах осуществления рак представляет собой герминогенную опухоль (ГГО) или злокачественную ГГО яичника. В дополнительных вариантах осуществления рак не представляет собой чистую тератому. В некоторых вариантах осуществления солидный рак является метастатическим. В некоторых вариантах осуществления солидный рак невозможно удалить посредством хирургии (нерезектабельный).

В определенных вариантах осуществления рак представляет собой солидную опухоль, которая связана с асцитами. Асциты являются симптомом многих типов рака и также могут быть обусловлены рядом состояний, таких как распространенное заболевание печени. Типы рака, которые с определенной вероятностью приведут к асцитам, включают, но не ограничиваются этим, рак молочной железы, легкого, толстого кишечника (толстой кишки), желудка, поджелудочной железы, яичника, матки (эндометрия), брюшины и т. п. В некоторых вариантах осуществления солидная опухоль, связанная с асцитами, выбрана из рака молочной железы, рака толстой кишки, рака поджелудочной железы, рака желудка, рака матки и рака яичника. В некоторых вариантах осуществления рак связан с плевральным выпотом, например, рак легкого.

В конкретных вариантах осуществления рак представляет собой НДСРЯ, причем НДСРЯ характеризовался прогрессирующим или рецидивом у пациента в течение шести месяцев после предшествующей химиотерапии препаратами платины, и при этом пациент прошел от одной до трех линий противораковой терапии, включая по меньшей мере одну линию терапии, включающую бевацизумаб или биоаналог бевацизумаба. В других вариантах осуществления рак представляет собой НМРЛ, причем пациент имеет нерезектабельный локально распространенный или метастатический НМРЛ и проходил терапию препаратами платины и ингибитором PD-L1. В других вариантах осуществления рак представляет собой рак желудка, причем пациент имеет нерезектабельный локально распространенный или метастатический рак желудка и проходил предшествующую химиотерапию препаратами платины и фторпиримидином.

В конкретных вариантах осуществления рак представляет собой рак яичника, рак

легкого, рак эндометрия, рак мочевого пузыря или рак желудка.

В. Комбинированная терапия

Способы, антигенсвязывающие белки и конъюгаты, описанные в данном документе, можно использовать в комбинации с другими терапевтическими агентами и/или схемами. В таких комбинированных терапевтических способах два (или более) лекарственных средства доставляют субъекту в течение времени, когда субъект имеет расстройство, так что эффекты от лекарственных средства на пациента перекрываются по времени. В определенных вариантах осуществления доставка одного лекарственного средства все еще происходит, когда начинается доставка второго лекарственного средства, так что существует перекрытие в терминах введения. Это иногда называют в данном документе «одновременной» или «параллельной доставкой». В других вариантах осуществления доставка одного лекарственного средства заканчивается до начала доставки другого лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления в любом случае лечение является более эффективным благодаря комбинированному введению. Например, второе лекарственное средство является более эффективным, например, эквивалентный эффект наблюдается при меньшей дозе второго лекарственного средства, или же второе лекарственное средство уменьшает симптомы в большей степени, чем это было бы, если бы второе лекарственное средство вводили в отсутствие первого лекарственного средства, или же аналогичная ситуация наблюдается в случае первого лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления доставку осуществляют так, чтобы уменьшение симптома или другого параметра, связанного с расстройством, было большим, чем наблюдалось бы в случае, если бы одно лекарственное средство доставляли в отсутствие другого. Эффект двух лекарственных средств может быть частично аддитивным, полностью аддитивным или более чем аддитивным (т. е. синергетический ответ). Доставку можно осуществлять так, чтобы эффект первого доставляемого лекарственного средства был все еще выявляем во время доставки второго.

В определенных вариантах осуществления предложенные в данном документе способы включают введение субъекту АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2) или ADC, описанных в данном документе, например композиции или препарата, в комбинации с одним или более дополнительными видами терапии, например хирургическим вмешательством, лучевой терапией или введением другого терапевтического препарата. Например, в некоторых вариантах осуществления АВР комбинируют с химиотерапией (например, цитотоксическим агентом), направленной терапией (например, антителом против ракового антигена), ингибитором ангиогенеза и/или иммуномодулирующим агентом, таким как ингибитор молекул иммунных контрольных точек. В других вариантах осуществления дополнительная терапия представляет собой противовоспалительный (например, метотрексат) или противофиброзный агент. АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2) или ADC и дополнительную терапию можно применять одновременно или последовательно.

Типовые цитотоксические агенты, которые можно использовать в комбинации с

ABP, в некоторых вариантах осуществления включают агенты, оказывающие воздействие на микротрубочки, ингибиторы топоизомеразы, антиметаболиты, ингибиторы синтеза и деградации белка, митотические ингибиторы, алкилирующие агенты, агенты на основе платины, ингибиторы синтеза нуклеиновых кислот, ингибиторы гистондеацетилазы (ингибиторы HDAC, например, вориностат (SAHA, МК0683), энтиностат (MS-275), панобиностат (LBH589), трихостатин А (TSA), моцетиностат (MGCD0103), белиностат (PXD101), ромидепсин (FK228, депсипептид)), ингибиторы ДНК-метилтрансферазы, азотные иприты, нитрозомочевины, этиленимины, алкилсульфонаты, триазены, фолатные аналоги, нуклеозидные аналоги, ингибиторы рибонуклеотидредуктазы, алкалоиды барвинка, таксаны, эпотилоны, интеркалирующие агенты, агенты, способные препятствовать путям передачи сигнала, агенты, которые стимулируют апоптоз, и облучение или конъюгаты с молекулами антител, которые связывают поверхностные белки, для доставки токсичного агента. В одном варианте осуществления цитотоксический агент, который можно вводить с ABP, описанным в данном документе, представляет собой агент на основе платины (такой как цисплатин), циклофосфамид, дакарбазин, метотрексат, фторурацил, гемцитабин, капецитабин, гидроксимочевину, топотекан, иринотекан, азацитидин, вориностат, иксабепилон, бортезомиб, таксаны (например, паклитаксел или доцетаксел), цитохалазин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопозид, тенопозид, винкристин, винбластин, винорелбин, колхицин, антрациклины (например, доксорубицин или эпирубицин), даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, адриамицин, 1-дигидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол, пурамицин, ризин или майтанзиноиды.

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок вводят как часть химиотерапевтической схемы, такой как CHOP (циклофосфамид, доксорубицин, винкристин и преднизон); CVP (циклофосфамид, винкристин и преднизон); RCVP (ритуксимаб+CVP); RCHOP (ритуксимаб+CHOP); RCHP (ритуксимаб, циклофосфамид, доксорубицин и преднизон); RICE (ритуксимаб+ифосфамид, карбоплатин, этопозид); RDHAP, (ритуксимаб+дексаметазон, цитарабин, цисплатин); RESHAP (ритуксимаб+этопозид, метилпреднизолон, цитарабин, цисплатин); R-BENDA (ритуксимаб и бендамустин), RGDP (ритуксимаб, гемцитабин, дексаметазон, цисплатин). В одном варианте осуществления одну из схем CHOP, CVP, RCVP, RCHOP, RCHP, RICE, RDHAP, RESHAP, R-BENDA и RGDP применяют в комбинированной терапии с антигенсвязывающим белком или конъюгатом, описанными в данном документе.

Примеры вариантов направленной терапии, которые можно комбинировать с ABP, в определенных вариантах осуществления включают, но не ограничиваются этим, применение терапевтических антител. Типовые антитела включают, но не ограничиваются этим, те, которые связываются с клеточными поверхностными белками, такими как Her2, CDC20, CDC33, муцин-подобный гликопротеин и рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), присутствующими на опухолевых клетках, и

необязательно индуцируют цитостатический и/или цитотоксический эффект на опухолевые клетки, представляющие эти белки. Типовые антитела также включают ГЕРЦЕПТИН® (трастузумаб), который можно использовать для лечения рака молочной железы и других форм рака, и РИТУКСАН® (ритуксимаб), ЗЕВАЛИН® (ибритумомаб тиуксетан), ГЛИВЕК® и ЛИМФОЦИД® (эпратузумаб), которые можно использовать для лечения неходжкинской лимфомы и других форм рака. Другие типовые антитела включают панитумумаб (ВЕКТИБИКС®), ЭРБИТУКС® (ИМС-C225); эрлотиниб (ИРЕССА); БЕКСАР® (тозитумомаб с йодом 131); ингибиторы KDR (рецептора киназного домена); и антитела и антагонисты к VEGF (например, авастин®, мотесаниб VEGAF-TRAP); антитела к рецептору VEGF и их антигенсвязывающие области; антитела к Ang-1 и Ang-2 и их антигенсвязывающие области; антитела к Tie-2 и другим рецепторам Ang-1 и Ang-2; лиганды Tie-2; антитела к ингибиторам киназ Tie-2; ингибиторы Hif-1a и КАМПАТ® (алемтузумаб). В определенных вариантах осуществления агенты для противораковой терапии представляют собой полипептиды, которые селективно индуцируют апоптоз в опухолевых клетках, включая, но не ограничиваясь этим, TNF-родственный полипептид TRAIL.

В определенных вариантах осуществления предложенный в данном документе антигенсвязывающий белок используют в комбинации с одним или более антиангиогенными агентами, которые снижают ангиогенез. Такие агенты включают, но не ограничиваются этим, антагонисты IL-8; Кампат®, B-FGF; антагонисты FGF; антагонисты Tek (Cerretti et al., публикация США № 2003/0162712; Cerretti et al., патент США № 6413932 и Cerretti et al., патент США № 6521424); анти-TWEAK агенты (которые включают, но не ограничиваются этим, антитела и антигенсвязывающие фрагменты); антагонисты растворимого рецептора TWEAK (Wiley, патент США № 6727225); домен дизинтегрина ADAM для антагонизации связывания интегрина с его лигандами (Fanslow et al., публикация США №. 2002/0042368); антитела, антигенсвязывающие области или антагонисты к рецептору еrh и к эфрину (патенты США №№ 5981245; 5728813; 5969110; 6596852; 6232447; 6057124); анти-VEGF агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают VEGF, или растворимые рецепторы VEGF, или их лиганд-связывающие области), такие как Авастин® или VEGF-TRAP™, и агенты против рецепторов VEGF (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают их), агенты, ингибирующие EGFR (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают их), такие как панитумумаб, ИРЕССА® (гефитиниб), ТАРЦЕВА® (эрлотиниб), анти-Ang-1 и анти-Ang-2 агенты (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают их или их рецепторы, например, Tie-2/ТЕК) и агенты, ингибирующие Tie-2 киназу (например, антитела или антигенсвязывающие области, которые специфически связывают и ингибируют активность факторов роста, такие как антагонисты фактора роста гепатоцитов (HGF, также известный как рассеивающий фактор)), антитела или антигенсвязывающие области,

которые специфически связывают их рецептор «с-met»; анти-PDGF-BB антагонисты; антитела и антигенсвязывающие области к лигандам PDGF-BB; и ингибиторы киназ PDGFR.

Другие антиангиогенные агенты, которые можно использовать в комбинации с антигенсвязывающим белком, включают агенты, такие как ингибиторы MMP-2 (матриксной металлопротеиназы 2), ингибиторы MMP-9 (матриксной металлопротеиназы 9) и ингибиторы СОХ-II (циклооксигеназы II). Примеры применимых ингибиторов СОХ-II включают ЦЕЛЕБРЕКС® (целекоксиб), валдекоксиб и рофекоксиб.

В контексте данного документа «молекула ингибитора контрольной точки» относится к молекуле в иммунной системе, которая повышает сигнал (стимулирующая молекула) и/или понижает сигнал (ингибирующая молекула). Многие виды рака уклоняются от иммунной системы путем ингибирования Т-клеточной сигнализации. Типовые молекулы иммунных контрольных точек, которые можно использовать с АВР, в определенных вариантах осуществления включают, но не ограничиваются этим, белок запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-1), лиганд белка запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-L1), PD-L2, ассоциированный с цитотоксическими Т-лимфоцитами белок 4 (CTLA-4), белок, содержащий Т-клеточный иммуноглобулин и домен муцина 3 (TIM-3), ген активации лимфоцитов 3 (LAG-3), молекулу клеточной адгезии, связанную с карциноэмбриональным антигеном 1 (CEACAM-1), CEACAM-5, V-доменный Ig-супрессор активации Т-клеток (VISTA), В- и Т-лимфоцитарный аттенюатор (BTLA), Т-клеточный иммунорецептор с доменами Ig и ITIM (TIGIT), ассоциированный с лейкоцитами иммуноглобулиноподобный рецептор 1 (LAIR1), CD160, TGFR, рецептор аденозина 2A (A2AR), B7-H3 (также известный как CD276), B7-H4 (также называемый VTCN1), индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO), 2B4, иммуноглобулиноподобный рецептор клеток-киллеров (KIR), OX40, 4-1BB, 4-1BBL, B7-H3, индуцибельный Т-клеточный костимулятор (ICOS/ICOS-L), CD27/CD70, глюкокортикоид-индуцированный рецептор TNF (GITR), CD47/сигнальный регуляторный белок альфа (SIRP α) и индоламин-2,3-диоксигеназа (IDO).

Конкретные примеры ингибиторов иммунных контрольных точек, которые можно использовать в комбинации с АВР, в определенных вариантах осуществления включают, но не ограничиваются этим, следующие моноклональные антитела: ингибиторы PD-1, такие как пембролизумаб (Кейтруда®, Merck) и ниволумаб (Опдиво®, Bristol-Myers Squibb); ингибиторы PD-L1, такие как атезолизумаб (Тецентрик®, Genentech), авелумаб (Бавенсио®, Pfizer), дурвалумаб (Имфинзи®, AstraZeneca); и ингибиторы CTLA-1, такие как ипилимумаб (Ервой®, Bristol-Myers Squibb) и тремелиумаб (AstraZeneca).

VII. Диагностические применения

В другом аспекте АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2 или его фрагмент), полипептиды и нуклеиновые кислоты, предложенные в данном документе, можно применять в способах выявления, диагностики и мониторинга заболевания, расстройства или состояния, связанного с ALPP и/или ALPPL2.

В некоторых вариантах осуществления способ включает выявление экспрессии ALPP и/или ALPPL2 в образце, полученном от субъекта, который предположительно имеет или имеет расстройство, связанное с ALPP и/или ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления способ выявления включает приведение образца в контакт с антителом, полипептидом или полинуклеотидом, описанным в данном документе, и определение, отличается ли уровень связывания от эталонного или сравнительного образца. В некоторых вариантах осуществления такие способы применимы для определения того, являются ли описанные в данном документе антитела или полипептиды подходящим вариантом лечения для субъекта.

Например, в некоторых вариантах осуществления клетки или клеточный/тканевый лизат приводят в контакт с антителом к ALPP/ALPPL2 и определяют связывание между антителом и клеткой или антигеном. Когда исследуемые клетки демонстрируют активность связывания по сравнению с эталонной клеткой из того же типа ткани, это может указывать на наличие заболевания или состояния, связанного с ALPP и/или ALPPL2. В некоторых вариантах осуществления исследуемые клетки получены из тканей человека.

Для выявления специфического связывания антитело - антиген можно использовать различные способы, известные в данной области техники. Типовые иммуноанализы, которые можно проводить в соответствии с изобретением, включают флуоресцентный поляризационный иммуноанализ (ФПИА), флуоресцентный иммуноанализ (ФИА), ферментный иммуноанализ (ФИА), нефелометрический иммуноанализ ингибирования (НИА), ферментный иммуносорбентный анализ (ELISA) и радиоиммуноанализ (РИА).

Предложенные в данном документе диагностические применения включают использование АВР (например, антитела к ALPP/ALPPL2 или его фрагмента) для выявления экспрессии ALPP и/или ALPPL2 и связывания лигандов с ALPP и/или ALPPL2. Для диагностических применений АВР, как правило, метят выявляемой метящей группой. Подходящие метящие группы включают, но не ограничиваются этим, следующие: радиоизотопы или радионуклиды (например, ^3H , ^{14}C , ^{15}N , ^{35}S , ^{90}Y , ^{99}Tc , ^{111}In , ^{125}I , ^{131}I), флуоресцентные группы (например, ФИТЦ, родамин, лантаноидные люминофоры), ферментативные группы (например, пероксидазу хрена, β -галактозидазу, люциферазу, щелочную фосфатазу), хемилюминесцентные группы, биотинильные группы или predetermined полипептидные эпитопы, распознаваемые вторичным репортером (например, парные последовательности лейциновых молний, сайты связывания для вторичных антител, металлсвязывающие домены, эпитопные теги). В некоторых вариантах осуществления метящая группа связана с АВР с помощью спейсерных групп различной длины для уменьшения потенциальных стерических затруднений. В данной области техники известны различные способы мечения белков, которые можно использовать. Примеры способов, применимых для выявления наличия ALPP и/или ALPPL2, включают иммуноанализы, такие как описаны выше.

В другом аспекте АВР можно использовать, чтобы идентифицировать клетку или клетки, которые экспрессируют ALPP и/или ALPPL2. В конкретных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок метят метящей группой и выявляют связывание меченого антигенсвязывающего белка с ALPP и/или ALPPL2. В дополнительных конкретных вариантах осуществления связывание антигенсвязывающего белка с ALPP и/или ALPPL2 выявляют *in vivo*.

Антигенсвязывающий белок (например, антитело к ALPP/ALPPL2 или его фрагмент) также можно использовать как окрашивающий реагент в патологии, используя методики, хорошо известные в данной области техники.

VIII. Фармацевтические композиции и составы

Также предложены фармацевтические композиции, которые содержат АВР (например, антитело к ALPP/ALPPL2 или его фрагмент) и которые можно использовать в любом из терапевтических применений, описанных в данном документе. В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или множества антигенсвязывающих белков вместе с фармацевтически приемлемым разбавителем или носителем. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество одного или множества антигенсвязывающих белков, фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель, солюбилизатор, эмульгатор, консервант и/или адъювант. Приемлемые материалы состава являются нетоксичными для реципиентов в применяемых дозировках и концентрациях. Фармацевтические композиции можно составлять в виде жидких, замороженных или лиофилизированных композиций.

В определенных вариантах осуществления фармацевтическая композиция может содержать составляющие материалы для модификации, поддержания или сохранения, например pH, осмолярности, вязкости, прозрачности, цвета, изотоничности, запаха, стерильности, стабильности, скорости растворения или высвобождения, всасывания или проникновения композиции. Подходящие для составления материалы включают, но не ограничиваются этим, аминокислоты; противомикробные средства; антиоксиданты; буферы; объемобразующие агенты; хелатирующие агенты; комплексообразующие агенты; наполнители; углеводы, такие как моносахариды или дисахариды; белки; красящие, ароматизирующие и разбавляющие агенты; эмульгирующие агенты; гидрофильные полимеры; низкомолекулярные полипептиды; солеобразующие противоионы (такие как натрий); консерванты; растворители (такие как глицерин, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль); сахарные спирты; суспендирующие агенты; поверхностно-активные вещества или смачивающие агенты; агенты, повышающие стабильность; агенты, повышающие тоничность; средства доставки и/или фармацевтические адъюванты. Дополнительные подробности и варианты в отношении подходящих агентов, которые могут быть включены в фармацевтические композиции, приведены, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Lloyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013); Ansel et al., Pharmaceutical Dosage Forms and Drug Delivery

Systems, 7th ed., Lippencott Williams and Wilkins (2004); и Kibbe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 3rd ed., Pharmaceutical Press (2000).

Компоненты фармацевтической композиции выбирают в зависимости от, например, предполагаемого пути введения, формата доставки и необходимой дозировки. Смотрите, например, Remington's Pharmaceutical Sciences, 22nd Edition, (Loyd V. Allen, ed.) Pharmaceutical Press (2013). Композиции подбирают так, чтобы повлиять на физическое состояние, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo* описанных антигенсвязывающих белков. Первичный наполнитель или носитель в фармацевтической композиции может быть водным или неводным по своей природе. Например, подходящий наполнитель или носитель может представлять собой воду для инъекций или физиологический солевой раствор. В определенных вариантах осуществления композиции антигенсвязывающего белка можно готовить для хранения путем смешивания выбранной композиции, имеющей необходимую степень чистоты, с необязательными агентами для составления в форме лиофилизированной таблетки или водного раствора. Дополнительно, в определенных вариантах осуществления антигенсвязывающий белок можно составлять в виде лиофилизата, используя соответствующие эксципиенты.

Фармацевтическую композицию составляют так, чтобы она была совместима с предполагаемым путем введения. Примеры путей введения включают внутривенное (в/в), интрадермальное, ингаляционное, трансдермальное, местное, трансмукозальное и ректальное введение. Предпочтительным путем введения для антигенсвязывающего белка (например, антитела) является в/в инфузия. В другом предпочтительном варианте осуществления препарат вводят путем внутримышечной или подкожной инъекции.

IX. Наборы/готовые изделия

Также предложены наборы, содержащие описанный в данном документе АВР. В одном варианте осуществления такие наборы содержат один или более контейнеров, содержащих антигенсвязывающий белок (например, антитело к ALPP/ALPPL2) или единичные лекарственные формы и/или готовые изделия. В некоторых вариантах осуществления предложена единичная дозировка, при этом единичная дозировка содержит predetermined количество композиции, содержащей антигенсвязывающий белок, с одним или более дополнительными агентами или без них. В некоторых вариантах осуществления такая единичная дозировка предоставлены в одноразовом предварительно заполненном шприце для инъекций. В различных вариантах осуществления композиция, содержащаяся в единичной дозировке, может содержать: солевой раствор; буфер, другие компоненты состава, и/или быть составлена в стабильном и эффективном диапазоне pH, как описано в данном документе. В некоторых альтернативных вариантах осуществления композиция предоставлена в виде лиофилизированного порошка, который можно восстанавливать при добавлении соответствующей жидкости, например стерильной воды.

Некоторые предложенные в данном документе наборы дополнительно содержат инструкции по применению при лечении заболевания, связанного с ALPP и/или ALPPL2,

в соответствии с любым из способов, описанных в данном документе. Набор может дополнительно содержать описание того, как выбрать или определить индивида, подходящего для лечения. Инструкции, предоставляемые в наборах по изобретению, как правило, представляют собой написанные инструкции на этикетке или вкладыше в упаковку (например, листе бумаги, включенном в упаковку), но также приемлемы машиночитаемые инструкции (например, хранящиеся на магнитном или оптическом диске). В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит другой терапевтический агент, такой как описанные выше как подходящие для применения в комбинации с антигенсвязывающим белком.

В дополнительном аспекте предложены наборы для выявления наличия ALPP и/или ALPPL2 или клетки, экспрессирующей ALPP и/или ALPPL2, в образце. Такие наборы, как правило, содержат антигенсвязывающий белок, описанный в данном документе, и инструкции по применению набора.

Определенные наборы, например, предназначены для диагностики рака и содержат контейнер, содержащий антигенсвязывающий белок (например, антитело к ALPP/ALPPL2) и один или более реагентов для выявления связывания антигенсвязывающего белка с ALPP и/или ALPPL2. Такие реагенты могут включать, например, флуоресцентные теги, ферментативные теги или другие выявляемые теги. Реагенты также могут включать вторичные или третичные антитела или реагенты, например, для применения в ферментативных реакциях, которые дают продукт, который можно визуализировать. В одном варианте осуществления диагностический набор содержит один или более антигенсвязывающих белков в меченной или немеченной форме в подходящем(их) контейнере(ах), реагенты для инкубации для непрямого анализа и субстраты или дериватирующие агенты для выявления в таком анализе, в зависимости от природы метки.

Предложенные в данном документе наборы можно использовать для *in situ* выявления. Некоторые способы, в которых используют такие наборы, включают получение гистологического образца от пациента и последующее объединение меченного антигенсвязывающего белка (например, антитела к ALPP/ALPPL2) с биологическим образцом. С помощью таких способов можно определить не только наличие ALPP или фрагментов ALPP и/или ALPPL2 или фрагментов ALPPL2, но также распределение таких пептидов в исследуемой ткани (например, в контексте оценки распространения раковых клеток).

В другом аспекте предложено анти-идиотипическое антитело (Id), которое связывается с антигенсвязывающим белком (например, антителом к ALPP/ALPPL2). Антитело Id можно получать путем иммунизации животного того же вида и генетического типа как источника анти-ALPP/ALPPL2 mAb с получением mAb, на которое направлено анти-Id. Иммунизированное животное, как правило, может распознавать и отвечать на идиотипические детерминанты иммунизирующего антитела путем выработки антитела к этим идиотипическим детерминантам (анти-Id антитела).

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, представлены исключительно в иллюстративных целях и не подразумевают ограничения объема прилагаемой формулы изобретения.

Х. Примеры

Пример 1: Уровни экспрессии ALPP/ALPPL2

Линии клеток, описанные в следующих примерах, поддерживали в культуре в соответствии с условиями, определенными Американской коллекцией типовых культур (ATCC) или Немецкой коллекцией микроорганизмов и клеточных культур GmbH, Брауншвейг, Германия (DMSZ), или Японским банком ресурсов для исследования рака (JCRB), или известными из других источников.

Количественное определение числа копий ALPP на клеточной поверхности различных линий раковых клеток определяли, используя мышиное mAb к ALPP в качестве первичного антитела и непрямой анализ методом проточной цитометрии DAKO QiFiKit согласно описанию производителя (DAKO A/S, Glostrup, Denmark), и оценивали с помощью проточного цитометра Attune NxT. Полученное число молекул ALPP, экспрессируемых на клетку, приведено в таблице 3. Уровни экспрессии мРНК ALPP/ALPPL2 получали из данных РНК-секвенирования линии клеток Genentech (смотрите Klijn C, et al. Nat Biotechnol. 2015 Mar;33(3):306-12).

Таблица 3: Число молекул ALPP/ALPPL2 на клетку для различных линий клеток

Линия клеток	Обозначение	№ рецептора (X10 ³)	мРНК ALPP (TPM+1)	мРНК ALPPL2 (TPM+1)
HEP2	Шейка матки	745	849	178
NCI-H1651	Легкое	500	165	665
RMUGS	Яичник	400	81	16
MKN1	Желудок	374	148	26
COV644	Яичник	200	121	26
NUGC3	Желудок	191	58	11
NCI-N87	Желудок	140	41	25
CAOV3	Яичник	60	12	3
CasKi	Шейка матки	52	48	8
LoVo	Толстая кишка	50	10	6
647V	Мочевой пузырь	33	0	0
ABC1	Легкое	31	25	6
HCC15	Легкое	0	0	0
NCI-H1869	Легкое	0	0	0

Матрицы опухолевых тканей получали из коммерческих источников. Замороженные или зафиксированные в формалине и залитые парафином

(ФФЗП) ткани были приобретены у US Biomax Inc. Все образцы обрабатывали на аутостейнере Bond-Max™ (Leica).

Срезы замороженных образцов на стеклянных слайдах фиксировали ацетоном в течение 10 минут перед окрашиванием. Слайды инкубировали с первичным антителом к ALPP/ALPPL2 (H17E2; Thermo; кат. № MA1-20245). Совпадающий по изотипу мышинный IgG1 использовали в качестве отрицательного контроля для фонового окрашивания. Для автоматизированного ИГХ окрашивания использовали набор Refine DAB (Leica, кат. № DS9800). Слайды инкубировали с мышинными моноклональными первичными антителами к ALPP в течение 45 мин при 5 мкг/мл с предварительной инкубацией с реагентом PeroxAbolish (Biocare Medica, кат. № PXA969M) в течение 15 минут и 20 мин блокированием белка (DAKO, кат. № X0909). ФФЗП срезы на стеклянных слайдах депарафинизировали, используя раствор Bond™ Dewax (Leica, кат. № AR9222) при 72 °С, и регидратировали. Извлечение антигена проводили, используя раствор для извлечения эпитопов 2 на основе ЭДТА Bond™ (Leica, кат. № AR9640) в течение 20 мин при 95-100 °С перед инкубацией с первичным антителом к ALPP/ALPPL2 (моноклональное Ab 25C3; разработанное в лаборатории мышинное моноклональное антитело) в течение 45 мин при 1 мкг/мл. Совпадающий по изотипу мышинный IgG2a использовали в качестве отрицательного контроля для фонового окрашивания. Для автоматизированного ИГХ окрашивания использовали набор Refine DAB (Leica, кат. № DS9800). Слайды инкубировали с мышинными моноклональными антителами к ALPP mAb в течение 45 мин при 1 мкг/мл с предварительным 20 мин блокированием белка (DAKO, кат. № X0909). После проявления хромогена проводили контрокрашивание срезов гематоксилином и накрывали их покровными стеклами. Оценку слайдов проводил патолог, а изображения получали, используя слайд-сканер Aperio (Leica). Интенсивность окрашивания оценивали по шкале от 0 до +3, при этом частота находилась в квартилях (0-25, 26-50, 51-75 и 76-100). Было обнаружено, что уровень экспрессии ALPP/ALPPL2 является высоким при многих солидных опухолевых показателях, включая рак яичника, яичка и эндометрия, как показано в таблице 4. ~25% образцов аденокарциномы легкого, рака желудка и мочевого пузыря также демонстрировали экспрессию ALPP/ALPPL2.

Таблица 4

Рак	Любой Экспрессия[†]	Высокая Экспрессия^{††}
Яичник ¹	90%	70%
Яичко	80%	60%
Эндометрий	57%	41%
Аденокарцинома легкого (НМРЛ)	80%*	25%
Желудок	30%	25%
Мочевой пузырь ²	59%	23%

¹ Резистентность к платине

² нерезектабельность

† Заболеваемость на основании любой частоты и интенсивности

†† Частота экспрессии на основании оценки 2+ , > 25% положительных клеток

* 1+ экспрессии наблюдается на поверхности раздела с не неопластическими тканями.

9

Пример 2: Выбор основного антитела

Конъюгация и in vitro цитотоксичность

Мышей иммунизировали рекомбинантным полноразмерным ALPPL2. Лимфоциты, полученные из селезенки и лимфатических сосудов мышей, вырабатывающих антитело к ALPP, сливали с клетками миеломы. Слитые клетки восстанавливали в течение ночи в среде для роста гибридомы. После восстановления клетки осаждали центрифугированием и затем высевали в полутвердую среду. Гибридомы инкубировали и собирали гибридомные клоны, вырабатывающие IgG. Проводили скрининг антител из этого гибридомного подхода в отношении ALPP-, ALPPL2-, ALPI- и ALPL-экспрессирующих линий клеток НЕК293, используя iQue в соответствии с инструкциями производителя. Антитела с перекрестной реактивностью в отношении ALPP и ALPPL2, но не ALPI и ALPL, оценивали как ADC.

Различные мышинные моноклональные антитела к ALPP/ALPPL2 конъюгировали с 10-12 нагрузочными молекулами MDpg-PEG(12)-gluc-MMAE или ауристинина Т, которые демонстрируют постороннюю активность или нет, соответственно. Способ конъюгации соответствует описанному в публикации США № 2018/0092984.

Опухолевые клетки CAOV3 (ALPP), COV644 (ALPP+) и NCI-H1651 (ALPPL2++ALPP+) инкубировали с конъюгатами антитела к ALPP/ALPPL2 лекарственный препарат (ADC) в течение 96 часов при 37 °С. ADC на основе человеческого IgG использовали как отрицательный контроль. Жизнеспособность клеток определяли, используя Cell Titer Glo в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресцентный сигнал измеряли на флуоресцентном планшет-ридере Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Данные нормализовали относительно необработанных клеток и рассчитывали значения x50, используя программное обеспечение Graph Pad. Как показано на Фиг. 1-2, подгруппа антител демонстрировала низкие значения x50 с обоими видами нагрузки, что позволяет предположить высокую способность доставки лекарственного препарата.

Анализ проточной цитометрии и насыщения связывания

Клетки НЕК293, экспрессирующие ALPP яванского макака, ALPP, ALPPL2, ALPI и ALPL человека, использовали для оценки специфичности и аффинности связывания. Вкратце, сто тысяч экспрессирующих мишени клеток НЕК293 переносили в 96-луночные планшеты. Клетки осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в 100 мкл ФСБ+2% масс./об. БСА. После блокирования клетки ресуспендировали в ФСБ+2% масс./об. БСА с немечеными моноклональными антителами к ALPP/ALPPL2 в диапазоне концентраций от 8 пМ до 666 нМ и инкубировали на льду в течение 30 минут. Клетки

дважды промывали в ФСБ и ресуспендировали с мечеными R-PE вторичными козыми антителами к белкам человека или мыши (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA) в течение 30 минут на льду. Специфичность моноклональных антител в отношении ALPP и ALPPL2 человека и яванского макака, но не других представителей этого семейства щелочных фосфатаз, подтверждали методом проточной цитометрии. Флуоресценцию анализировали на проточном цитометре Attune NxT и использовали процент насыщенного флуоресцентного сигнала для определения процента связывания и последующего расчета кажущейся K_D . Антитела 1C7 и 12F3 демонстрировали наименьшую K_D среди первых кандидатов, как показано на Фиг. 3. При этом, хотя SG82-12F3 и SG84-1F7 демонстрируют сходную аффинность в отношении их мишеней, SG82-12F3 демонстрирует большие уровни насыщения в отношении ALPP, чем SG84-1F7, как показано на Фиг. 4. В конечном итоге для гуманизации было выбрано антитело 12F3 на основании его превосходящей ADC-цитотоксичности и высокой аффинности в отношении ALPP/ALPPL2, а также наличия эпитопа, который является консервативным с ортологом яванского макака.

Пример 3: Гуманизация и исследования связывания

Гуманизированные антитела получали из мышинового антитела 12F3. Было создано восемь гуманизированных тяжелых цепей (HA-HH) и двенадцать гуманизированных легких цепей (L1-LI), содержащих обратные мутации в разных позициях. В некоторых случаях обратные мутации совпадали с мышиной зародышевой линией, в других случаях - нет (как в случае с соматическими мутациями). Проводили спаривание гуманизированных тяжелых и легких цепей. Смотрите Фиг. 5-8 в отношении выравнивания последовательностей и таблицы 5-8 в отношении конкретных проведенных мутаций.

Таблица 5: Гуманизирующие мутации в вариантах h12F3 по варибельной области тяжелой цепи (vH)

вH Вариант	Человеческая акцепторная последовательность в тяжелой цепи	Мышьиные донорные каркасные остатки	Человеческие акцепторные остатки CDR	Вторичные человеческие V- генные акцепторные остатки (IGHV3-72)
hvHA	IGHV3-49/HJ4	нет	нет	Нет
hvHB	IGHV3-49/HJ4	H30, H73	нет	Нет
hvHC	IGHV3-49/HJ4	H30, H48, H49, H73	нет	Нет
hvHD	IGHV3-49/HJ4	H30, H73, H78, H93	нет	Нет
hvHE	IGHV3-49/HJ4	H30, H48, H49, H73, H78, H93	нет	Нет
hvHF	IGHV3-49/HJ4	H30, H37, H48, H49, H73, H78, H93	нет	Нет
hvHG	IGHV3-49/HJ4	H30, H37, H48, H49, H73, H78, H93	H60	Нет
hvHH	IGHV3-49/HJ4	H30, H37, H48, H49, H73, H78, H93	H60	H76, H77

Таблица 6: Конкретные мутации мышиной каркасной области в вариантах h12F3

по вариабельной области тяжелой цепи

Вариант по vH	30	37	48	49	73	78	93	% человеческих
hvHA								94,0
hvHB	T				N			92,0
hvHC	T		L	A	N			90,0
hvHD	T				N	L	A	90,0
hvHE	T		L	A	N	L	A	88,0
hvHF	T	V	L	A	N	L	A	88,0
hvHG	T	V	L	A	N	L	A	88,0
hvHH	T	V	L	A	N	L	A	87,0

Таблица 7: Гуманизирующие мутации в вариантах h12F3 по вариабельной области легкой цепи каппа (vL)

Вариант vL	Человеческая акцепторная последовательность каппа	Мышиные донорные каркасные остатки	Человеческие акцепторные остатки CDR	Вторичные человеческие V-генные акцепторные остатки (IGKV1D-43, IGKV1-16)
hvL1	IGKV1-33/KJ2	нет	L24, L33, L34, L53, L55, L56	Нет
hvL2	IGKV1-33/KJ2	нет	L24, L33, L34, L53, L56	L53, L56
hvL3	IGKV1-33/KJ2	нет	L24, L33, L53	L53
hvLA	IGKV1-33/KJ2	нет	нет	Нет
hvLB	IGKV1-33/KJ2	L2, L49, L69	нет	L71
hvLC	IGKV1-33/KJ2	L2	нет	L71
hvLD	IGKV1-33/KJ2	L2	L24, L53	L53, L71
hvLE	IGKV1-33/KJ2	L2, L49, L69	L24, L53, L56	L53, L56, L71
hvLF	IGKV1-33/KJ2	L2, L38, L49, L69	L24, L33, L53, L56	L53, L56, L71
hvLG	IGKV1-33/KJ2	L2, L40, L49, L69	L24, L33, L53, L56	L53, L56, L71
hvLH	IGKV1-33/KJ2	L2, L38, L40, L49, L69	нет	L71
hvLI	IGKV1-33/KJ2	L2, L38, L40, L49, L69	нет	<u>L36</u> , L47, L71, <u>L73</u>

Таблица 8: Конкретные мутации мышинной каркасной области в вариантах h12F3 по вариабельной области легкой цепи каппа

Вариант по vL	2	38	40	49	69	% человеческих
hvL1						94,7
hvL2						91,5
hvL3						90,4
hvLA						88,3
hvLB	T			H	R	84,0
hvLC	T					86,2
hvLD	T					87,2
hvLE	T			H	R	85,1
hvLF	T	Y		H	R	85,1

hVLG	T		T	H	R	85,1
hVLH	T	Y	T	H	R	81,9
hVLI	T	Y	T	H	R	78,7

Антитела, обозначенные HAL1 (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vL1), HAL2 (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vL2) HAL3 (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vL3), HALA (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLA), HALB (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLB), HALC (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLC), HALD (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLD), HALE (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLE), HALE (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLE), HALF (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLF), HALG (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLG), HALH (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLH), and HALI (антитело, имеющее переменную область тяжелой цепи, обозначенную vHA, и переменную область легкой цепи, обозначенную vLI), можно использовать в настоящем изобретении вместо антитела HGLF. Аналогично, антитела, имеющие любую пермутацию переменной области тяжелой цепи, обозначенной vHA, vHB, vHC, vHD, vHE, vHF, vHG или vHH, или переменной области легкой цепи, обозначенной vL1, vL2, vL3, vLA, vLB, vLC, vLD, vLE, vLF, vLG, vLH или vLI, можно использовать в настоящем изобретении вместо антитела HGLF. Смотрите Фиг. 5-8 в отношении последовательностей vHA, vHB, vHC, vHD, vHE, vHF, vHG, vHH, vL1, vL2, vL3, vLA, vLB, vLB-Q, vLB-V, vLC, vLD, vLE, vLF, vLG, vLH и vLI.

Гуманизированные антитела с низким качеством, низким выходом экспрессии или неблагоприятной последовательностью не оценивали в функциональных анализах. Кажущуюся аффинность гуманизированных антител на ALPPL2-экспрессирующих клетках оценивали, используя проточную цитометрию. Вкратце, K_D для каждого полученного антитела определяли в анализе насыщения связывания. Клетки HEK293, стабильно экспрессирующие человеческий ALPPL2, аликвотировали в количестве 1×10^5 на лунку в 96-луночные планшеты с v-образным дном. Каждое гуманизированное антитело к ALPP/ALPPL2 добавляли в концентрациях 0,2, 2 и 20 нМ и

инкубировали на льду в течение 60 минут. Клетки осаждали и промывали 2X ФСБ/ФБС с последующим добавлением 10 мкг/мл меченого APC мышиного вторичного IgG-антитела против белков человека и инкубировали на льду в течение 60 минут. Клетки осаждали, промывали 2X ФСБ/ФБС и ресуспендировали в 100 мкл 2% параформальдегида. Флуоресценцию анализировали методом проточной цитометрии, используя процент насыщенного флуоресцентного сигнала для определения процента связывания и последующего расчета кажущейся K_D на основании трех концентраций антитела. Кажущуюся K_D для рекомбинантного гуманизированного антитела к ALPP/ALPPL2 сравнивали с с12F3 (химерное 12F3 IgG1 k), как показано в таблице 9.

Таблица 9: Связывание вариантов антитела hALPP-1 по данным проточной цитометрии на клетках HEK-ALPPL2 (KD (нМ)); Н/И=не исследовано.

	L1	L2	L3	LA	LB	LC	LD	LE	LF	LG	LH	LI
HA	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И	Н/И
HB	Н/И	Н/И	1,8	1,6	1,3	3,1	2,5	1,2	1,2	1,7	1,4	2,4
HC	Н/И	Н/И	3,3	2,9	1,8	3,9	2,7	1,5	1,7	2,2	2,4	2,1
HD	Н/И	Н/И	2,0	3,1	1,4	3,0	2,1	1,7	1,6	1,9	1,9	2,9
HE	Н/И	Н/И	3,1	3,7	1,5	4,6	~4	1,4	1,8	2,0	2,4	2,2
HF	Н/И	Н/И	1,1	1,2	1,1	1,8	0,7	1,3	1,4	1,3	1,4	1,5
HG	Н/И	Н/И	1,3	1,6	1,2	1,7	1,6	1,7	1,2	1,3	1,6	1,4
HN	Н/И	Н/И	1,2	2,0	1,0	1,7	1,6	1,5	1,7	1,3	1,3	1,9

Пример 4: Конъюгация h12F3 и In Vitro цитотоксичность

Несколько антител h12F3 конструировали, используя человеческие зародышевые линии варибельной области тяжелой цепи hIGHV3-49/hIGHJ4 и человеческие зародышевые линии варибельной области легкой цепи hIGKV1-33/hIGKJ2 или hIGKV1D-43/hIGKJ2 or hIGKV1-16/hIGKJ2 в качестве человеческих акцепторных последовательностей. Антитела отличались по выбранным аминокислотным остаткам для обратной мутации на последовательность мышиного антитела или мышью зародышевой линии.

Как указано выше, гуманизированные антитела с низким качеством, низким выходом экспрессии или неблагоприятной последовательностью не оценивали в функциональных анализах. Для оценки доставки лекарственного препарата различные гуманизированные версии антитела h12F3 конъюгировали с 8 нагрузочными молекулами MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE ауристатина Т. После отбора потенциальных основных антител проводили дополнительную оценку цитотоксичности с разными нагрузочными молекулами, включая антитела, конъюгированные с 4 нагрузочными молекулами mc-vc-PAVC-MMAE или mp-dLAE-PAVC-MMAE или с 8 нагрузочными молекулами MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE. Способ конъюгации соответствует описанному в публикации США № 2018/0092984. В случае конъюгации mp-dLAE-PAVC-MMAE-линкер, конъюгаты антитело-лекарственный препарат получали, как описано в PCT/US2020/051648 (поданной 18 сентября 2020 г.), используя гуманизированные антитела к ALPP/ALPPL2, описанные в данном документе. В случае конъюгации антитела с mp-dLAE-PAVC-MMAE антитело

частично восстанавливали, используя соответствующие эквиваленты ТСЕР (трис(2-карбоксиил)фосфин) в соответствии с процедурой, которая в явном виде включена в данный документ посредством ссылки, из US 2005/0238649. Вкратце, антитело в фосфатно-солевом буфере с 2 мМ ДТРА, рН 7,4, обрабатывали 2,1 экв. ТСЕР, а затем инкубировали при 37 °С в течение около 45 минут. Значение тиол/Ab проверяли путем проведения реакции восстановленного антитела с соединением 1, используя хроматографию с гидрофобным взаимодействием для определения нагрузки.

Трипептидные соединения лекарственный препарат ауристатин - линкер mp-dLAE-PAVC-MMAE конъюгировали с частично восстановленным антителом, используя способ, который в явном виде включен в данный документ посредством ссылки, из US 2005/0238649. Вкратце, соединение лекарственный препарат - линкер (mp-dLAE-PAVC-MMME) (50% избыток) в ДМСО добавляли к восстановленному антителу в ФСБ с ЭДТА вместе с дополнительным количеством ДМСО для общего количества соразтворителя в реакции 10-20%. Через 30 минут при температуре окружающей среды в смесь добавляли избыток QuadraSil MPTM для гашения всех не вступивших в реакцию малеимидных групп. Затем полученный ADC очищали и проводили замену буфера путем обессоливания, используя смолу Sephadex G25, на буфер ФСБ и держали при -80 °С до дальнейшего использования. Концентрацию белка полученной композиции ADC определяли на 280 нм. Соотношение лекарственный препарат - антитело (DAR) конъюгата определяли посредством хроматографии с гидрофобным взаимодействием (ХГВ).

Для анализа *in vitro* цитотоксичности опухолевые клетки высевали за 24 часа до обработки ADC. Клетки обрабатывали указанными дозами ADC и инкубировали в течение 96 часов при 37 °С. В некоторых случаях не связывающий антиген ADC включали в качестве отрицательного контроля. Жизнеспособность клеток для клеточных линий определяли, используя Cell Titer Glo (Promega Corporation, Madison, WI) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с реагентами Cell Titer Glo и измеряли люминесценцию на планшет-ридере Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA). Как показано на Фиг. 9, гуманизированная версия антитела h12F3, содержащая F-вариант легкой цепи, определяет варианты с высокой способностью доставки лекарственного препарата, в особенности по сравнению с другими комбинациями.

На основании цитотоксической активности и кажущейся аффинности выбранные гуманизированные антитела дополнительно оценивали в отношении их способности доставлять разную нагрузку в опухолевые клетки. Гуманизированные антитела 12F3 с высокой способностью доставки лекарственного препарата конъюгировали с 4 нагрузочными молекулами mc-vc-MMAE или mc-vc-PAVC-MMAE или с 8 нагрузочными молекулами MDpr-PEG(12)-gluc MMAE, как описано выше.

Опухолевые клетки инкубировали с каждым ADC в течение 96-144 часов при 37 °С. Несвязывающий (называемый h00 или IgG) ADC использовали в качестве отрицательного контроля. Жизнеспособность клеток определяли, используя Cell Titer Glo

в соответствии с инструкциями производителя. Флуоресцентный сигнал измеряли на флуоресцентном планшет-ридере Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA). Данные нормализовали относительно необработанных клеток и рассчитывали значения IC₅₀, используя программное обеспечение Graph Pad. Результаты представлены в таблице 10 как IC₅₀, концентрация соединения, необходимая для достижения 50% снижения жизнеспособности по сравнению с обработанными носителем клетками (контроль=100%). h12F3 ADC обеспечивают одно- и двузначные значения IC₅₀ в нг/мл в панели линий клеток с экспрессией ALPP в диапазоне от 30000 до 500000.

Таблица 10: IC₅₀ (нг/мл) конъюгатов антитело h12F3 HGLF - лекарственный препарат против различных раковых клеток. Результаты представлены как IC₅₀ и оставшийся процент жизнеспособности в конечный момент времени.

Линия клеток	Обозначение	Рецептор	dLAE-MMAE(4)		vc-MMAE(4)		MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8)	
		№ (x10 ³) m12F3 Ab	IC ₅₀ /	жизнеспособность	IC ₅₀ /	жизнеспособность	IC ₅₀ /жизнеспособность	жизнеспособность
Her2	Шейка матки	745	17	47	18	41	7	2
H1651	Легкое	500	24	0	12	0	6	0
RMUGS	Яичник	400	79	76	27	72	25	54
MKN1	Желудок	374	12	27	9	25	8	13
COV644	Яичник	200	31	70	19	61	18	30
NUGC3	Желудок	191	39	17	26	10	5	11
CAOV3p1	Яичник	60	90	72	30	67	18	16
CasKi	Шейка матки	52	13	93	39	81	75	68
LoVo	Толстая кишка	50	6	33	5	27	4	13
647V	Мочевой пузырь	33	> 1000		286	79	82	88
ABC1	Легкое	31	3	83	> 1000		7	38
HCC15	Легкое	0	> 1000		> 1000		> 1000	

Сравнение цитотоксической активности конъюгатов антитело - лекарственный препарат для гуманизированных вариантов с использованием такой же нагрузки (mr-dLAE-MMAE) проводили путем построения графиков значений IC₅₀ для нескольких линий клеток. Гуманизированные варианты для антитела 12F3 демонстрировали сходную активность *in vitro*, как показано на Фиг. 10.

Антитело, обозначенное HGLF (вариабельная область тяжелой цепи, приведенная в SEQ ID NO:15 (vHG), и вариабельная область легкой цепи, приведенная в SEQ ID NO:30 (vLF)), было в конечном итоге выбрано как основное гуманизированное антитело к ALPP/ALPPL2 на основании его (i) характеристик связывания, (ii) способности доставлять лекарственный препарат и (iii) числа обратных мутаций по сравнению с другими

вариантами (смотрите таблицы 5-8).

Оценку HGLF ADC на сфероидных опухолевых раковых клеток проводили следующим образом: 100 мкл клеток при $2,5 \times 10^4$ клеток/лунка в круглодонных 96-луночных планшетах с ультра-низким присоединением (Corning, Corning, NY) в течение 48 ч при 37 °C. После инкубации добавляли 100 мкл среды, содержащей 2X ADC, и инкубировали в течение 120 ч при 37 °C. В некоторых случаях не связывающий антиген ADC включали в качестве отрицательного контроля. Жизнеспособность клеток для клеточных линий определяли, используя 3D Cell Titer Glo (Promega Corporation, Madison, WI) в соответствии с инструкциями производителя. Клетки инкубировали в течение 30 минут при комнатной температуре с реагентом 3D Cell Titer Glo и измеряли люминесценцию на планшет-ридере Envision (Perkin Elmer, Waltham, MA). Результаты представлены как IC50, концентрация соединения, необходимая для получения полумаксимального снижения жизнеспособности по сравнению с обработанными носителем клетками (контроль=100%). Как показано на Фиг. 11 и в таблице 11, h12F3 HGLF ADC, конъюгированные с линкерами на основе vcMMAE, mp-dLAE-MMAE и mdpr-gluc-MMAE, демонстрируют высокую цитотоксичность на 3D сфероидах с активностью, схожей с 2D культурами.

Таблица 11: Значения IC50 (нг/мл) для h12F3 HGLF ADC на 3D сфероидах опухолевых клеток

Линия клеток	vc-MMAE(4)	dLAE-MMAE(4)	MDpr-PEG(12)-gluc-MMAE
RMUGS	1,6	1,1	1,0
NCI-N87	19,4	19,8	22,9

Пример 5: Интернализация антитела

Эксперименты по интернализации проводили на линиях клеток RMUGS, родительской Hep2 и нокаутированной Hep2 ALPP посредством автоматической флуоресцентной микроскопии (IncuCyte S3, Essen Bioscience). Клетки высевали в 96-луночные обработанные для тканевого культивирования черные микропланшеты с плоским прозрачным дном (Corning, Corning, NY) и оставляли для присоединения на ночь при 37 °C. h12F3 HGLF и ненацеленное контрольное антитело метили красным реагентом для мечения антител IncuCyte FabFluor-pH Red (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI) в соответствии с протоколом производителя. Необходимые объемы исследуемого антитела, реагента, FabFluor и среды рассчитывали как 2x конечной аналитической концентрации, а реагент FabFluor добавляли к антителу в молярном соотношении 1:3. Антитело и FabFluor аккуратно смешивали и инкубировали при 37 °C в течение 15 минут с последующим добавлением комплекса антитело-FabFluor в каждую соответствующую лунку содержащего клетки планшета. Конечная концентрация h12F3 HGLF и несвязывающего контрольного антитела на лунку составляла 250 нг/мл. Планшеты размещали на микропланшетных кассетах в IncuCyte S3 (Essen Bioscience, Ann Arbor, MI) и получали сканы, используя протокол Adherent Cell-by-Cell. Получали фазовые данные и данные красного канала (время получения данных установлено на 400 мс) с 4 изображениями на

лунку, минимум каждые 0,5-2 часа и в течение до 20 часов с увеличением объектива 10х. Количественную оценку интенсивности флуоресцентного сигнала проводили, используя аналитический инструмент программного обеспечения IncuCyte. Затем анализ доводили и подстраивали под линию клеток, используя подсчет клеток без применения меток, ручной выбор изображения для предварительного просмотра и обучение алгоритма. После завершения анализа по данным строили графики, используя программное обеспечение IncuCyte с графическими показателями, настроенными на среднюю интенсивность красного цвета, усредненную по клетке и нормализованную относительно не связывающего контроля. Как показано на Фиг. 12, h12F3 HGLF интернализуется в ALPP-экспрессирующих клетках, и при этом интернализация является специфической, поскольку клетки HEP2 с нокаутом ALPP не интернализуют оголенное антитело.

Пример 6: Кинетика связывания и чувствительность к pH

Двухвалентную аффинность при pH 7,4, 37°C, измеряли посредством биослоевой интерферометрии (БСИ) на системе Octet Red 384 (ForteBio) с биосенсорами против Fab-SH1 человека второго поколения (FAB2G). Растворимые человеческие слитые димерные белки ALPP-Fc и ALPPL2-Fc получали в клетках CHO для применения в качестве аналита. Антитела, h12F3 HGLF и HFLD, иммобилизовали на биосенсорах при 3 мкг/мл в течение 600 секунд перед ассоциацией титрованных аналитов, hALPP и hALPPL2, при 6 концентрациях в диапазоне от 0,12 до 125 нМ в течение 600 секунд с последующим конечным 50-минутным этапом диссоциации в кинетическом буфере (1% казеина и 0,2% Твин 20 в 1х ФСБ, pH 7,4). После вычитания эталона кривой только для зонда проводили глобальную аппроксимацию данных 1:1 моделью с несопряженной Rmax с сенсором. При аппроксимации кривых для концентраций 31,3, 7,8, 1,95, 0,49 и 0,12 нМ измеренное двухвалентное связывание h12F3 HGLF с hALPP и hALPPL2 составило 1,3E-10 М (k_d 2,0E-05 1/с/ k_a 1,5E5 1/Мс) и 4,4E-11 М (k_d 7,1E-06 1/с/ k_a 1,6E5 1/Мс), соответственно. Вариант HFLD имел в 26,9 и 34 раза меньшую аффинность в отношении hALPP и hALPPL2, соответственно, по сравнению с HGLF, как показано на Фиг. 13).

Для оценки чувствительности к pH определяли двухвалентную аффинность при pH 6,0, 37°C, используя тот же метод БСИ, что и в эксперименте с pH 7,4. Единственной разницей было использование другого кинетического буфера (1% казеина и 0,2% Твин 20 в фосфатном цитрате, pH 6,0). При использовании 800-секундной диссоциации с аппроксимацией кривых для концентраций 125, 31,3, 7,8, 1,95, 0,49 и 0,12 нМ измеренное двухвалентное связывание с h12F3 HGLF to hALPP и hALPPL2 составило 6,8E-09 М (k_d 5,9E-04 1/с/ k_a 8,7E4 1/Мс) и 4,8E-9 М (k_d 4,3E-04 1/с/ k_a 8,9E4 1/Мс), соответственно. Как показано на Фиг. 14, это представляло 52-кратное снижение для hALPP Fc и 109-кратное снижение для hALPPL2 по сравнению с аффинностью при pH 7,4.

Пример 7: In Vivo противоопухолевая активность

Мышей NSG подкожно инокулировали 5×10^5 клеток CAOV3p1 или $2,5 \times 10^6$ клеток NCI-H1651. Бестимусных мышей подкожно инокулировали 1×10^7 клеток NCI-N87, 2×10^6 клеток RMUG-S, 1×10^7 клеток LoVo и 5×10^6 клеток HT-1376. Каждую мышь подкожно

инокулировали в правый бок в 0,1 мл ФСБ с матригелем (1:1) согласно указаниям производителя. Рост опухолевых клеток отслеживали с помощью штангенциркуля, а средний объем опухолей рассчитывали, используя формулу ($0,5 \times [\text{длина} \times \text{ширина}^2]$). Когда средний объем опухолей достигал приблизительно $100\text{-}200 \text{ мм}^3$, мышей случайным образом распределяли по разным когортам, включая условия без обработки или с внутрибрюшинным введением h12F3 HGLF или HFLD, конъюгированных с tr-dLAE-MMAE или vcMMAE, четыре раза каждые четыре дня (q4dx4) или три раза каждые 7 дней (q7dx3). Мышей умерщвляли, когда объем опухолей достигал приблизительно $800\text{-}1000 \text{ мм}^3$. ИРО определяли как $(1 - (\text{средний объем обработанных опухолей}) / (\text{средний объем контрольных опухолей})) \times 100\%$. Все процедуры с животными проводили согласно протоколу, одобренному Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию, в помещении, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных.

Измеренные объемы опухолей в динамике по времени для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 и 5 мг/кг h12F3 HGLF или HFLD-dLAE-MMAE, показаны на Фиг. 15 для модели опухоли яичника CAOV3. Измеренные объемы опухолей в динамике по времени для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 и 3 мг/кг h12F3 HGLF или HFLD-dLAE-MMAE, показаны на Фиг. 16 для модели опухоли желудка NCI-N87. Измеренные объемы опухолей в динамике по времени для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг h12F3 ADC, конъюгированных с vc-MMAE и dLAE-MMAE, показаны на Фиг. 17 для модели опухоли желудка NCI-N87. ALPP ADC демонстрируют сходную противоопухолевую активность *in vivo*.

Измеренные объемы опухолей в динамике по времени для необработанных мышей и мышей, обработанных 3 мг/кг h12F3 ADC, конъюгированных с vc-MMAE и dLAE-MMAE, показаны на Фиг. 18 для модели опухоли легкого NCI-H1651. ALPP ADC демонстрируют сходную противоопухолевую активность *in vivo*. Определенное в результате ингибирование роста опухолей в семи ксенотрансплантатных моделях показано на Фиг. 19. На гистограмме обобщены данные по % изменения объема опухолей в группах обработки по сравнению с контролем. Сравнение проводили при 3 мг/кг h12F3-HFLD ADC, конъюгированных с vc-MMAE и dLAE-MMAE. Средняя противоопухолевая активность несвязывающего контрольного ADC показана пунктирной линией.

В другой серии анализов мышей NSG подкожно инокулировали 5×10^5 CAOV3p1, мышей NSG подкожно инокулировали 5×10^6 SNU-2535, бестимусных мышей подкожно инокулировали 1×10^7 NCI-N87 и мышей SCID подкожно инокулировали 1×10^7 HPAC. Каждую мышь подкожно инокулировали в правый бок в 0,1 мл ФСБ с матригелем (1:1) согласно указаниям производителя. Рост опухолевых клеток отслеживали с помощью штангенциркуля, а средний объем опухолей рассчитывали, используя формулу ($0,5 \times [\text{длина} \times \text{ширина}^2]$). Когда средний объем опухолей достигал приблизительно $100\text{-}200 \text{ мм}^3$, мышей случайным образом распределяли по разным когортам, включая условия без обработки или с внутрибрюшинным введением h12F3 HGLF, конъюгированного с tr-

dLAE-MMAE или mc-vc-MMAE, четыре раза каждые 4 дня (q4dx4) или три раза каждые 7 дней (q7dx3). Мышей умерщвляли, когда объем опухоли достигал приблизительно 2-3000 мм³.% ИРО определяли как $(1 - (\text{средний объем обработанных опухолей})/(\text{средний объем контрольных опухолей})) \times 100\%$. Все процедуры с животными проводили согласно протоколу, одобренному Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию, в помещении, аккредитованном Ассоциацией по оценке и аккредитации условий содержания лабораторных животных.

Измеренные объемы опухолей в динамике по времени для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 или 3 мг/кг h12F3 ADC, конъюгированных с vc-MMAE и dLAE-MMAE, показаны на Фиг. 20 для модели опухоли желудка NCI-N87. ALPP ADC демонстрируют сходную противоопухолевую активность *in vivo*.

Измеренные объемы опухолей в динамике по времени для необработанных мышей и мышей, обработанных 1 или 3 мг/кг h12F3 ADC, конъюгированных с mc-vc-MMAE и mp-dLAE-MMAE, показаны на Фиг. 21 для модели опухоли поджелудочной железы HPAC. ALPP ADC демонстрируют сходную противоопухолевую активность *in vivo*. Определенное в результате ингибирование роста опухолей в четырех ксенотрансплантатных моделях показано на Фиг. 22. На гистограмме обобщены данные по проценту изменения объема опухолей в группах обработки по сравнению с контролем. Сравнение проводили при 3 мг/кг h12F3-HGLF ADC, конъюгированных с vc-MMAE и dLAE-MMAE. Средняя противоопухолевая активность несвязывающего контрольного ADC показана пунктирной линией.

В другом анализе исследовали противоопухолевую активность на двенадцати полученных от пациентов ксенотрансплантатах у бестимусных мышей, используя экспериментальный дизайн 2+2. Вкратце, когда опухоли у соответствующих исходных животных достигали 1,0-1,5 см³, опухоли вырезали для повторной имплантации животным для предварительного исследования. Животным для предварительного исследования имплантировали в один (левый) бок фрагменты опухолей, полученных от исходных животных. Имплантацию для каждого животного проводили из конкретной партии пассирования и документировали данные. Когда опухоли достигали среднего объема 150-300 мм³, животных распределяли в соответствии с объемом опухолей в группу обработки или контроля для введения, а введение начинали в день 0. Конъюгат h12F3-mc-vc-MMAE вводили при 5 мг/кг (QWx3) и сравнивали с обработанной ФСБ когортой. Объем опухолей измеряли дважды в неделю. Конечное измерение объема опухолей проводили в день завершения исследования. Начиная с дня 0, размеры опухолей измеряли дважды в неделю с помощью цифрового штангенциркуля, и для каждой группы записывали данные, включающие индивидуальный и средний оценочный объем опухолей (средний ОО ± СПС); объем опухолей рассчитывали, используя формулу (1): $ОО = \text{ширина}^2 \times \text{длина} \times 0,52$. На момент завершения исследования рассчитывали значения процента ингибирования роста опухолей (% ИРО) и представляли для каждой группы обработки (Т) в сравнении с контрольной (С), используя исходные (i) и конечные (f)

измерения опухолей по формуле (2): $\% \text{ IPO} = 1 - (\text{Tf-Ti}) / (\text{Cf-Ci})$. Как показано на Фиг. 23, конъюгат h12F3-mc-vc-MMAE SGN-ALPV демонстрирует противоопухолевую активность в 58% (7/12) моделях PDX с гетерогенной экспрессией мишени. Чувствительные модели демонстрировали IPO в диапазоне от 55% до > 100% при используемых дозах. Противоопухолевую активность наблюдали в моделях PDX как от предварительно обработанных химиотерапией, так и не обработанных пациентов (Фиг. 23, В и С).

Пример 8: Перекрестная реактивность и картирование эпитопов

Для подтверждения перекрестной реактивности с ортологичным белком ALPP ген ALPP macaca fascicularis (NHP ALPP) трансфицировали в клетки HEK293 и проводили скрининг антител методом проточной цитометрии. Вкратце, затем определяли K_D для каждого полученного антитела в анализе насыщения связывания. 1×10^5 клеток HEK293, стабильно экспрессирующих человеческой ALPPL или ALPPL2, а также NHP ALPP, на лунку аликвотировали в 96-луночные планшеты с v-образным дном. Антитела h12F3 HGLF и HFLD добавляли в концентрациях в диапазоне от 0,2 нМ до 20 нМ и инкубировали на льду в течение 60 минут. Клетки осаждали и промывали 3X ФСБ/БСА с последующим добавлением 10 мг/мл меченого APC козьего вторичного IgG-антитела против белков человека и инкубировали на льду еще в течение 60 минут. Клетки осаждали и промывали 3X ФСБ/БСА и ресуспендировали в 125 мкл ФСБ/БСА. Флуоресценцию анализировали методом проточной цитометрии, используя процент насыщенного флуоресцентного сигнала для определения процента связывания и последующего расчета кажущейся K_D . Кажущаяся K_D для обоих антител приведена на Фиг. 24. Важно, что хотя вариант антитела h12F3 HFLD демонстрировал резкое снижение аффинности в случае обезьяньего ортологичного гена, вариант HGLF демонстрировал сходный профиль связывания как с человеческими, так и с обезьяньими плацентарными щелочными фосфатазами.

Поскольку h12F3 HGLF перекрестно не реагирует с крысиным ортологом ALPP/ALPPL2, проводили обмен человеческих областей ALPP с гомологичными областями из крысиного ALPP. Эти конструкции временно трансфицировали в 2×10^6 клеток HEK293, используя липофектамин 3000 (соотношение ДНК/липофектамин 1:1,5), в соответствии с инструкциями производителя. Используя проточную цитометрию, как описано выше, оценивали связывание эпитопа h12F3 HGLF на клетках, экспрессирующих химерный крысиный/мышинный вариант ALPP, через 48 ч после трансфекции. Как показано на Фиг. 25, связывание h12F3 HGLF нарушается, когда области человеческого ALPP, содержащие ак L287-S339, замещены последовательностями крысиного ALPP.

Пример 9: Кинетика связывания антитела с Fc-рецепторами

Иммунные реакции с участием антител обусловлены взаимодействием с Fc-рецепторами на иммунных клетках. Таким образом, чтобы определить способность h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE взаимодействовать с Fc-рецепторами, оценивали кинетику связывания с hFcγRI, hFcγRIIa H131, hFcγRIIa R131, hFcγRIIa F158, hFcγRIIa V158 и hscFcRN методом биослоевой интерферометрии

(БСИ). Биотинилированные человеческие Fc-рецепторы с avi-тегом, слитые с мономерным Fc (разработанные и экспрессированные в Seagen), загружали на высокоточные стрептавидиновые биосенсоры (от ForteBio) до ответов около 0,4 нМ для всех рецепторов, за исключением hFcγRI с ответами около 1,2 нМ. Исходную базовую линию получали в буфере для иммобилизации (0,1% БСА, 0,02% Твин 20, 1x ФСБ, pH 7,4) с последующей второй базовой линией в кинетическом буфере (1% казеина, 0,2% Твин 20, 1x ФСБ, pH 7,4, для взаимодействий hFcγRI, IIa, IIIa и IIb и 1% БСА+0,2% Твин 20, фосфатный цитрат, pH 6,0, для взаимодействий hscFcRN). Ассоциацию и диссоциацию для титрованных образцов h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE, h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE и положительного контрольного mAb проводили следующим образом: 600 с и 1000 с для hFcγRI, 10 с и 50 с для hFcγRIIa и hFcγRIIb, 60 с и 200 с для hFcγRIIIa и 50 с и 200 с для hscFcRN в кинетическом буфере, соответственно. Сенсограммы создавали на системе Octet HTX (ForteBio) при 30 °C и проводили глобальную аппроксимацию кинетической изотермической 1:1 моделью Ленгмюра (без сопряжения Rmax) после вычитания эталона загруженного антигеном сенсора при 0 нМ аналита. Также были включены отрицательные контроли с наибольшей концентрацией антител и ADC (20 мкМ) без иммобилизованного Fc-рецептора для верификации отсутствия неспецифического связывания аналита с самими стрептавидиновыми биосенсорами. Приведены конкретные загрузочные концентрации и времена для каждого рецептора и стрептавидиновых сенсоров и концентрации титрованных аналитов (таблица 12 и таблица 13). В целом, родительское антитело и mc-vc-MMAE ADC связывают все человеческие Fc-рецепторы, как показано на Фиг. 26. Наибольшую аффинность наблюдали для hFcγRI в диапазоне около 1,3-2,2 нМ, тогда как следующую по величине аффинность наблюдали для hFcRN при приблизительно 10,6-13,9 нМ. Аффинность для вариантов hFcγRIIa и hFcγRIIIa находилась в диапазоне от 0,81 до 7,3 мкМ, а hFcγRIIb демонстрировал наименьшую аффинность в диапазоне от 36 до 67 мкМ. По сравнению с результатами для положительного контрольного mAb аффинность h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE и h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE в отношении всех человеческих Fc-рецепторов была очень сходной и сравнимой с родительским антителом h12F3 HGLF.

Таблица 12: Концентрации иммобилизации и времена на стрептавидиновых биосенсорах

hFcγI hmFc AAG A avi Biotin	(3,0 мкг/мл, 400 с нагрузка)
hFcγRIIa H131 hmFc AAG avi Biotin	(0,7 мкг/мл, 300 с нагрузка)
hFcγRIIa R131 hmFc AAG avi Biotin	(1,7 мкг/мл, 300 с нагрузка)
hFcγRIIIa F158 hmFc AAG avi Biotin	(4,0 мкг/мл, 300 с нагрузка)
hFcγRIIIa V158 hmFc AAG avi Biotin	(3,0 мкг/мл, 300 с нагрузка)
hFcγRIIb hmFc AAG avi Biotin	(2,0 мкг/мл, 300 с нагрузка)
hscFcRN hmFc IHH A avi Biotin	(7,0 мкг/мл, 300 с нагрузка)

Таблица 11: Концентрации аналитов

h12F3 ¹ и положительное контрольное mAb с hFcγRI	66,7, 22,2, 7,4, 2,47, 0,82, 0,27 нМ
h12F3 ¹ и положительное контрольное mAb с hFcγRIIa, IIIa и IIIb	20, 8,57, 3,67, 1,57, 0,67, 0,29, 0,12 мкМ
h12F3 ¹ и положительное контрольное mAb с hFcRN	500, 184,2, 67,9, 25, 9,21, 3,39, 1,25 нМ

1.- Те же концентрации использовали для конъюгатов на основе 12F3 HGLF, используя mc-vc-MMAE и mp-dLAE-MMAE

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ) первичными НК-клетками

Чтобы установить, вызывают ли остов h12F3 HGLF и полученные из него конъюгаты антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), ALPPL2-экспрессирующие клетки инкубировали с естественными клетками-киллерами (НК) в присутствии h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE *in vitro*. После инкубации измеряли процент лизиса клеток. Вкратце, получение эффекторных клеток: за день перед анализом мононуклеарные клетки периферической крови (МКПК) быстро размораживали в водяной бане при 37 °С. Клетки переносили в 50 мл пробирки, содержащие среду AIM-V (Gibco, кат. № 12055091), дополненную 5% термоинактивированной человеческой сывороткой (Gemini Bio-products, кат. № 100-512) (AIM-V/5% HHS). Клетки центрифугировали при 1500 об/мин в течение 10 минут. МКПК ресуспендировали в AIM-V/5% HHS, содержащей ДНКазу I (Sigma-Aldrich, кат. № D5025) в конечной концентрации 20 мкг/мл (1:50 разведение получено из 1 мг/мл исходного раствора), и инкубировали при 37 °С в течение 10-15 минут. Клетки осаждали путем центрифугирования и ресуспендировали в AIM-V/5% HHS. Клетки подсчитывали и высевали в колбы T150 в концентрации 2-4×10⁸ клеток/колба в 25 мл на колбу. Клетки инкубировали в покое в течение ночи при 37 °С, в увлажненном инкубаторе с 5% CO₂. На следующий день собирали не прикрепившиеся клетки и 3 раза интенсивно промывали колбы ФСБ (7 мл). Жидкость после промывки с не прикрепившимися клетками осаждали путем центрифугирования при 1500 об/мин в течение 7 минут. Клетки ресуспендировали в небольшом объеме для подсчета (2 мл), а клеточную суспензию доводили до концентрации 5×10⁷ клеток/мл в ФСБ+2% ФБС (согласно рекомендации протокола EasySep). НК-клетки выделяли посредством негативной селекции согласно инструкциям набора для обогащения человеческих НК-клеток EasySep (Stem Cell Technologies, кат. № 19055). Затем обогащенные эффекторные клетки суспендировали в RPMI/1% ФБС при концентрации 7,2×10⁵ клеток/мл (так, чтобы 70 мкл содержали ~5×10⁴ эффекторных клеток). Получение клеток-мишеней: ALPPL2-экспрессирующие клетки LoVo собирали и подсчитывали. После этого 5×10⁶ клеток удаляли и осаждали путем центрифугирования. Клетки ресуспендировали в 100 мкл ФБС. Затем к клеткам добавляли 100 мкл (приблизительно 100 мкКи) Cr-51 (Perkin Elmer Health Sciences, Inc., кат. № NEZ030S) и смешивали путем аккуратного постукивания. Клетки помещали в увлажненный инкубатор при 37 °С с 5% CO₂ для мечения в течение 1 часа и время от времени постукивали

пробирку для суспендирования клеток. Клетки 3 раза промывали RPMI/1% ФБС. Пробирку постукивали для разрыхления клеточного осадка между промывками. После промывок клетки ресуспендировали в 10 мл RPMI/1%ФБС и подсчитывали. Затем $7,2 \times 10^5$ клеток удаляли и суспендировали в общем объеме 10 мл аналитической среды так, чтобы 70 мкл было эквивалентным $\sim 5 \times 10^3$ целевым клеткам. Получение разведений ADC и антител и сборка планшета: антитела и ADC разводили в аналитической среде в концентрации 3х. Исследуемыми антителами были h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE, CD71-связывающее афукозилированное антитело и изотипический контроль. Антитела добавляли в аналитический планшет непосредственно перед добавлением Cr-меченных клеток-мишеней. Кроме того, в контрольные лунки вместо антител добавляли 70 мкл и 140 мкл аналитической среды, что представляло контроль общего и спонтанного высвобождения, соответственно. И наконец, клетки-мишени смешивали и добавляли по 70 мкл в каждую исследуемую и контрольную лунку 96-луночного планшета. Мишени инкубировали с mAb в увлажненном инкубаторе при 37 °С с 5% CO₂ в течение 30 минут. Затем в каждую исследуемую лунку добавляли по 70 мкл (5×10^4) эффекторных клеток, тогда как в лунки общего высвобождения добавляли по 70 мкл 3% Тритон X-100 и смешивали. Планшет помещали обратно в увлажненный инкубатор при 37 °С с 5% CO₂ на 4 часа. После инкубации 35 мкл супернатанта переносили в планшеты Luma. Планшеты Luma сушили в течение ночи, затем покрывали герметизирующей пленкой и считывали на микропланшетном сцинтилляционном счетчике Perkin Elmer TopCount NXT. Анализ проводили путем расчета % специфического лизиса следующим образом (анализ проводили с помощью GraphPad Prism): % специфического лизиса = [(исследуемое соед. - фоновое соед.) ÷ (общее соед. - фоновое соед.)] X 100. Как показано на Фиг. 27, в присутствии антитела h12F3 HGLF, а также h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE и h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE, опосредуется NK-клеточная цитотоксичность *in vitro*. Эта активность является сходной с положительным контролем и опосредуется присутствием мишени на клетках, поскольку несвязывающее антитело не стимулировало эффекторные клетки.

Антителозависимая клеточная цитотоксичность

Чтобы определить, демонстрируют ли h12F3 HGLF, h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE АЗКЦ-активность, покрытые антителами или ADC флуоресцентные клетки, экспрессирующие ALPP/ALPPL2, совместно инкубировали с первичными макрофагами и измеряли фагоцитоз методом флуоресцентной проточной цитометрии. Вкратце, опухолевые клетки LoVo метили флуоресцентной меткой РКН26 в соответствии с инструкциями производителя. Клетки собирали из культуральной планшета с 0,05% трипсина ЭДТА и один раз промывали в 1х ФБС. Клетки ресуспендировали в 1 мл разбавителя С, включенного в набор для красного флуоресцентного мечения клеточной мембраны РКН26 (Sigma-Aldrich, кат. № РКН26GL-1КТ). В отдельную пробирку добавляли 1 мл разбавителя С+4 мкл красителя РКН26 и перемешивали с помощью пипетки. Окрашивающий раствор переносили в

ресуспендированные клетки и несколько раз быстро смешивали с помощью пипетки. Клетки инкубировали при комнатной температуре в течение 5 минут и останавливали реакцию мечения путем добавления 2 мл ФБС. Клетки промывали 3x RPMI/10% ФБС и ресуспендировали в ФБС в концентрации $0,8 \times 10^6$ клеток/мл. Меченные клетки-мишени переносили в 96-луночный планшет с U-образным дном и обрабатывали исследуемым антителом, ADC или изотипическим контрольным антителом, используя следующие этапы. В отдельном 96-луночном планшете с U-образным дном 10x исходные растворы mAb, ADC и изотипического контроля ФБС серийно разводили 1:10 в ФБС и добавляли по 33 мкл/лунка в соответствующие лунки в планшете с U-образным дном. Планшет инкубировали при комнатной температуре в течение 30 минут, центрифугировали и один раз промывали 200 мкл/лунка среды (RPMI/10% ФБС). Клетки ресуспендировали в 330 мкл/лунка среды (RPMI/10% ФБС). За день до анализа МКПК от 2 здоровых доноров размораживали при 37 °C в водяной бане и переносили в RPMI/10% ФБС (0,1-0,2 ЕЭ/мл). Всего в 48-луночные планшеты с плоским дном добавляли $0,7 \times 10^6$ МКПК на лунку и оставляли на ночь для прикрепления. Старую среду (и не прикрепившиеся клетки) аспирировали и замещали 200 мкл свежей среды. После этого 100 мкл меченных, обработанных клеток-мишеней из каждой лунки переносили в соответствующие лунки плоскодонного планшета с прикрепленными моноцитами/макрофагами в трех повторах и инкубировали планшет при 37 °C в течение ночи на протяжении 16-18 часов. Все клетки в 48-луночном планшете собирали путем сбора супернатантов, сбор промывали 1x ФБС и проводили отсоединение с помощью 1x Versene. Макрофаги флуоресцентно метили, используя следующие этапы: клетки-мишени и макрофаги собирали в планшеты с U-образным дном, центрифугировали, ресуспендировали в 50 мкл окрашивающего буфера FACS, содержащего агент, блокирующий человеческий Fc-фрагмент (разведение 1:20), и инкубировали на льду в течение 30 минут. После этого в каждую лунку добавляли 50 мкл 1:50 разведения антител CD14-BV421 и CD45-APC-Cy7 в окрашивающем буфере FACS и инкубировали на льду в фольге в течение 30 минут. Клетки центрифугировали, промывали 2x буфером FACS и ресуспендировали в 1x ФБС для последующего анализа методом проточной цитометрии на проточном цитометре Attune NxT. Среднее геометрическое значение флуоресценции YL1 CD14+/CD45 клеток (СИФ CD14+/CD45+ клеток) анализировали, используя FlowJo, а затем эти значения экспортировали в Excel и в GraphPad Prism для дальнейшего анализа данных. Фагоцитоз представлен как СИФ CD14+ клеток. Как показано на Фиг. 28, присутствие h12F3 HGLF, конъюгатов h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE или h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE обеспечивает возможность фагоцитоза экспрессирующей мишенью клеток с кинетикой, сходной с положительным контролем (антитело к CD47). Эта активность зависит от наличия экспрессии ALPPL2 на клетках-мишенях, поскольку несвязывающее антитело не вызывает какую-либо гибель клеток.

В другом анализе измеряли FcgRIII-зависимую антителозависимую клеточную цитотоксичность (АЗКЦ), используя суррогатные биоанализ на основе люциферазы от Promega. Вкратце, ALPP/ALPPL2-экспрессирующие клетки высевали в 96-луночные

планшеты и совместно культивировали с эффекторными клетками для биоанализа АЗКЦ (Promega) в присутствии возрастающих количеств оголенного антитела h12F3 или антитела h12F3 HGLF, конъюгированного с 4 или 8 молекулами mc-vc-РАВС-ММАЕ или MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ, соответственно. Через 24 ч после обработки клетки инкубировали с Bio-Glo (Promega) в соответствии с инструкциями производителя и измеряли люминесценцию с помощью платформы Envision. Как показано на Фиг. 29, h12F3 HGLF способно активировать сигнализацию FcγRIII в репортерной линии клеток с кинетикой, сходной с h12F3 HGLF ADC, конъюгированным с mc-vc-РАВС-ММАЕ. Конъюгация с 8 молекулами MDpr-PEG(12)-gluc-ММАЕ снижала АЗКЦ-активность по сравнению с h12F3 HGLF.

Пример 10: Иммуногенная гибель клеток

Активация пути сигнала для иммуногенной гибели клеток

Чтобы определить, могут ли h12F3 HGLF-mc-vc-ММАЕ и h12F3 HGLF-mp-dLAE-ММАЕ активировать маркеры ИГК, ALPP/ALPPL2-экспрессирующие клетки обрабатывали ADC и использовали иммуноблоттинг для определения статуса фосфорилирования путей IRE и JNK. Вкратце, четыре миллиона клеток LOVO высевали в 10 см ТС-обработанные планшеты в 10 мл полной среды для роста (среда Хэма F-12К (Кайна) + 10% ФБС) и оставляли на ночь для прикрепления. Клетки обрабатывали 10 нМ ММАЕ или 1 и 10 мкг/мл h12F3 HGLF-mc-vc-ММАЕ или h12F3 HGLF-mp-dLAE-ММАЕ в полной среде. Затем клетки инкубировали в их обработанной среде в течение 48 или 96 часов. Клетки собирали, промывали и ресуспендировали в 500 мкл холодного ФСБ и переносили в пробирки Эппендорфа. Образцы центрифугировали при 300xg в течение 3 минут при 4 градусах. Супернатанты удаляли и ресуспендировали клетки в лизисном буфере RIPA, содержащем протеазы и фосфатазы. После инкубации в течение 5 мин на льду образцы центрифугировали при 17000xg в течение 10 минут при 4 градусах, а супернатанты собирали и хранили при -80. Количественно определенные образцы разделяли в 4-12% бис-трис гелях NuPAGE и анализировали в подвижном буфере MES для меньших белков или в MOPS для более крупных белков (165 В в течение 40 минут). Гели переносили на ПВДФ мембраны, используя iBlot2 (20 В в течение 7 минут). Мембраны быстро промывали в ДИ воде, а затем помещали в блокирующий буфер (ТБС+0,1% твин-20+5% БСА) на ночь при 4 градусах. Затем блоты инкубировали с первичными антителами к IRE, JNK, p-IRE или p-JNK при разведении 1:1000 в блокирующем буфере в течение 2 часов при комнатной температуре. p-ERK использовали при 1:500 и инкубировали таким же образом. Блоты промывали 3x ТБСТ (ТБС+0,1% Твин-20). Вторичное, конъюгированное с пероксидазой, антитело к кроличьим белкам готовили в разведении 1:10000 в блокирующем буфере. Блоты инкубировали со вторичным антителом в течение 1 часа при комнатной температуре. Блоты снова промывали 3x ТБСТ. Блоты проявляли, используя SignalFire ECL и визуализировали на Amersham Imager 600. Затем блоты снимали и повторно зондировали в отношении GAPDH в качестве загрузочного контроля и проводили блоттинг, как описано выше. Как

показано на Фиг. 30, инкубация клеток LoVo с h12F3 HGLF-*mc-vc*-MMAE или h12F3 HGLF-*mp-dLAE*-MMAE повышала уровни фосфорилирования pIRE и pJNK, которые играют ключевую роль в активации процесса иммуногенной гибели клеток.

Чтобы определить, приводит ли обработка h12F3 HGLF ADC к высвобождению АТФ в культуральную среду, 600000 клеток LOVO высевали в 6-луночные ТС-обработанные планшеты в 2 мл полной среды для роста (среда Хэма F-12К (Кайна) + 10% ФБС) и оставляли на ночь для прикрепления. 10 нМ растворы MMAE, 1 или 10 мкг/мл h12F3 HGLF *mp-dLAE*-MMAE или *mc-vc*-MMAE готовили в полной среде. Затем клетки инкубировали в их обработанной среде в течение 24, 48 или 72 часов. В каждый конечный момент времени из каждой лунки отбирали по 500 мкл супернатанта (образец). Супернатанты центрифугировали при 200xg в течение 1 минуты при 4 градусах, чтобы аккуратно удалить любой клеточный дебрис. Затем 3 50 мкл аликвоты (для данных в трех повторах) каждого супернатанта помещали в 96-луночный планшет с черными стенками и прозрачным дном. Затем во все лунки, содержащие супернатанты, добавляли по 50 мкл восстановленного Cell Titer Glo. Планшет покрывали и защищали от света. Затем планшет считывали на планшет-ридере Envision. Исходные данные люминесценции из данных в трех повторах усредняли для всех образцов. Чтобы определить кратность изменения по сравнению с необработанными образцами, среднюю люминесценцию для экспериментальных образцов делили на среднее значение для необработанных образцов. Как показано на Фиг. 31, оба конъюгата h12F3 HGLF, *mp-dLAE*-MMAE или *mc-vc*-MMAE, приводили к высвобождению АТФ, маркера иммуногенной гибели клеток.

Пример 11: Фармакокинетика

Проводили оценку фармакокинетики гуманизированных h12F3 ADC у отличных от человека приматов. Конъюгаты антитело-лекарственный препарат, включая h12F3 HGLF-*vc*-MMAE(4) и HGLF-*dLAE*-MMAE(4), вводили один раз в дозе 1 мг/кг и брали образцы плазмы в указанные моменты времени. Общие уровни h12F3 HGLF-*vc*-MMAE(4) и HGLF-*dLAE*-MMAE(4) в плазме яванских макаков анализировали, используя 1-этапный анализ на общие антитела (gTAb) Gyrolab (Gyros Protein Technologies, Sweden). Вкратце, аналитические стандарты и образцы контроля качества (КК) готовили с вводимым исследуемым препаратом, разведенным в объединенной плазме яванского макака K2EDTA (BioIVT). Исследуемые образцы с концентрациями исследуемого препарата за пределами количественного обнаружения анализа разводили в диапазоне с плазмой яванского макака K2EDTA, не обработанной препаратом. Стандарты, КК и исследуемые образцы разводили до минимального необходимого разведения (МНР) 1:20 в буфере Rexxip HX (Gyros Protein Technologies, Sweden). 30 нМ эквимоллярный раствор мастер-микса готовили путем разведения биотинилированной легкой цепи каппа к белкам человека (Seagen) и меченного AlexaFluor-647 антитела к Fc γ человека (Jackson Immunoresearch) в 1x фосфатно-солевом буфере, содержащем 0,01% (об./об.) твин-20 (ФСБТ). Смешивали эквивалентные объемы стандартов МНР, КК или исследуемых образцов и мастер-микса. Полученный раствор инкубировали с защитой от света со

встряхиванием в течение 1-2 часов при комнатной температуре. После инкубации раствор переносили в 96-луночный ПЦР-планшет и добавляли к Gyrolab Bioaffy 1000 CD (Gyros Protein Technologies, Sweden), в котором образец проводили через стрептавидиновую аффинную колонку в CD. Колонки промывали 4х ФСБТ и определяли связанную флуоресценцию на колонке на 635 нм. Флуоресцентный ответ калибраторов аппроксимировали 5-параметрической логистической регрессией (5-PL), используя программное обеспечение Gyrolab Evaluator. Общие концентрации h12F3 HGLF-vcMMAE и HGLF-dLAE-MMAE КК и исследуемого образца интерполировали из соответствующей аппроксимированной стандартной кривой, используемой для оценки фармакокинетики. ФК параметры определяли, используя Phoenix WinNonlin (версия 8.2, Certara USA, Inc.) с помощью некомпартментного анализа (НКА), соответствующим образом. Определяли следующие ФК параметры: площадь под кривой плазменная концентрация - время до 21 дня (ППК₀₋₂₁), максимальная наблюдаемая плазменная концентрация (C_{max}), терминальное время полужизни, клиренс (Cl), и рассчитывали объем распределения в равновесном состоянии (V_{ss}). ППК рассчитывали, используя линейный метод трапеций. Времена полужизни, Cl и V_{ss} были представлены для профилей плазменная концентрация - время, которые имели скорректированное значение R² ≥ 0,8 и экстраполированную ППК_{0-беск.} < 20%. Полученные фармакокинетические параметры, приведенные в таблице 14, показывают, что конъюгаты h12F3 HGLF как с vcMMAE, так и с mp-dLAE-MMAE демонстрируют сходные фармакокинетические профили конъюгированного с антителом MMAE с отсутствием признаков опосредованного мишенью распределения препарата по сравнению с несвязывающим контрольным ADC.

Таблица 14

Антитело	нагрузка	ППК _{0-21д} /доза (день*кг*мкг/мл/мг)	C _{max} /доза (кг*мкг/мл/мг)	Время полужизни (день)
h12F3 HGLF	vc-MMAE(4)	97,81	30,27	9,11
	dLAE-MMAE(4)	109,87	29,86	NR
Несвязывающий IgG1	vc-MMAE(4)	91,88	24,14	8,00
	dLAE-MMAE(4)	91,33	31,18	6,83

Для количественного определения конъюгированного с антителом MMAE (acMMAE) образцы плазмы сначала подвергали иммунозахвату для выделения ADC (MAbSelect, GE Healthcare) в течение одного часа при 2-8 °C. Связанные образцы промывали, используя буфер для расщепления папаином (20 мМ КРО₄, 10 мМ ЭДТА, 20 мМ цистеина-HCl), а затем в каждый образец добавляли 2 мг/мл папаина в буфере для расщепления. Образцы инкубировали при 37 °C в течение четырех часов для ферментативного высвобождения acMMAE. Высвобожденный в результате acMMAE экстрагировали, используя твердофазную экстракцию. Затем каждый образец анализировали, используя нормально-фазовую УВЭЖХ (Betasil, ThermoFisher) в сочетании с тандемной масс-спектрометрией (Sciex 6500+ Triple Quad). В таблице 15

приведены сходные фармакокинетические параметры для конъюгированного с антителом MMAE с использованием конъюгатов h12F3 HGLF vc-MMAE и HGLF-dLAE-MMAE, при этом последний демонстрировал большее время полужизни.

Таблица 15

Антитело	нагрузка	ППК _{0-21д} /доза (день*кг*мкг/мл/мг)	С _{max} /доза (кг*мкг/мл/мг)	Время полужизни (день)
h12F3 HGLF	vc-MMAE(4)	49,19	30,67	4,47
	dLAE-MMAE(4)	47,97	29,50	8,39

Переносимость h12F3 HGLF ADCs оценивали у яванских макаков как фармакологически релевантного вида со сравнимой аффинностью связывания с ортологами ALPP человека и яванского макака. Самкам обезьян вводили h12F3 HGLF-vc-MMAE(4) в дозе 5 мг/кг или h12F3 HGLF-dLAE-MMAE(4) в дозе 5, 8, 9 и 10 мг/кг, соответственно, один раз в неделю в течение четырех недель (q1wx4). Токсикологические оценки включали массу тела, клинические наблюдения, гематологию, коагуляцию, химию сыворотки и ТК. После терминального (1 неделя после последней дозы) и восстановительного (4 недели после последней дозы) вскрытия проводили большое патологическое исследование и гистопатологическое изучение тканей. Максимальная переносимая доза для h12F3 HGLF-vc-MMAE(4) составляла 5 мг/кг, а для h12F3 HGLF-dLAE-MMAE(4) она составляла 9 мг/кг (таблица 16). Токсичность для костного мозга в соответствии с фармакологией MMAE определяли для обоих ADC посредством гематологии и анатомической патологической оценки и считали дозолимитирующей токсичностью. Дополнительная токсичность проявлялась как накопление альвеолярных макрофагов в легких, снижение числа вторичных и третичных фолликулов в яичниках и лимфоидное истощение в тимусе

Таблица 16

Исследуемый препарат	МЕД (мг/кг)	Дозолимитирующая токсичность
h12F3 HGLF-mp-dLAE-MMAE (4)	9 (q1wx4)	Костный мозг
h12F3 HGLF-mc-vc-MMAE (4)	5 (q1wx4)	Костный мозг

Включение посредством ссылки

Все ссылки, цитируемые в данном документе, включая патенты, заявки на патенты, научные статьи, пособия и т. п., в полном объеме включены в данный документ посредством ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент, который связывает ALPP и/или ALPPL2, при этом антигенсвязывающий белок или его фрагмент содержит следующие 6 CDR:

CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60;

CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61;

CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58 или SEQ ID NO: 62;

CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63 или SEQ ID NO: 68;

CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64 или SEQ ID NO: 69; и

CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65 или SEQ ID NO: 70;

при этом CDR определены по Kabat или IMGT.

2. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по п. 1, содержащий CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 56; CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 57; CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 58; CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 63, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 64, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 65; при этом CDR определены по Kabat.

3. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по п. 1, содержащий CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 60; CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 61; CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 62; CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 68, CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 69, и CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 70; при этом CDR определены по IMGT.

4. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-3, который содержит VH и VL, причем VH имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15, и при этом VL имеет по меньшей мере 80%, 85%, 90%, 95% или 99% идентичности аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 30.

5. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-4, который содержит VH и VL, при этом VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID

NO: 15.

6. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-4, который содержит VH и VL, при этом VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

7. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-6, который содержит VH и VL, при этом VH содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15 и VL содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30.

8. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-7, содержащий тяжелую цепь (HC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40.

9. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-7, содержащий легкую цепь (LC), содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

10. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-9, содержащий HC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40, и содержащий LC, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 50.

11. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-10, причем антигенсвязывающий белок представляет собой моноклональное антитело или его фрагмент.

12. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-11, причем антигенсвязывающий белок представляет собой гуманизованное антитело или его фрагмент.

13. Антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-12, причем фрагмент выбран из фрагмента Fab, Fab', Fv, scFv или (Fab')₂.

14. Конъюгат антитело-лекарственный препарат, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13, конъюгированные с цитотоксическим или цитостатическим агентом.

15. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 14, отличающийся тем, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с цитотоксическим или цитостатическим агентом посредством линкера.

16. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 14-15, отличающийся тем, что цитотоксический или цитостатический агент представляет собой монометилауристатин.

17. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 14-16, отличающийся тем, что монометилауристатин представляет собой монометилауристатин E (MMAE).

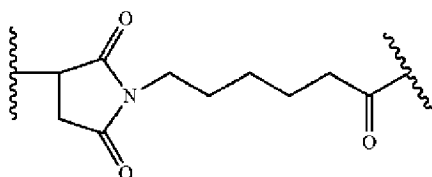
18. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 17, отличающийся тем, что антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с MMAE посредством расщепляемого ферментом линкерного звена.

19. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 18, отличающийся тем, что расщепляемое ферментом линкерное звено содержит линкер Val-Cit.

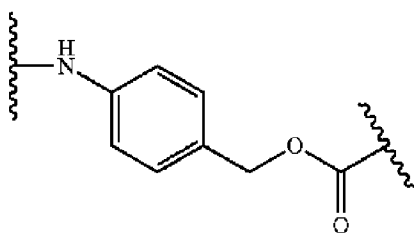
20. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 19, отличающийся тем, что

антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгированы с ММАЕ посредством линкерного звена, которое имеет формулу: $-A_a-W_w-Y_y-$; где $-A-$ представляет собой звено растяжения, а равен 0 или 1; $-W-$ представляет собой аминокислотное звено, w представляет собой целое число в диапазоне от 0 до 12; и $-Y-$ представляет собой спейсерное звено, y равен 0, 1 или 2.

21. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 20, отличающийся тем, что звено растяжения имеет структуру по формуле I ниже; при этом аминокислотное звено представляет собой Val-Cit; и при этом спейсерное звено представляет собой группу p -аминобензилового спирта (РАВС), имеющую структуру по формуле II ниже;

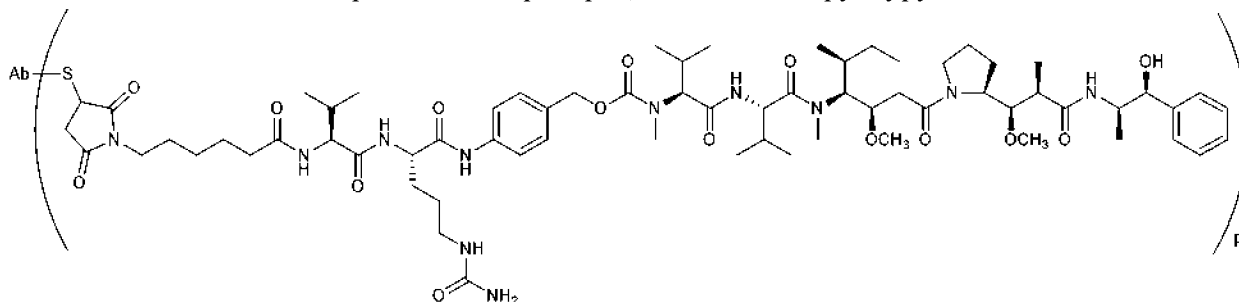


Формула I;



Формула II.

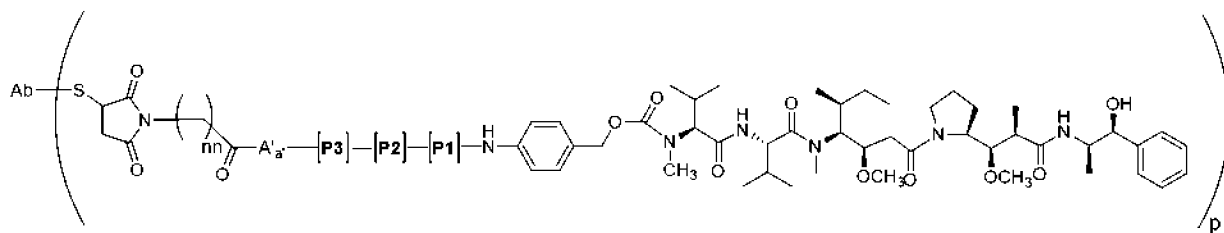
22. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 14-21, отличающийся тем, что линкер присоединен к монометилауристатину E с образованием конъюгата антитело-лекарственный препарат, имеющего структуру:



где Ab представляет собой антитело h12F3, а p обозначает число от 1 до 16.

23. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 22, отличающийся тем, что среднее значение p в популяции конъюгатов антитело-лекарственный препарат составляет около 4.

24. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 14-18, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственный препарат представлен структурой:



или ее фармацевтически приемлемой солью, где:

Ab представляет собой антитело h12F3, а p обозначает число от 1 до 12;

нижний индекс nn представляет собой число от 1 до 5;

нижний индекс a' равен 0 и A' отсутствует;

каждый из P1, P2 и P3 представляет собой аминокислоту, при этом:

первая из аминокислот P1, P2 или P3 является отрицательно заряженной;

вторая из аминокислот P1, P2 или P3 имеет алифатическую боковую цепь с гидрофобностью не более чем у лейцина; и

третья из аминокислот P1, P2 или P3 имеет гидрофобность ниже чем у лейцина,

при этом первая из аминокислот P1, P2 или P3 соответствует любой из P1, P2 или P3, вторая из аминокислот P1, P2 или P3 соответствует одной из двух оставшихся аминокислот P1, P2 или P3, а третья из аминокислот P1, P2 или P3 соответствует последней оставшейся из аминокислот P1, P2 или P3,

при условии, что -P3-P2-P1- не представляет собой -Glu-Val-Cit- или -Asp-Val-Cit-.

25. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 24, где нижний индекс nn равен 2.

26. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 24 или п. 25, отличающийся тем, что:

аминокислота P3 трипептида находится в D-аминокислотной конфигурации;

одна из аминокислот P2 и P1 имеет алифатическую боковую цепь с гидрофобностью ниже чем у лейцина; и

другая из аминокислот P2 и P1 является отрицательно заряженной.

27. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 24-26, отличающийся тем, что аминокислота P3 представляет собой D-Leu или D-Ala.

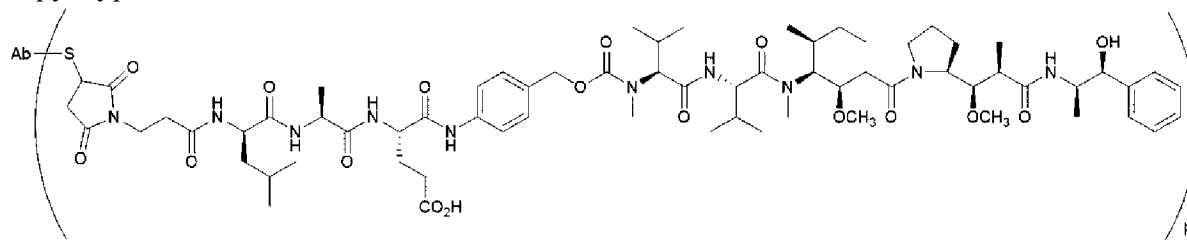
28. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 24-27, отличающийся тем, что аминокислота P3 представляет собой D-Leu или D-Ala, аминокислота P2 представляет собой Ala, Glu или Asp и аминокислота P1 представляет собой Ala, Glu или Asp.

29. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 24-28, отличающийся тем, что -P3-P2-P1- представляет собой -D-Leu-Ala-Asp-, -D-Leu-Ala-Glu-, -D-Ala-Ala-Asp- или -D-Ala-Ala-Glu-.

30. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 24-29, отличающийся тем, что -P3-P2-P1- представляет собой -D-Leu-Ala-Glu-.

31. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 24-30, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственный препарат представлен

структурой:



или ее фармацевтически приемлемой солью,

где Ab представляет собой антитело h12F3, а p обозначает число от 1 до 12.

32. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-13.

33. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 32.

34. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п. 33.

35. Клетка-хозяин по п. 34, отличающаяся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

36. Клетка-хозяин, которая вырабатывает антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-13.

37. Способ получения антигенсвязывающего белка или его фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 36 в условиях, подходящих для получения антигенсвязывающего белка.

38. Способ по п. 37, дополнительно включающий выделение антигенсвязывающего белка или фрагмента, выработанного клеткой-хозяином.

39. Способ по п. 37 или п. 38, отличающийся тем, что клетка-хозяин представляет собой клетку СНО.

40. Антигенсвязывающий белок или его фрагмент, полученный способом по любому из пп. 37-39.

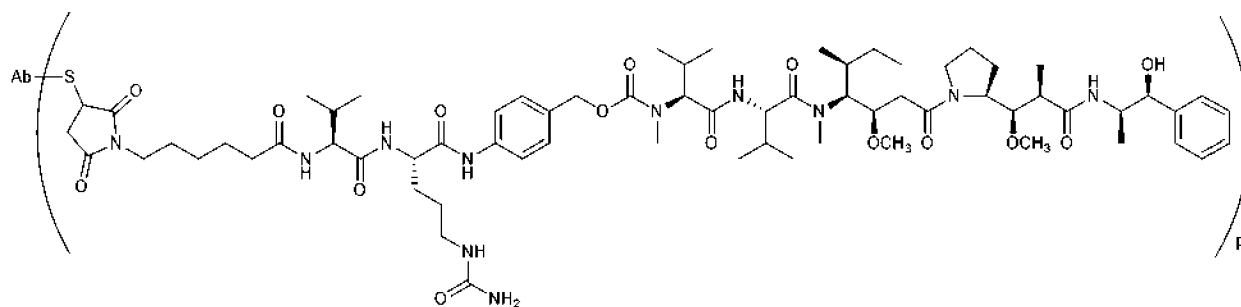
41. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок или фрагмент по любому из пп. 1-31 или п. 40 и фармацевтически приемлемый носитель.

42. Способ лечения ALPP и/или ALPPL2-экспрессирующего рака у индивида, включающий введение нуждающемуся в этом индивиду эффективного количества антигенсвязывающего белка или фрагмента по любому из пп. 1-31 или п. 40 или фармацевтической композиции по п. 41.

43. Способ по п. 42, отличающийся тем, что рак представляет собой рак яичника, рак легкого, рак эндометрия, рак мочевого пузыря, рак желудка или рак яичка.

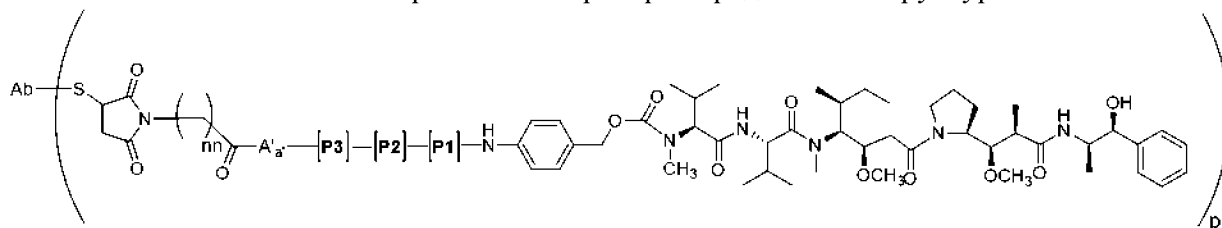
44. Способ по п. 43, отличающийся тем, что рак представляет собой рак яичника.

45. Конъюгат антитело-лекарственный препарат, содержащий выделенное антитело к ALPP/ALPPL2, конъюгированное с mc-vc-PAVC-MMAE, причем антитело имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и при этом конъюгат антитело-лекарственный препарат имеет структуру:



где Ab представляет собой антитело, а p обозначает число от 1 до 16.

46. Конъюгат антитело-лекарственный препарат, содержащий антигенсвязывающий белок или его фрагмент, который связывает ALPP и ALPPL2, при этом конъюгат антитело-лекарственный препарат представлен структурой:



или ее фармацевтически приемлемой солью, где:

Ab представляет собой антитело к ALPP/ALPPL2, а p обозначает число от 1 до 12;

нижний индекс nn представляет собой число от 1 до 5;

нижний индекс a' равен 0 и A' отсутствует;

каждый из P1, P2 и P3 представляет собой аминокислоту, при этом:

первая из аминокислот P1, P2 или P3 является отрицательно заряженной;

вторая из аминокислот P1, P2 или P3 имеет алифатическую боковую цепь с гидрофобностью не более чем у лейцина; и

третья из аминокислот P1, P2 или P3 имеет гидрофобность ниже чем у лейцина,

при этом первая из аминокислот P1, P2 или P3 соответствует любой из P1, P2 или P3, вторая из аминокислот P1, P2 или P3 соответствует одной из двух оставшихся аминокислот P1, P2 или P3, а третья из аминокислот P1, P2 или P3 соответствует последней оставшейся из аминокислот P1, P2 или P3,

при условии, что -P3-P2-P1- не представляет собой -Glu-Val-Cit- или -Asp-Val-Cit-.

47. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 46, где нижний индекс nn равен 2.

48. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по п. 46 или п. 47, отличающийся тем, что:

аминокислота P3 трипептида находится в D-аминокислотной конфигурации;

одна из аминокислот P2 и P1 имеет алифатическую боковую цепь с гидрофобностью ниже чем у лейцина; и

другая из аминокислот P2 и P1 является отрицательно заряженной.

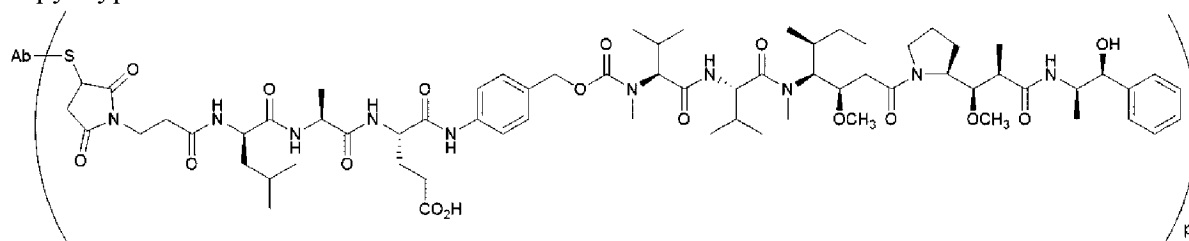
49. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 46-48, отличающийся тем, что аминокислота P3 представляет собой D-Leu или D-Ala.

50. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 46-49, отличающийся тем, что аминокислота P3 представляет собой D-Leu или D-Ala, аминокислота P2 представляет собой Ala, Glu или Asp и аминокислота P1 представляет собой Ala, Glu или Asp.

51. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 46-50, отличающийся тем, что -P3-P2-P1- представляет собой -D-Leu-Ala-Asp-, -D-Leu-Ala-Glu-, -D-Ala-Ala-Asp- или -D-Ala-Ala-Glu-.

52. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 46-51, отличающийся тем, что -P3-P2-P1- представляет собой -D-Leu-Ala-Glu-.

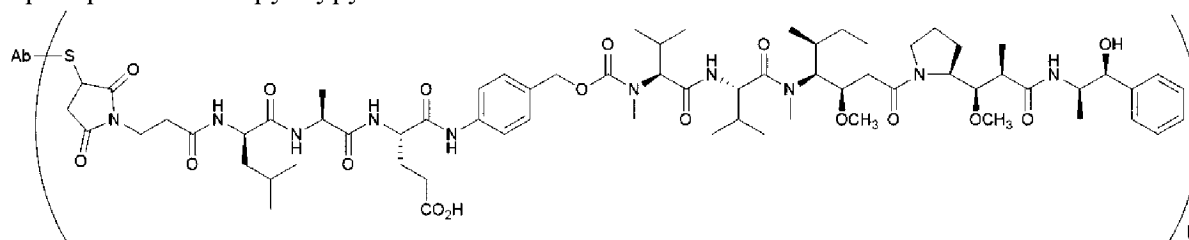
53. Конъюгат антитело-лекарственный препарат по любому из пп. 46-52, отличающийся тем, что конъюгат антитело-лекарственный препарат представлен структурой:



или ее фармацевтически приемлемой солью,

где Ab представляет собой антитело к ALPP/ALPPL2, а p обозначает число от 1 до 12.

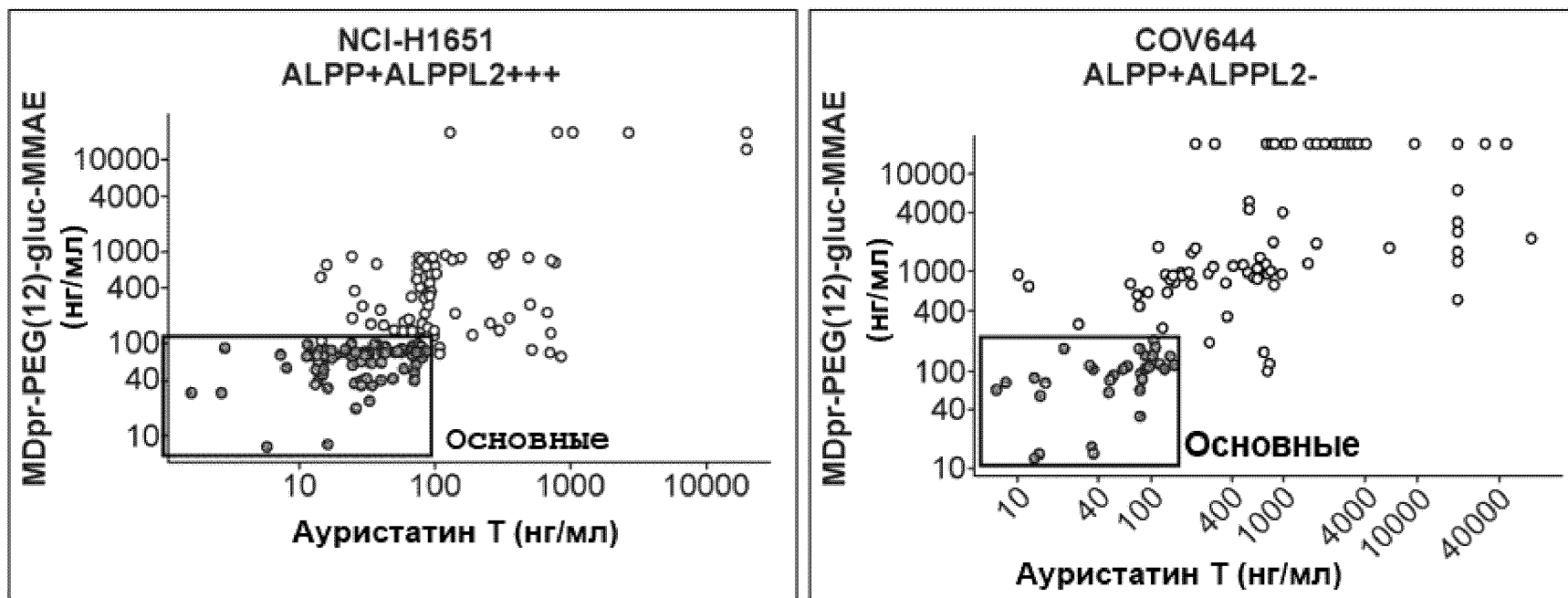
54. Конъюгат антитело-лекарственный препарат, содержащий выделенное антитело к ALPP/ALPPL2, конъюгированное с mp-dLAE-PAVC-MMAE, при этом антитело имеет переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 15, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и при этом конъюгат антитело-лекарственный препарат имеет структуру:



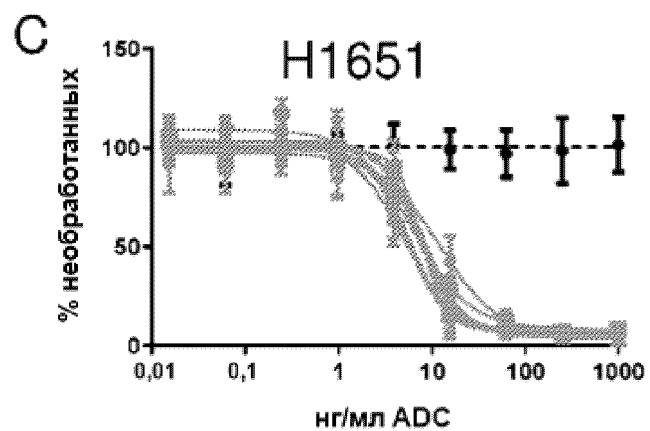
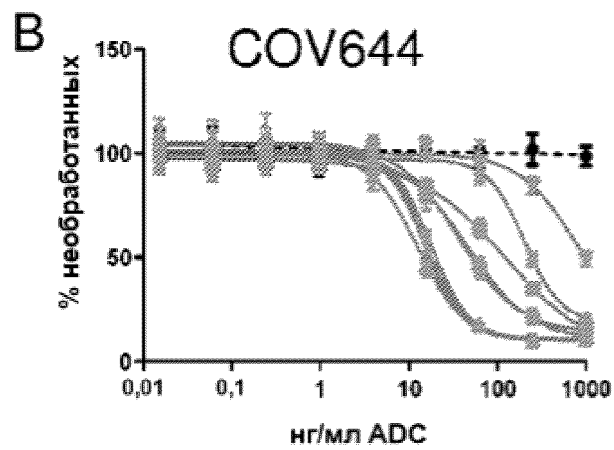
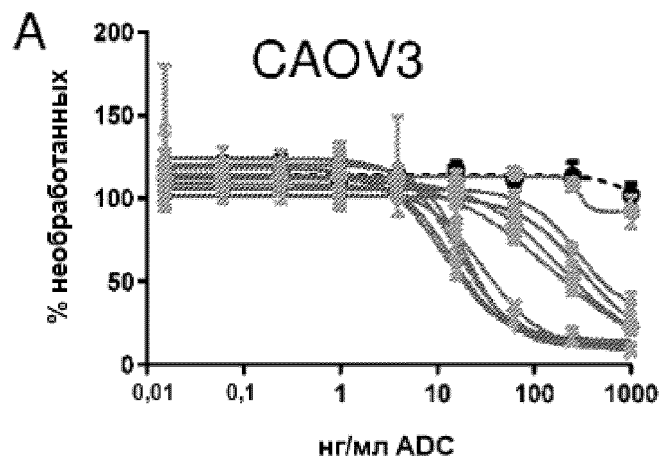
где Ab представляет собой антитело, а p обозначает число от 1 до 12.

55. ALPP- и/или ALPPL2-связывающий антигенсвязывающий белок или его фрагмент, который способен связываться с одной или более аминокислотами пептида, содержащего SEQ ID NO: 73 и/или SEQ ID NO: 74.

По доверенности



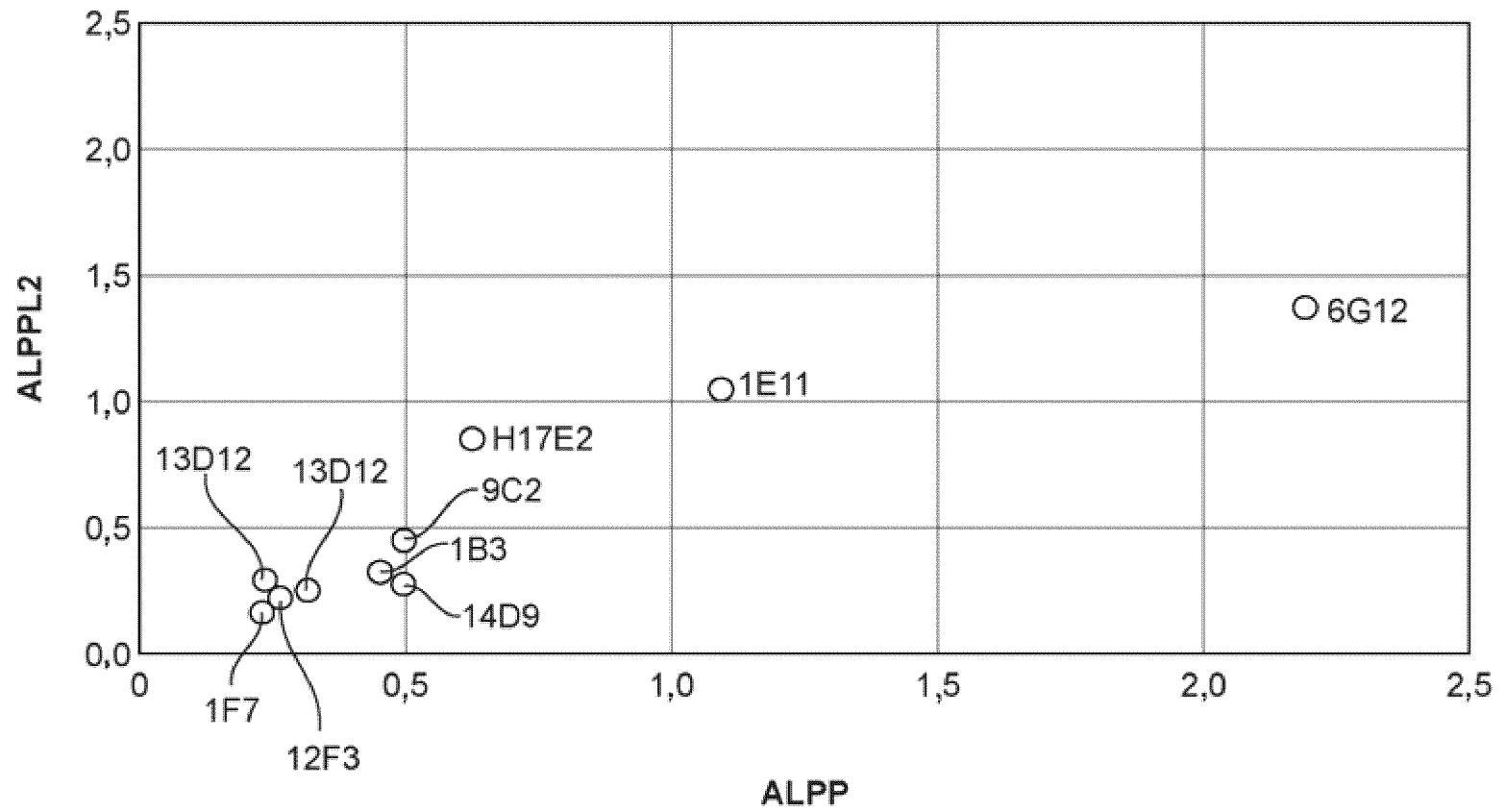
Фиг. 1



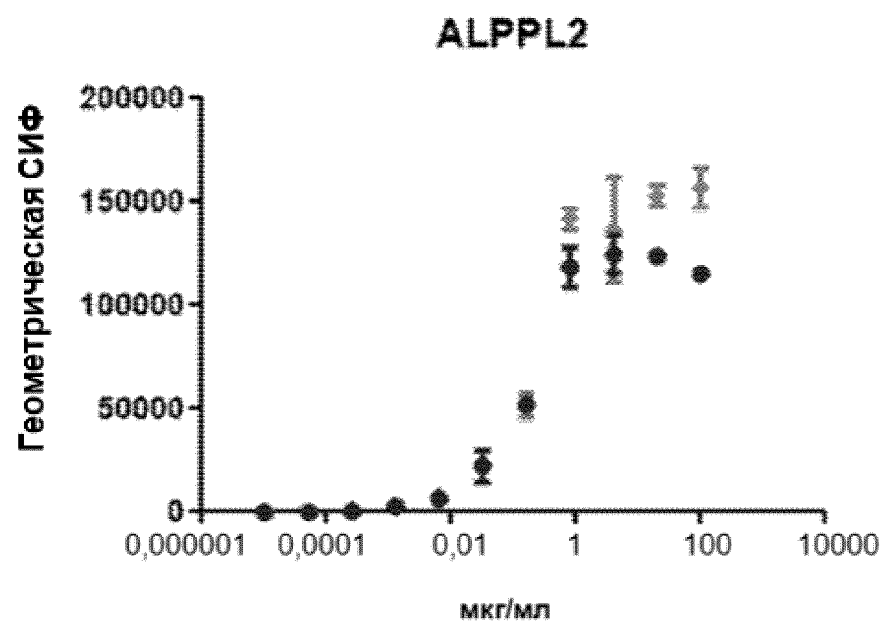
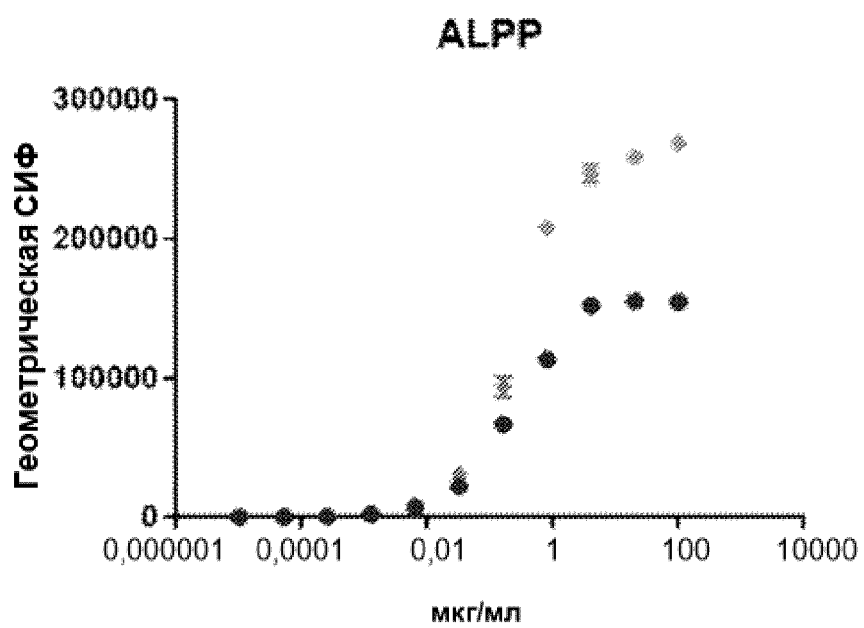
- ◆ SG82-6G12-4830(10)
- ▨ SG82-6D11-4830(10)
- ▧ SG82-13D12-4830(10)
- ▩ SG82-12F3-4830(10)
- SG82-14D9-4830(10)
- ◆ SG82-1F4-4830(10)
- ▨ SG82-1B3-4830(10)
- ▧ SG82-1F7-4830(10)
- ▩ SG84-1E11-4830(12)
- h00-4830(8)

Фиг. 2

Анализ насыщения связывания - Kd (мкг/мл)



Фиг. 3



	ALPP	
	12F3	1F7
нМ Kd	1,76	1,53
Bmax	266297	156005

	ALPPL2	
	12F3	1F7
нМ Kd	1,48	1,09
Bmax	155795	125621

Фиг. 4

Выравнивание вариантов h12F3 по вариабельной области тяжелой цепи с человеческой акцепторной последовательностью тяжелой цепи, IGHV3-49/HJ4

		10	20	30	40	50	60	70
							
mu 12F3 vH		..K.....G..S...A.....T..Y...V..P...A...LAL..N..T.Y...S.....						
hu IGHV3-49/HJ4		EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYAMSWFRQAPGKGLEWVGFIRSKAYGGTTEY TASVKGRFTIS						
h12F3 hvHA							
h12F3 hvHB							
h12F3 hvHC							
h12F3 hvHD							
h12F3 hvHE							
h12F3 hvHF							
h12F3 hvHG							
h12F3 hvHH							
Kabat CDRs				*****		*****		
IMGT CDRs			+++++++			+++++++		
		80	90	100	110			
							
mu 12F3 vH		..N.Q..L.....A.RA..S.T...A.ASFYYDGKVLA.....A						
hu IGHV3-49/HJ4		RDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRYF-----DYWGQGLVTVSS						
h12F3 hvHA							
h12F3 hvHB							
h12F3 hvHC							
h12F3 hvHD							
h12F3 hvHE							
h12F3 hvHF							
h12F3 hvHG							
h12F3 hvHH							
Kabat CDRs				*****				
IMGT CDRs			+++++++					

Фиг. 5

Выравнивание переменного домена вариантов h12F3 по переменной области тяжелой цепи

```

                10         20         30         40         50         60         70
h12F3 hvHA EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCTASGFTFGDYMSWFRQAPGKGLEWVGLIRNKATGYTTEYSASVKGRFTIS
h12F3 hvHB .....T.....
h12F3 hvHC .....T.....LA.....
h12F3 hvHD .....T.....
h12F3 hvHE .....T.....LA.....
h12F3 hvHF .....T.....V.....LA.....
h12F3 hvHG .....T.....V.....LA.....T.....
h12F3 hvHH .....T.....V.....LA.....T.....
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

                80         90         100        110
h12F3 hvHA RDGSKSIAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRASFYDGVKVLAYWGQGLVTVSS
h12F3 hvHB ..N.....
h12F3 hvHC ..N.....
h12F3 hvHD ..N...L.....A.....
h12F3 hvHE ..N...L.....A.....
h12F3 hvHF ..N...L.....A.....
h12F3 hvHG ..N...L.....A.....
h12F3 hvHH ..N..NSL.....A.....
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++++

```

Фиг. 6

Выравнивание вариантов h12F3 по переменной области легкой цепи с человеческой акцепторной последовательностью каппа, IGKV1-33/KJ2

	10	20	30	40	50	60	70
mu 12F3 vL						
hu IGKV1-33/KJ2	.T.....L.GK.....K.....NK.IA...Y.T..G.R...HYT.T.QP.I.....R.						
h12F3 hvL1						
h12F3 hvL2						
h12F3 hvL3						
h12F3 hvLA						
h12F3 hvLB						
h12F3 hvLC						
h12F3 hvLD						
h12F3 hvLE						
h12F3 hvLF						
h12F3 hvLG						
h12F3 hvLH						
h12F3 hvLI						
Kabat CDRs		*****			*****		
IMGT CDRs		++++++			+++		

	80	90	100
mu 12F3 vL		
hu IGKV1-33/KJ2	YS.S..N.E.....L.....-.....G.....		
h12F3 hvL1		
h12F3 hvL2		
h12F3 hvL3		
h12F3 hvLA		
h12F3 hvLB		
h12F3 hvLC		
h12F3 hvLD		
h12F3 hvLE		
h12F3 hvLF		
h12F3 hvLG		
h12F3 hvLH		
h12F3 hvLI		
Kabat CDRs		*****	
IMGT CDRs		+++++++	

7/34

Фиг. 7

Выравнивание переменного домена вариантов h12F3 по легкой цепи

```

                10      20      30      40      50      60      70
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
h12F3 hvL1  DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDINKYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSNLETGVPSRFGSGSGTD
h12F3 hvL2  .....S.QS.....
h12F3 hvL3  .....A.....S.QP.....
h12F3 hvLA  .....K.....IA.....T.QP.....
h12F3 hvLB  .T.....K.....IA.....H...T.QP.....R.
h12F3 hvLC  .T.....K.....IA.....T.QP.....
h12F3 hvLD  .T.....IA.....S.QP.....
h12F3 hvLE  .T.....IA.....H...S.QS.....R.
h12F3 hvLF  .T.....A...Y.....H...S.QS.....R.
h12F3 hvLG  .T.....A...T.....H...S.QS.....R.
h12F3 hvLH  .T.....K.....IA...Y.T.....H...T.QP.....R.
h12F3 hvLI  .T.....K.....IA.F.Y.T.....F.H...T.QP.....R.
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++

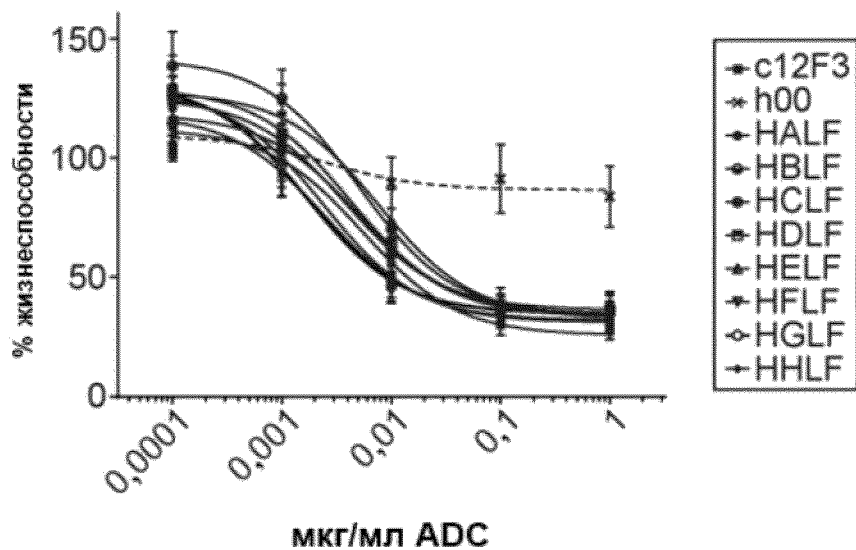
                80      90      100
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|
h12F3 hvL1  FTFTISSLQPEDIAATYYCLQYDNLYTFGQGTKLEIK
h12F3 hvL2  .....
h12F3 hvL3  .....
h12F3 hvLA  .....
h12F3 hvLB  Y.....
h12F3 hvLC  Y.....
h12F3 hvLD  Y.....
h12F3 hvLE  Y.....
h12F3 hvLF  Y.....
h12F3 hvLG  Y.....
h12F3 hvLH  Y.....
h12F3 hvLI  Y.L.....
Kabat CDRs          *****
IMGT CDRs          ++++++

```

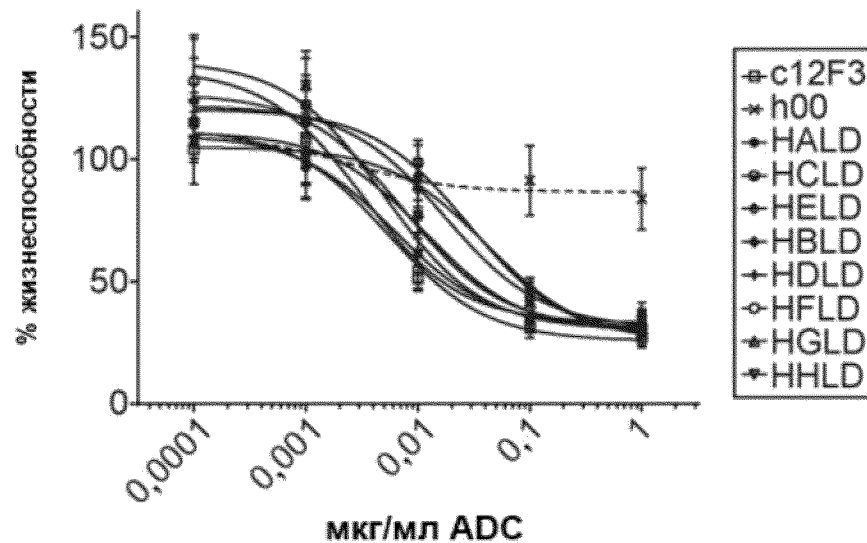
8/34

Фиг. 8

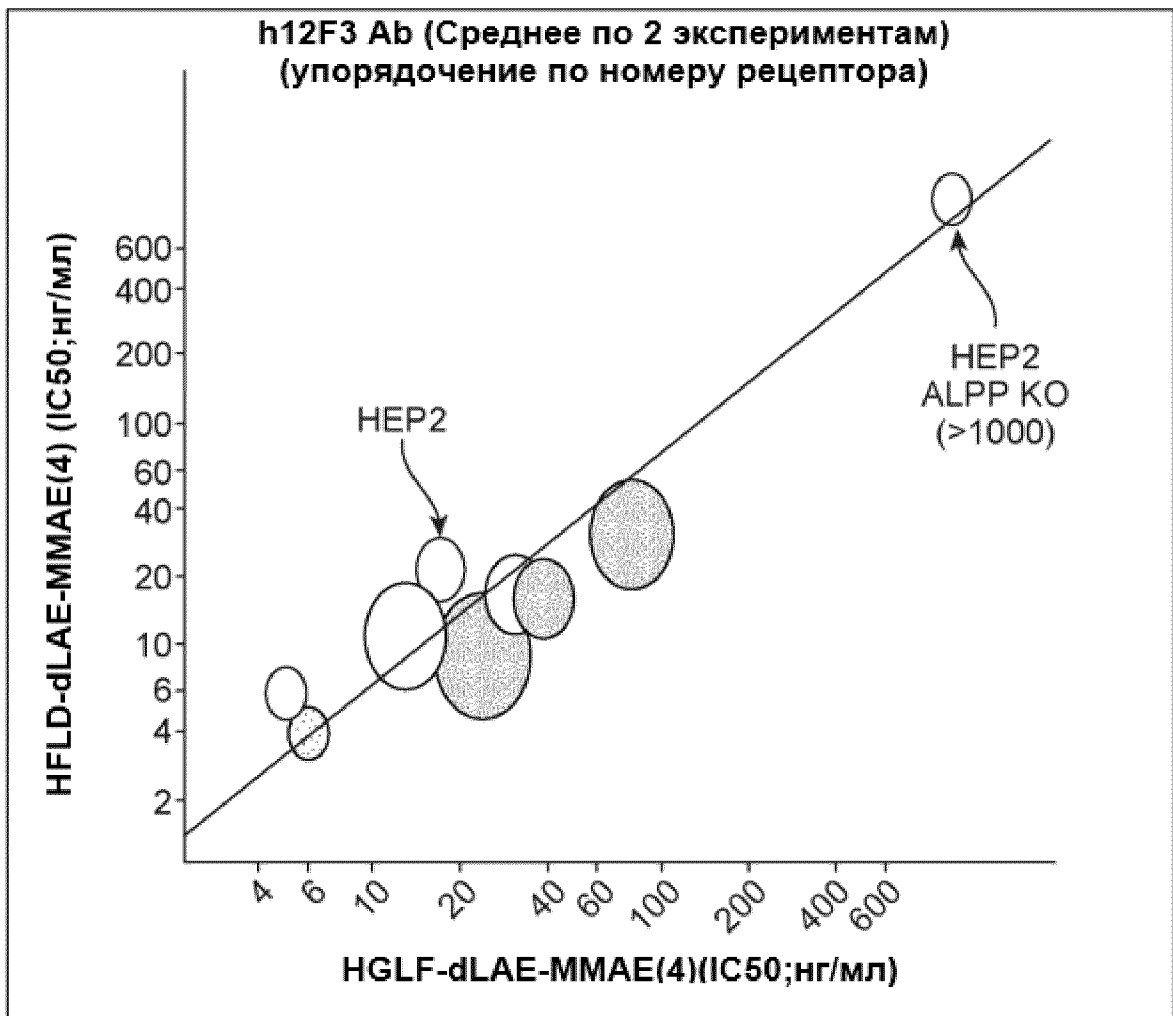
Варианты по легкой цепи F
CAOV3-LF



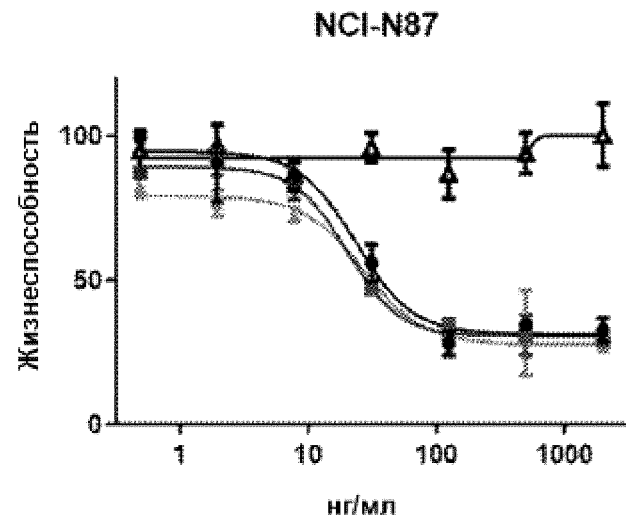
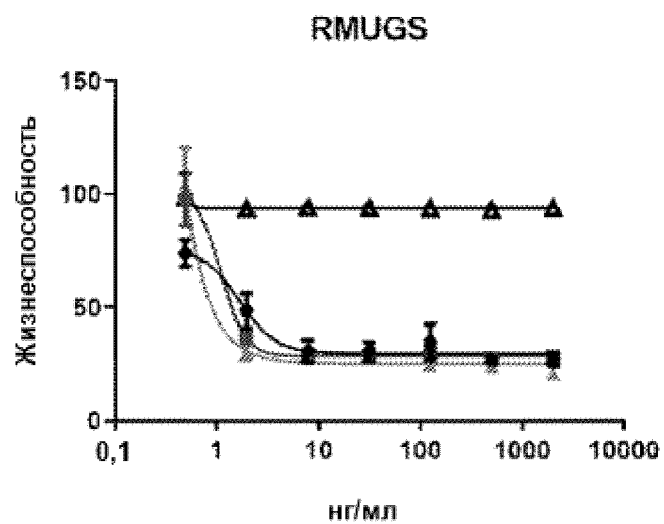
Варианты по легкой цепи D
CAOV3-LD



Фиг. 9

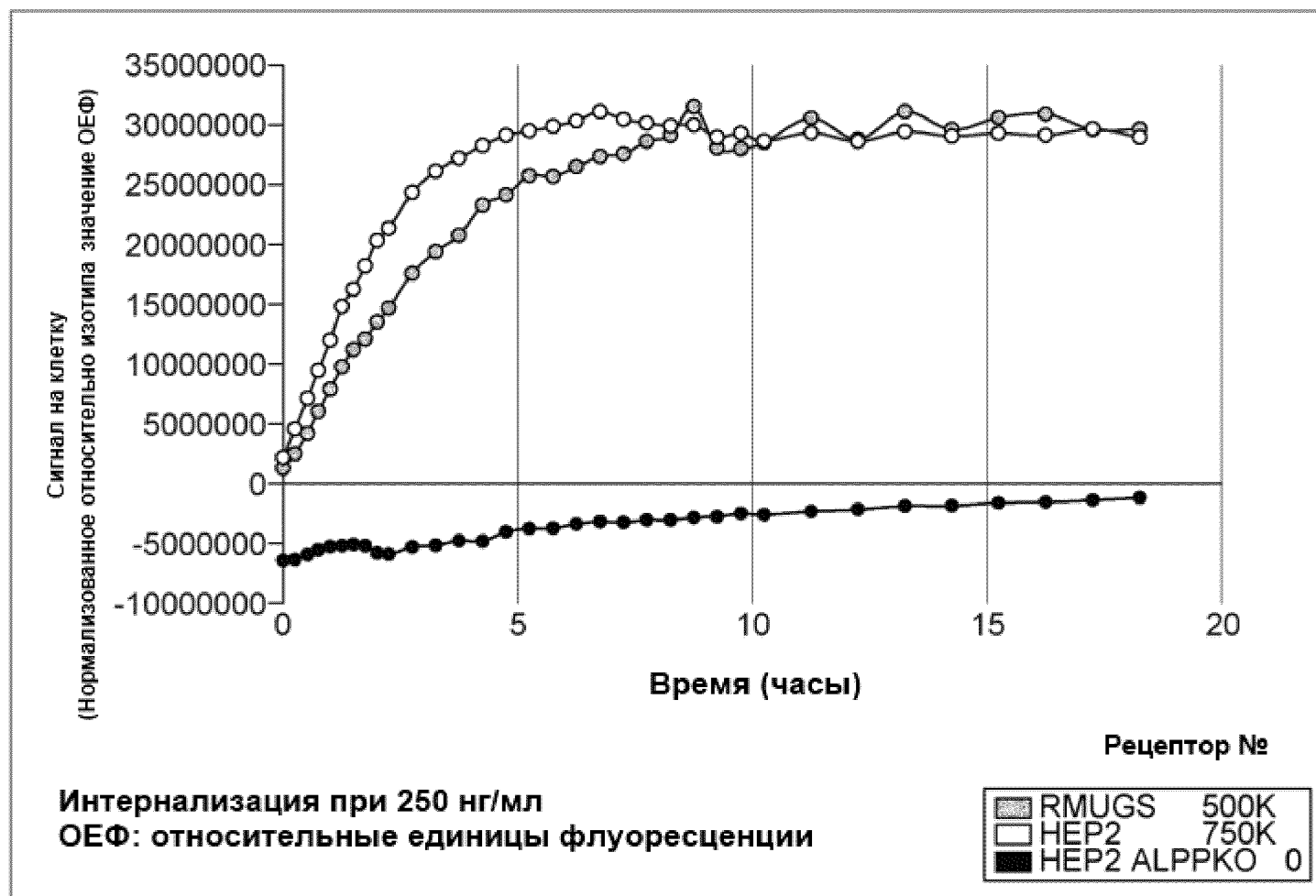


Фиг. 10

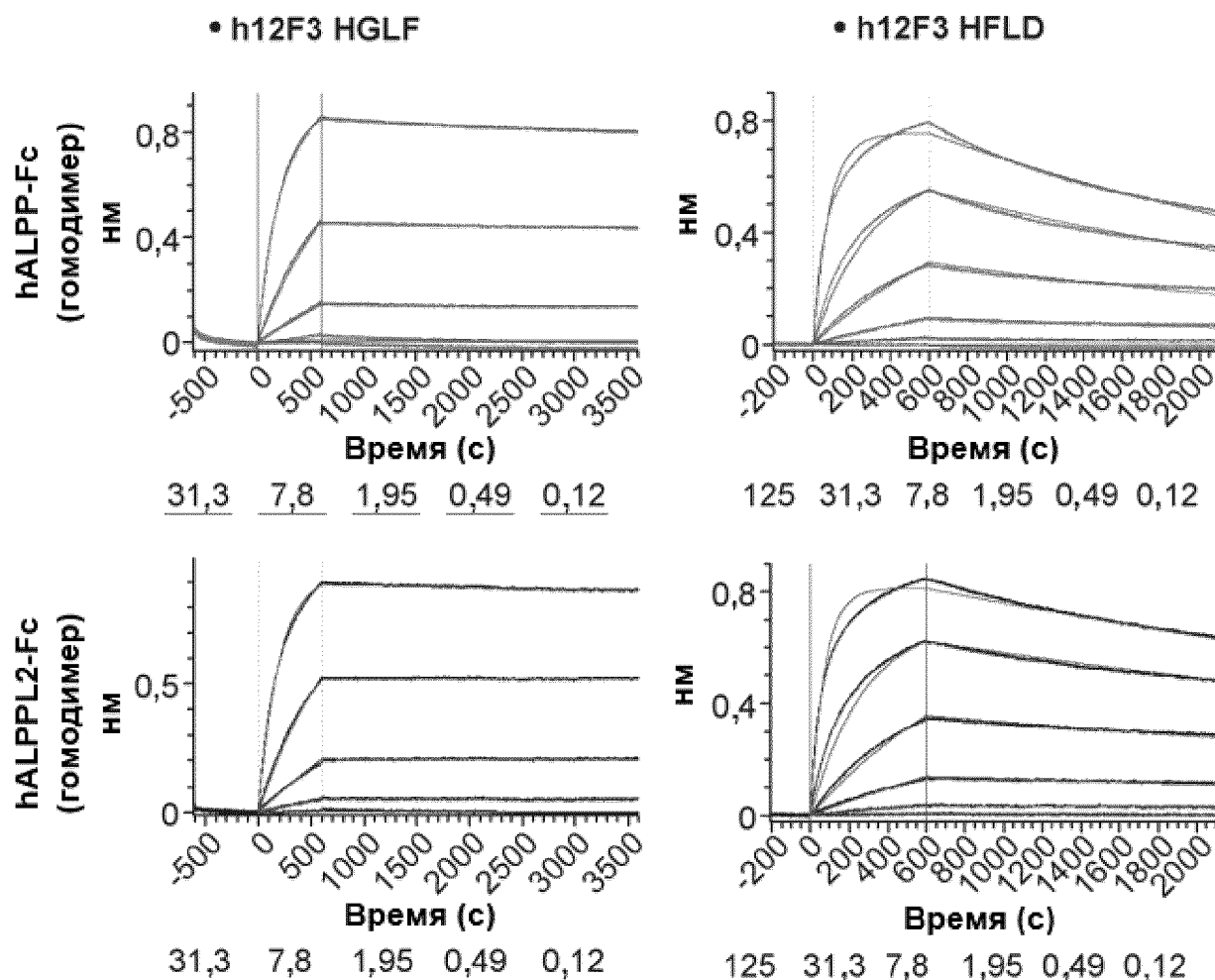


- ▲ Невязывающий IgG MDPr gluc-MMAE(4) DC
- ⊠ h12F3 HGLF MDPr gluc-MMAE(4)
- h12F3 HGLF dLAE-MMAE(4)
- h12F3 HGLF vc-MMAE(4)

Фиг. 11

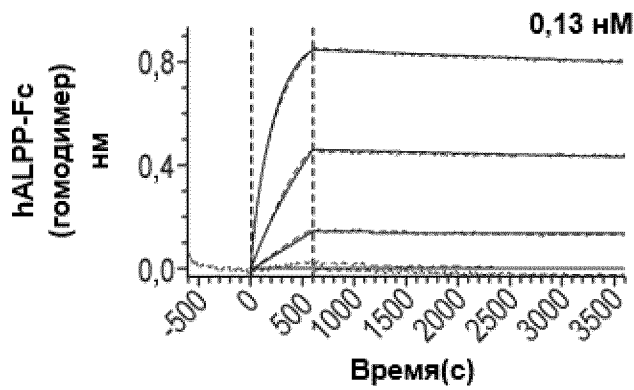


Фиг. 12



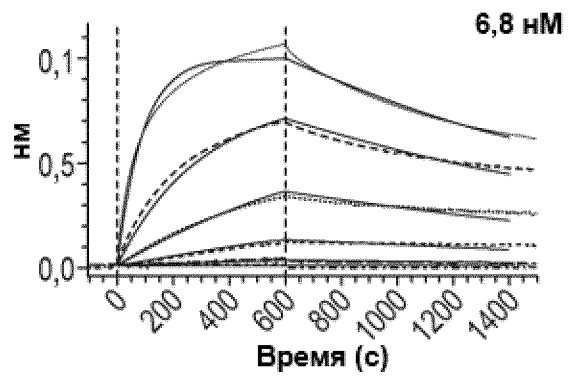
Зонд	Аналит	K_D (нМ)	K_a 1/(Мс)	K_d 1/с	χ^2	K_D ошиб.	K_a ошиб.	K_d SE
h12F3 HGLF	hALPP Fc	0,13	1,5E+05	2,0E-05	2,8	<1,0E-12	2,6E+02	1,29E-07
h12F3 HFLD		3,5	9,5E+04	3,3E-04	4,3	1,16E-11	2,7E+02	5,96E-07
h12F3 HGLF	hALPPL2 Fc	0,044	1,6E+05	7,1E-06	1,0	<1,0E-12	1,5E+02	#DIV/0!
h12F3 HFLD		1,5	1,1E+05	1,7E-04	5,8	6,76E-12	3,2E+02	5,52E-07

Фиг. 13



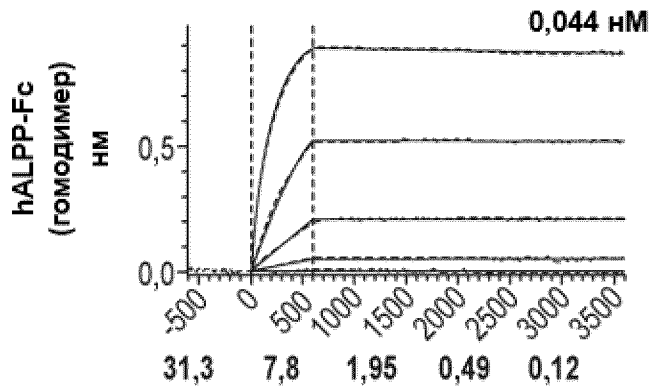
31,3 7,8 1,95 0,49 0,12

В 3 раза выше для ALPPL2

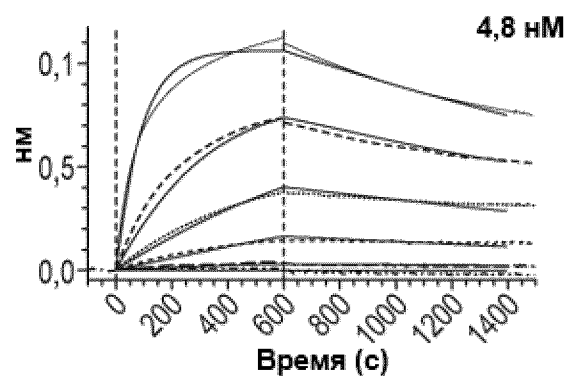


125 31,3 7,8 1,25 0,42 0,12

В 1,4 раза выше для ALPPL2



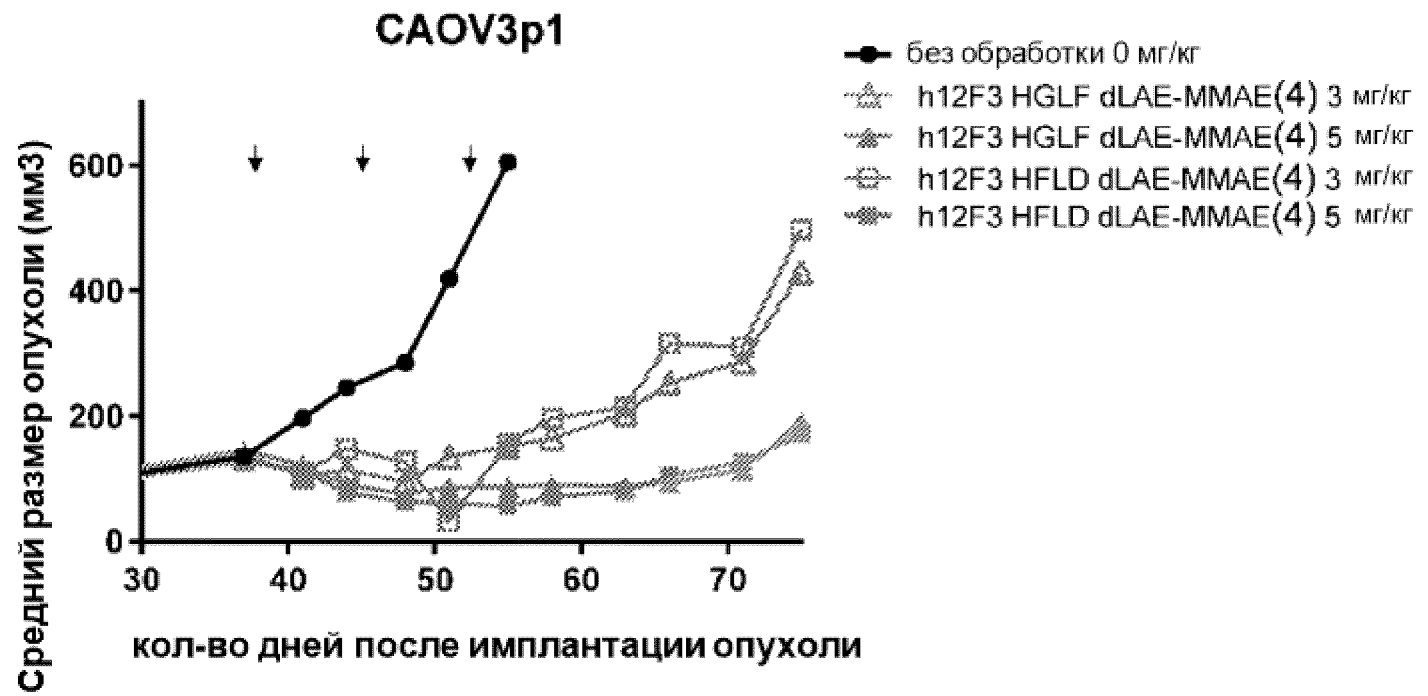
31,3 7,8 1,95 0,49 0,12



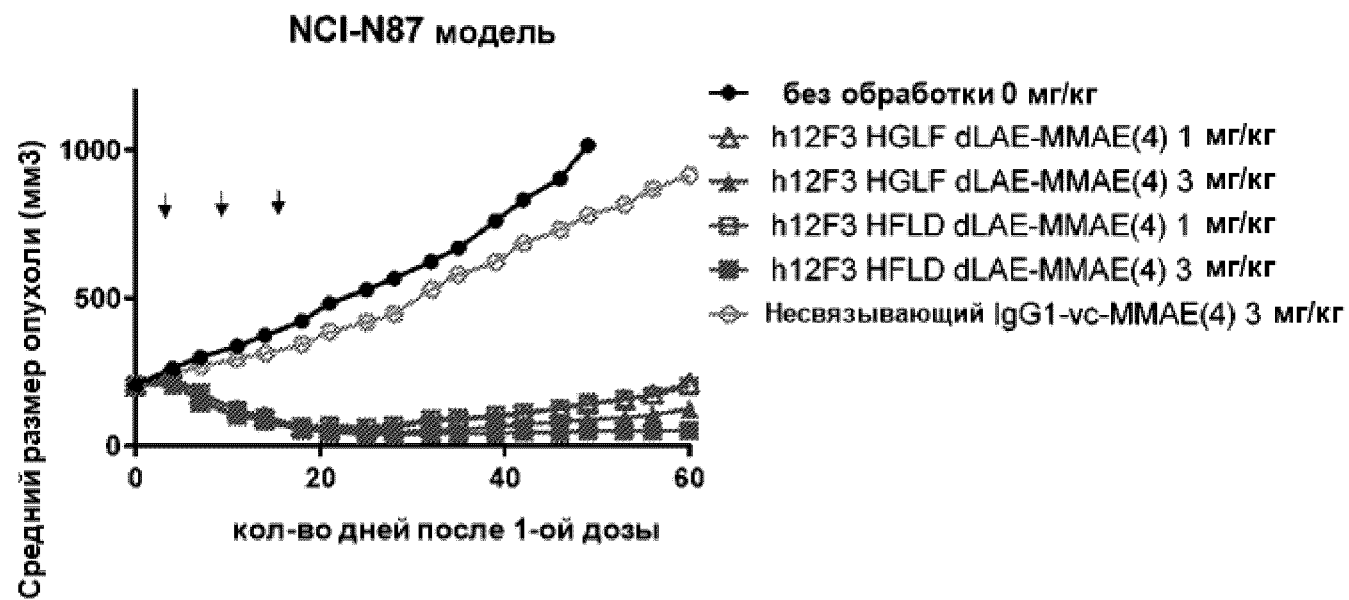
125 31,3 7,8 1,25 0,42 0,12

Зонд	Аналит	pH 7,4			pH 6,0			Кратность изменения между pH 6,0 и 7,4		
		K_D (нМ)	k_a 1/(Мс)	k_d 1/с	K_D (нМ)	k_a 1/(Мс)	k_d 1/с	K_D	k_a	k_d
h12F3 HGLF	hALPP Fc (гомодимер)	0,13	1,5E+05	2,0E-05	6,8	8,7E+04	5,9E-04	52	1,7	30
h12F3 HGLF	hALPPL2 Fc (гомодимер)	0,044	1,6E+05	7,1E-06	4,8	8,9E+04	4,3E-04	109	1,8	61

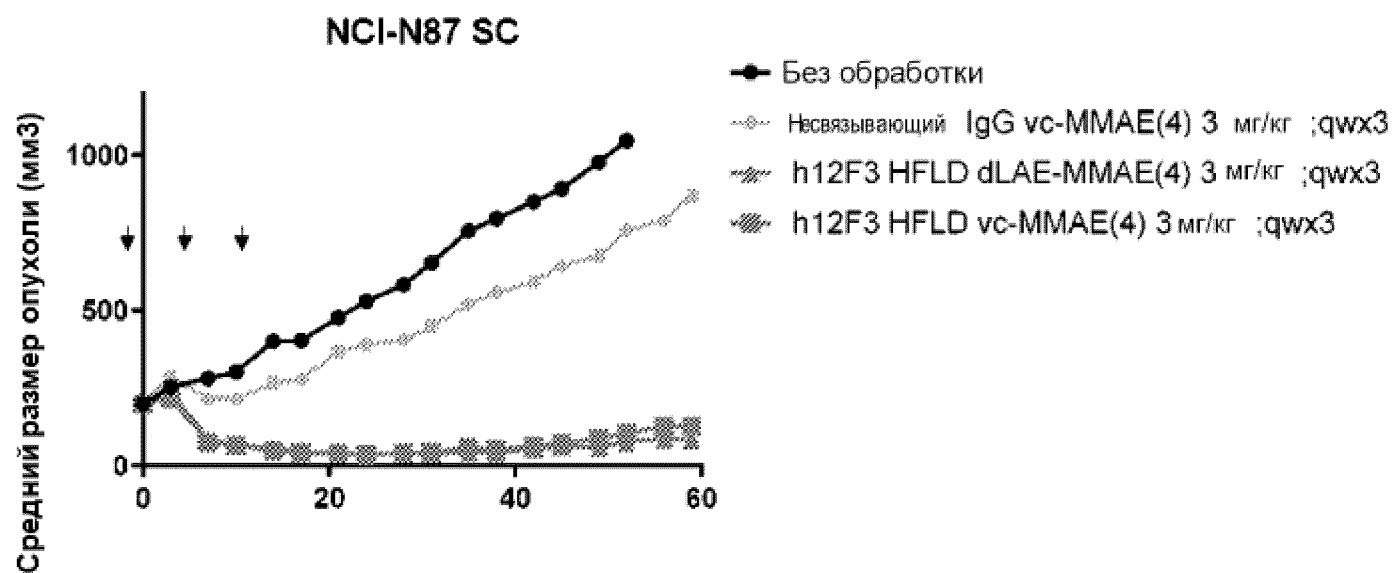
Фиг. 14



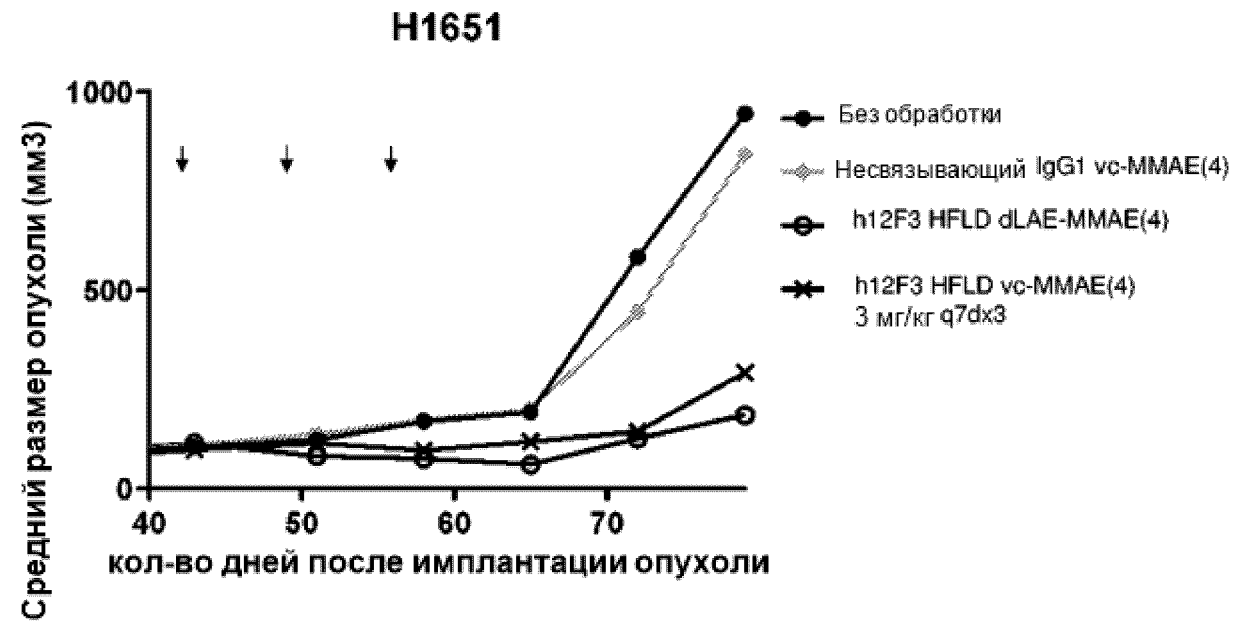
Фиг. 15



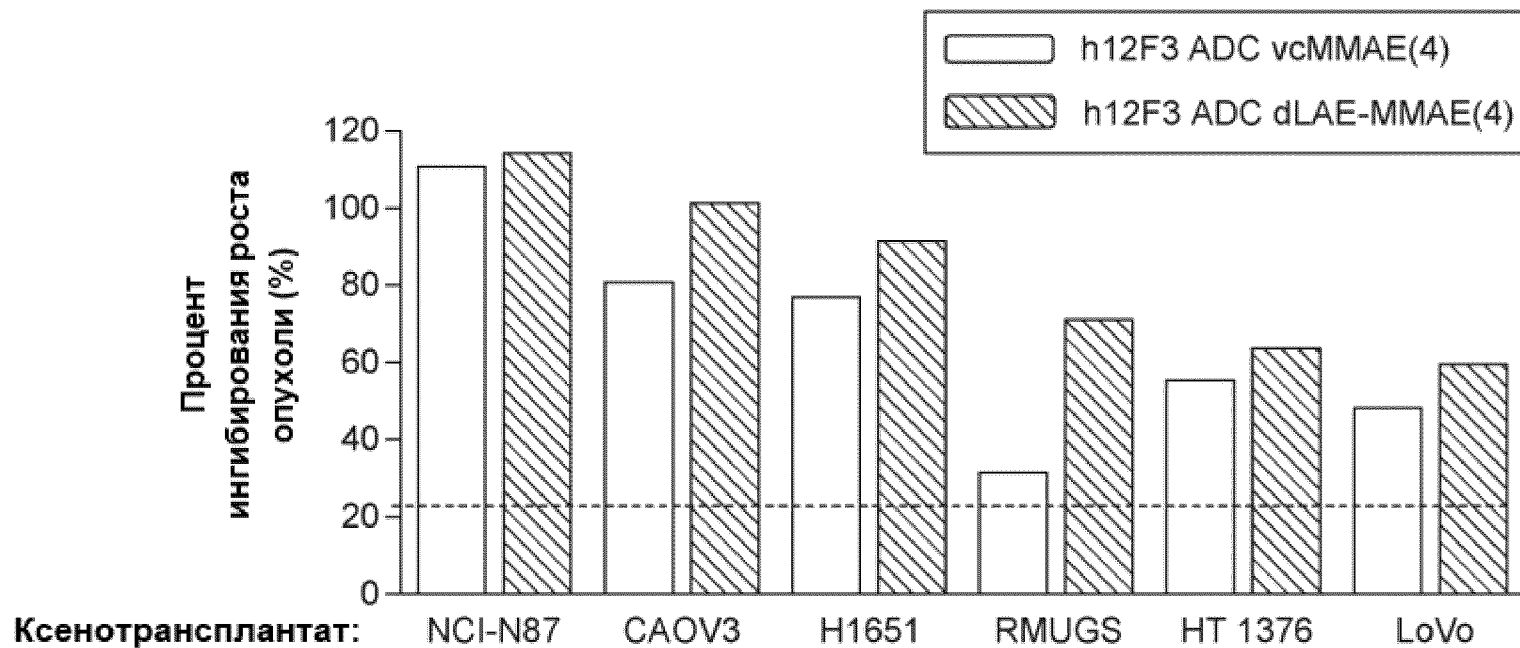
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Доза:

3 мг/кг

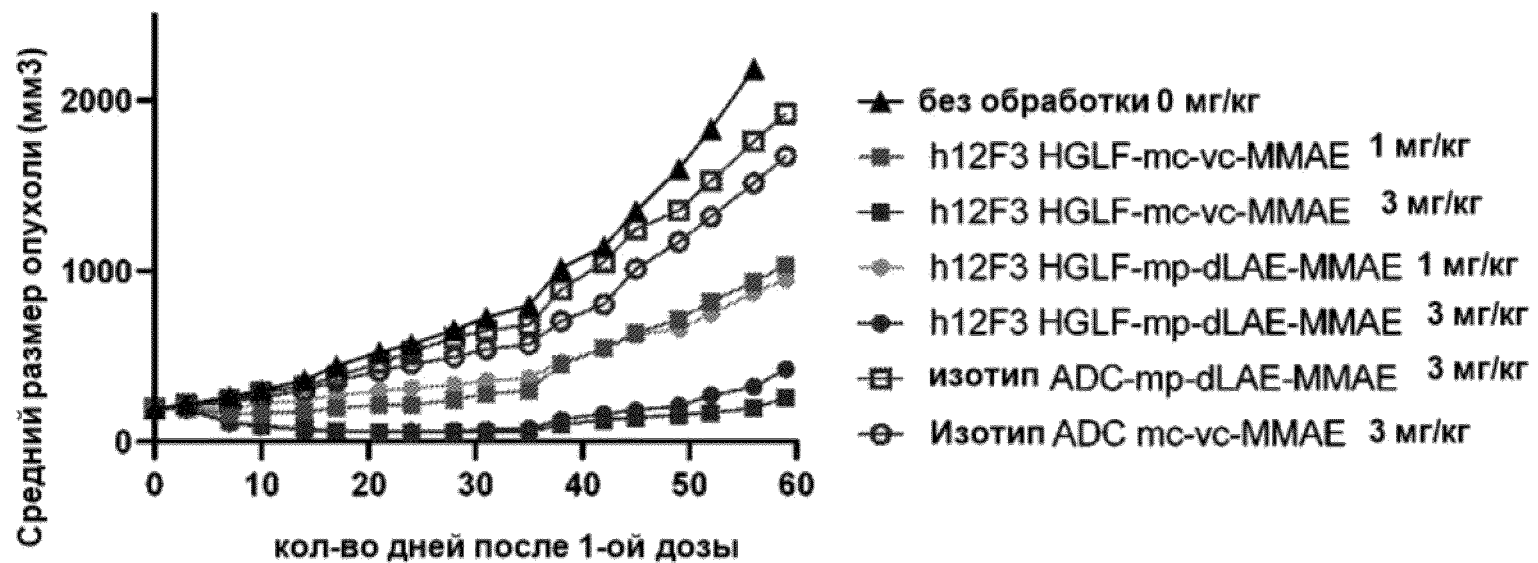
Схема: раз в неделю x3 или q4dx4

DAR: 4

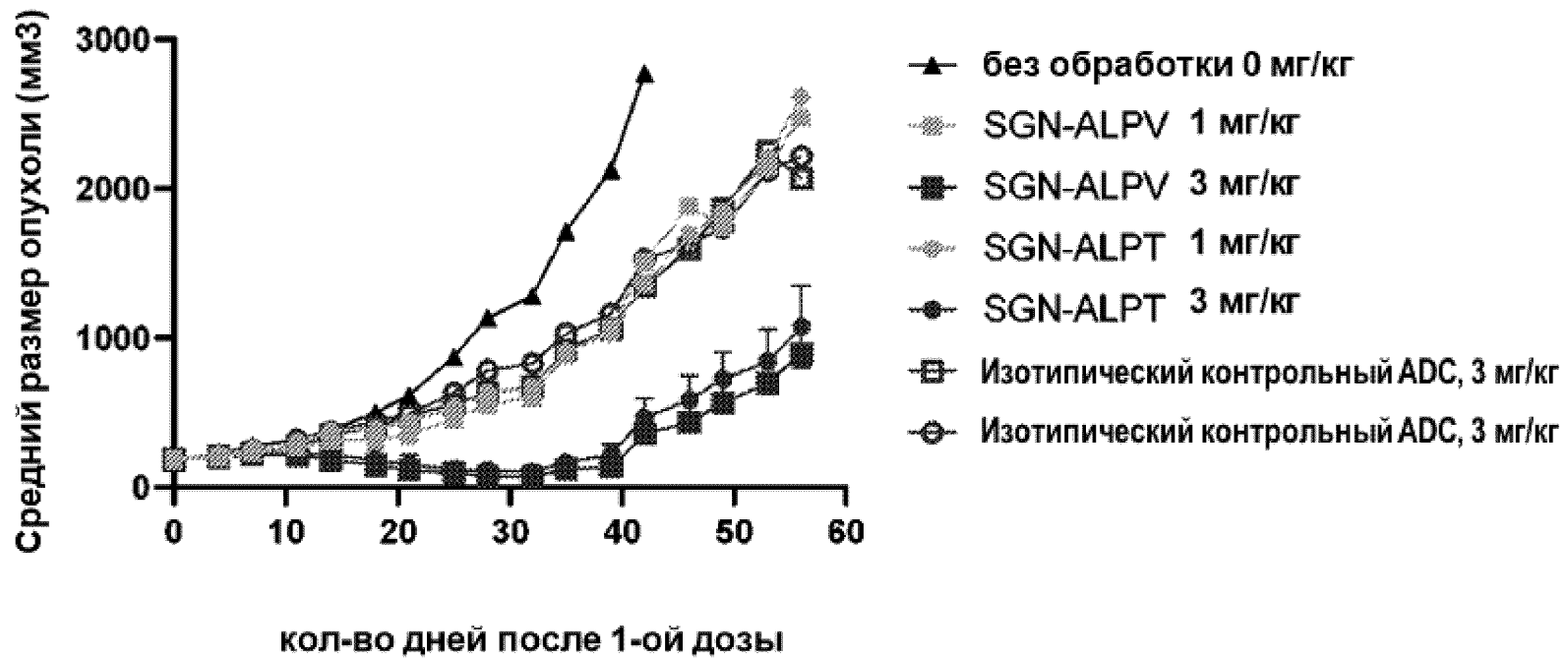
Пунктирная линия:

Средняя активность ненацеленного ADC

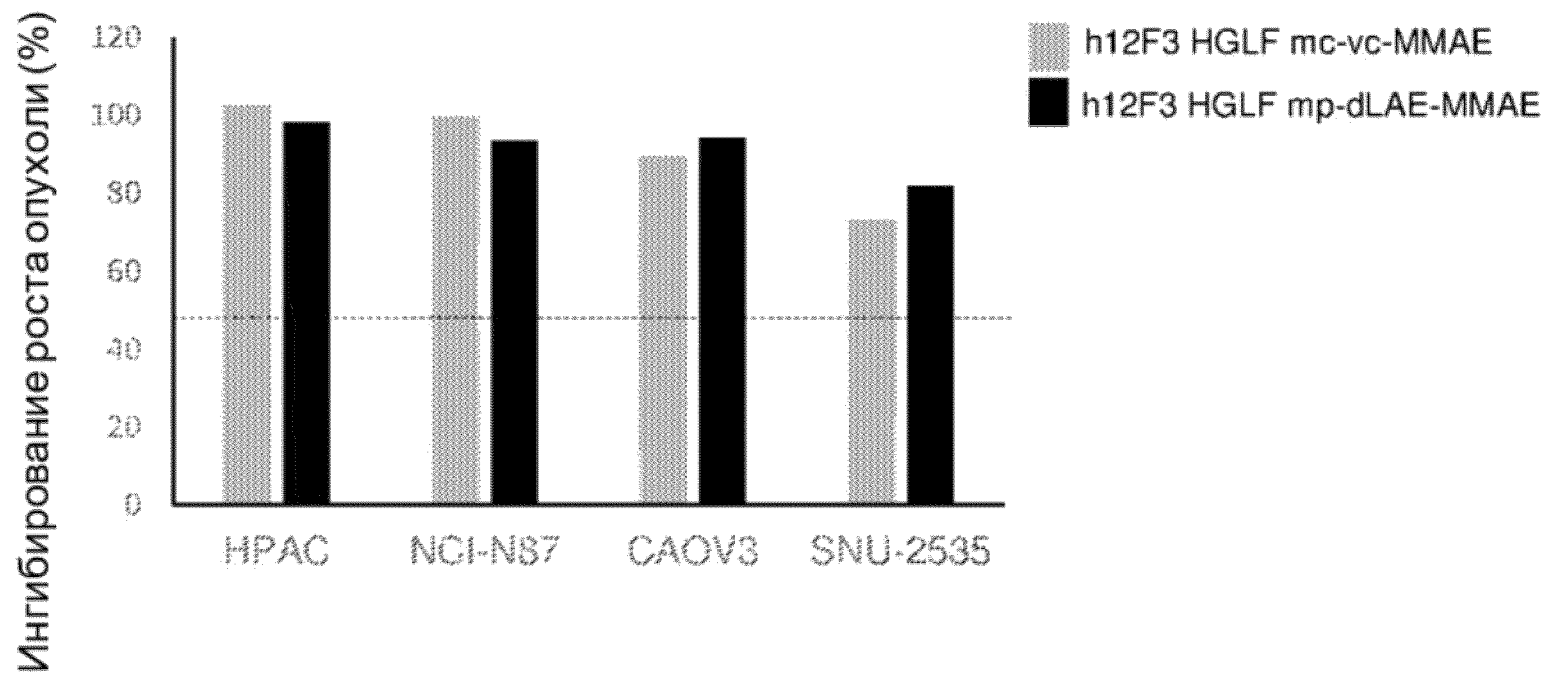
Фиг. 19



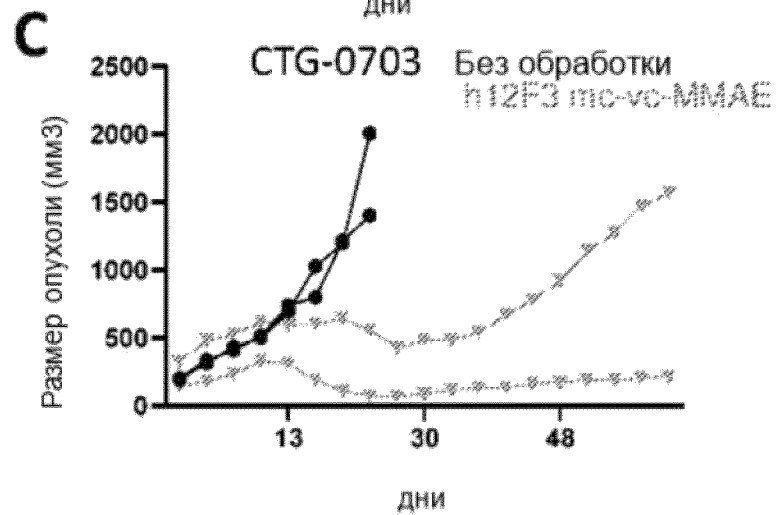
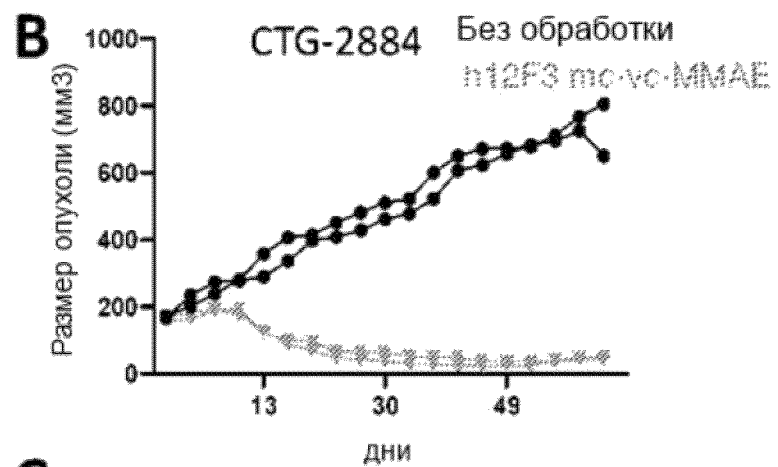
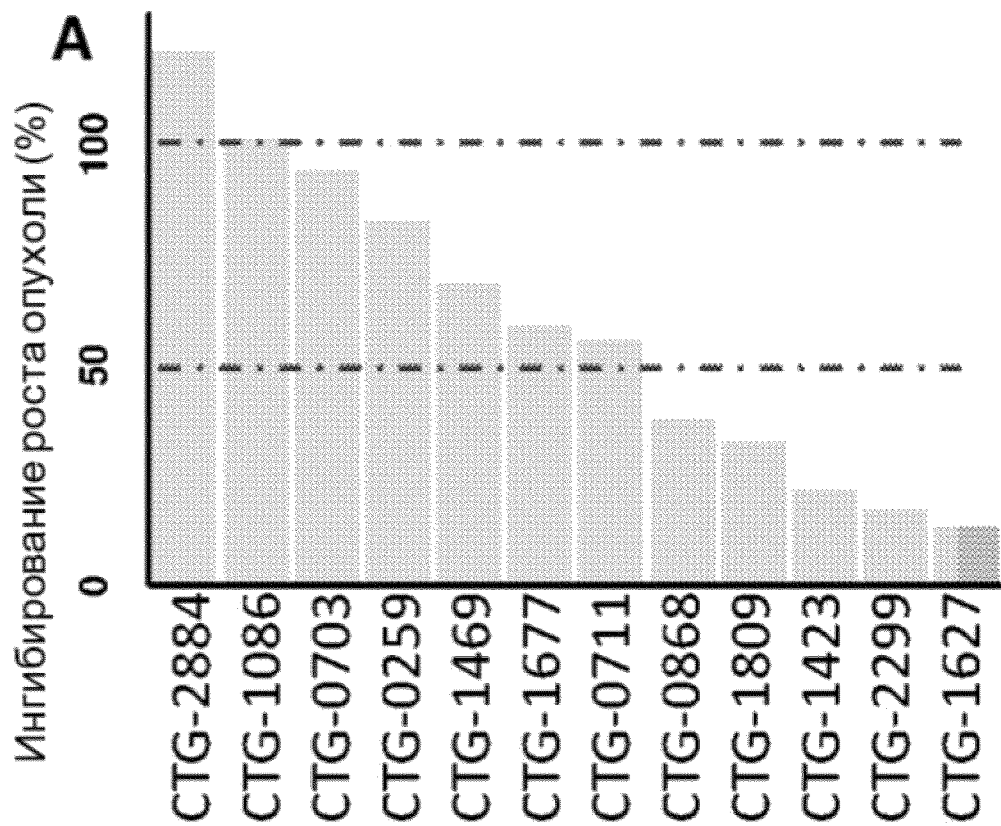
Фиг. 20



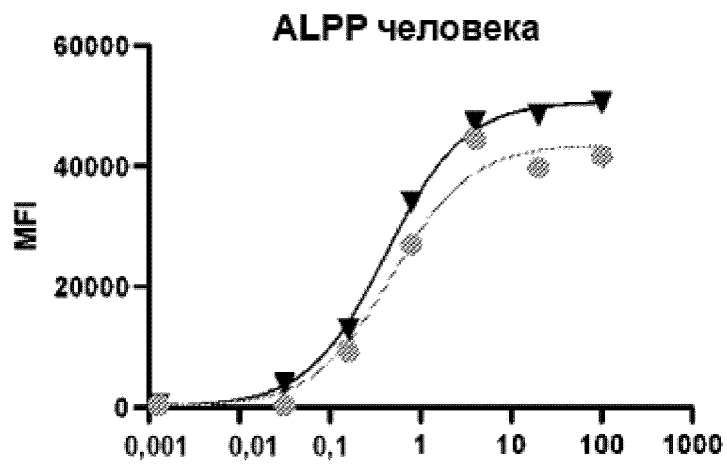
Фиг. 21



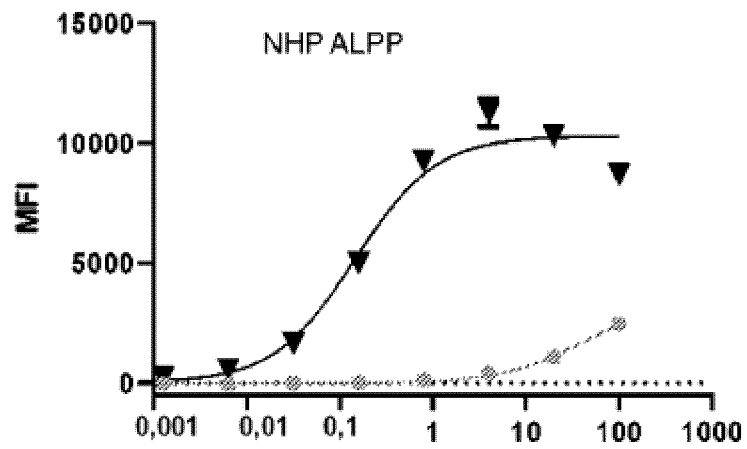
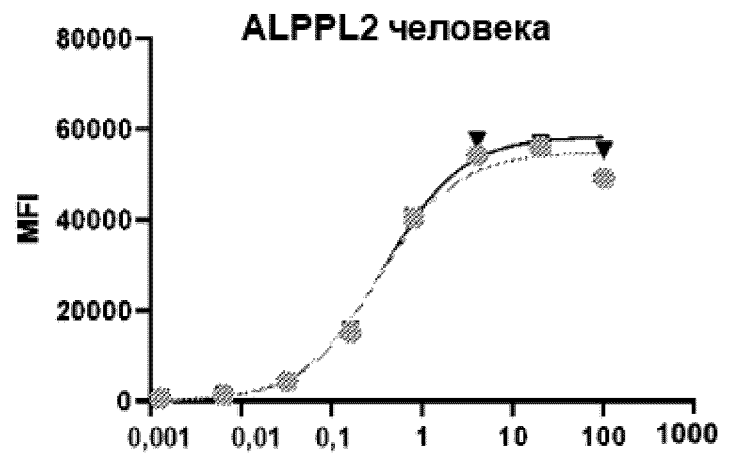
Фиг. 22



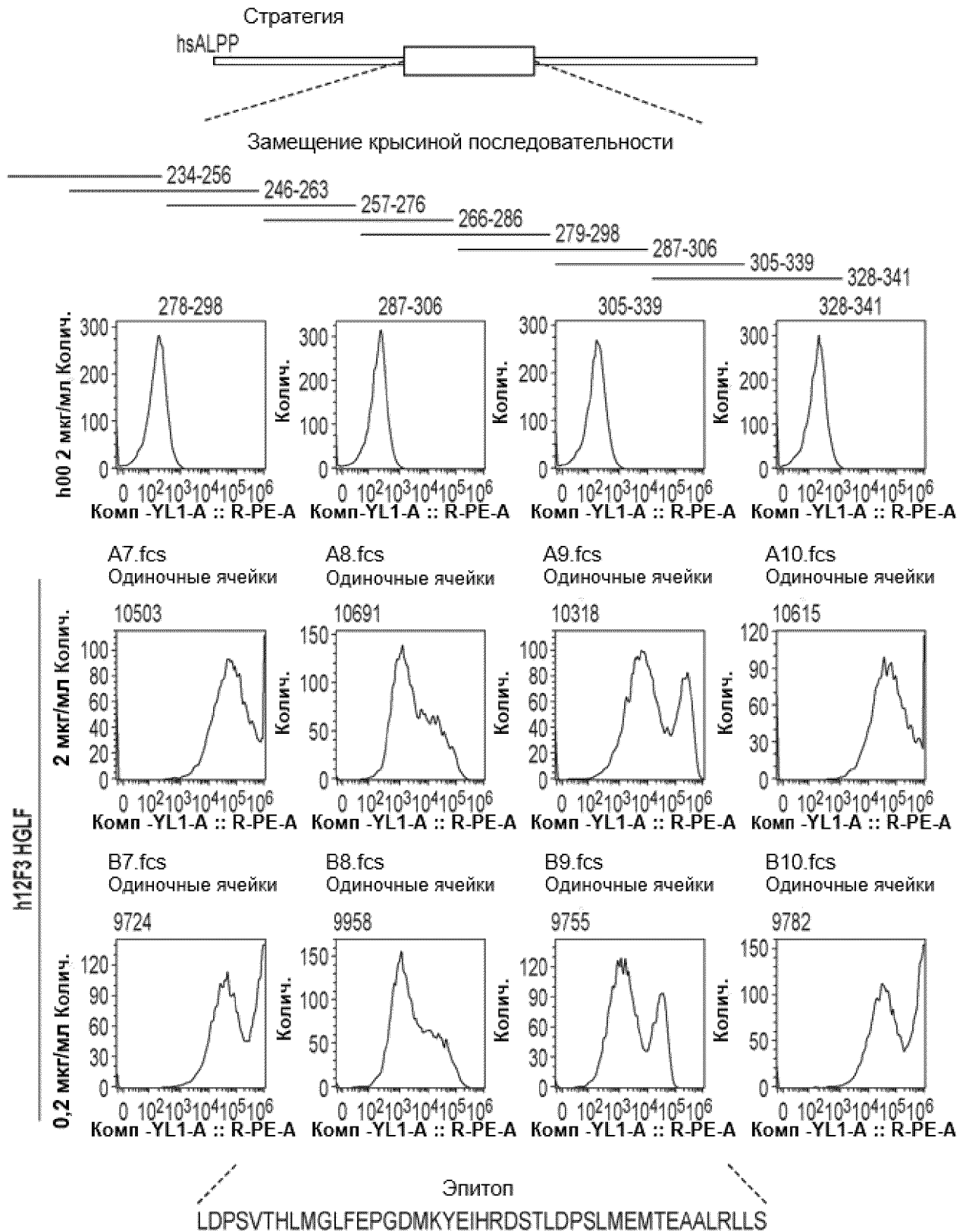
Фиг. 23



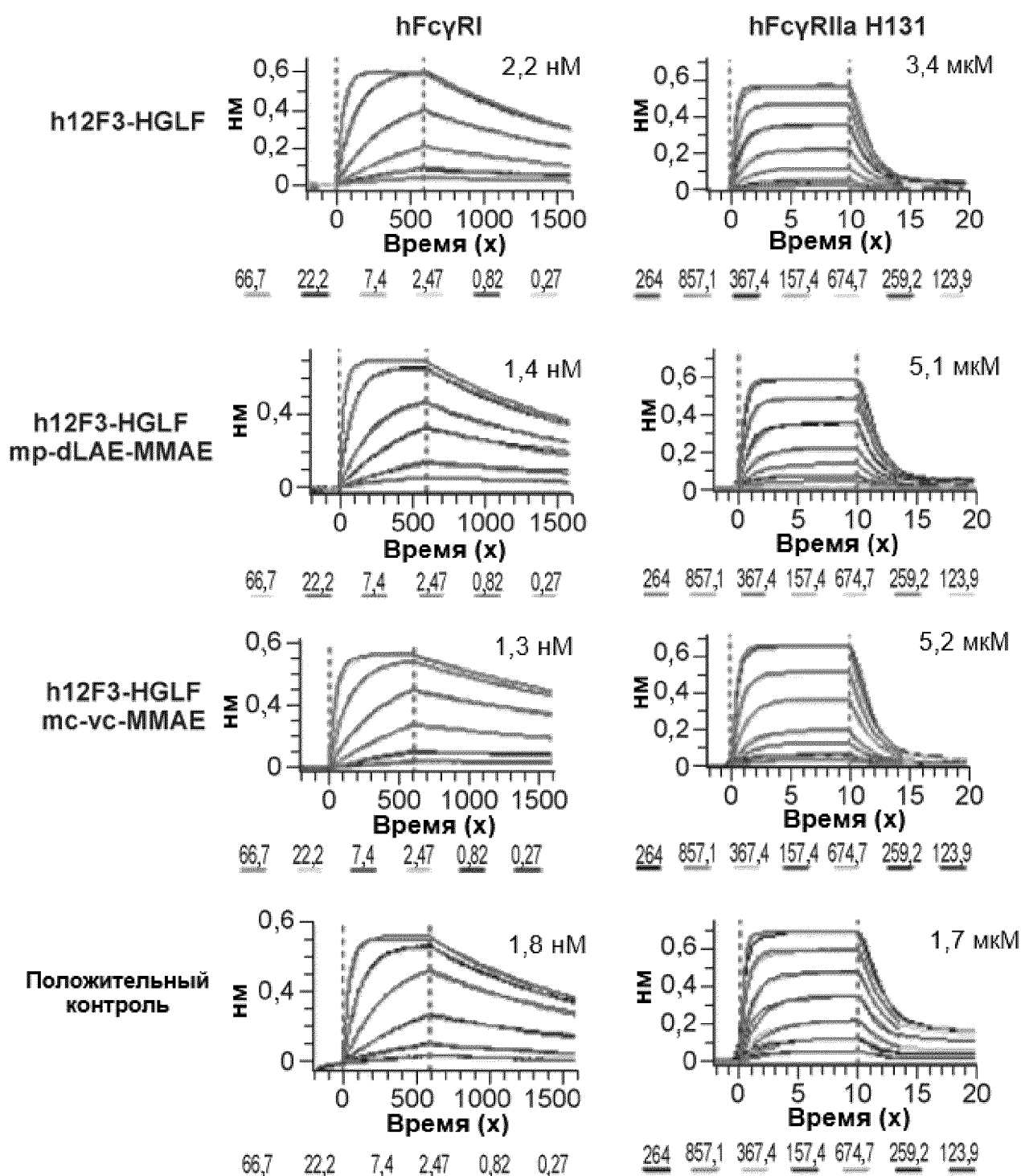
● HFLD
▼ HGLF



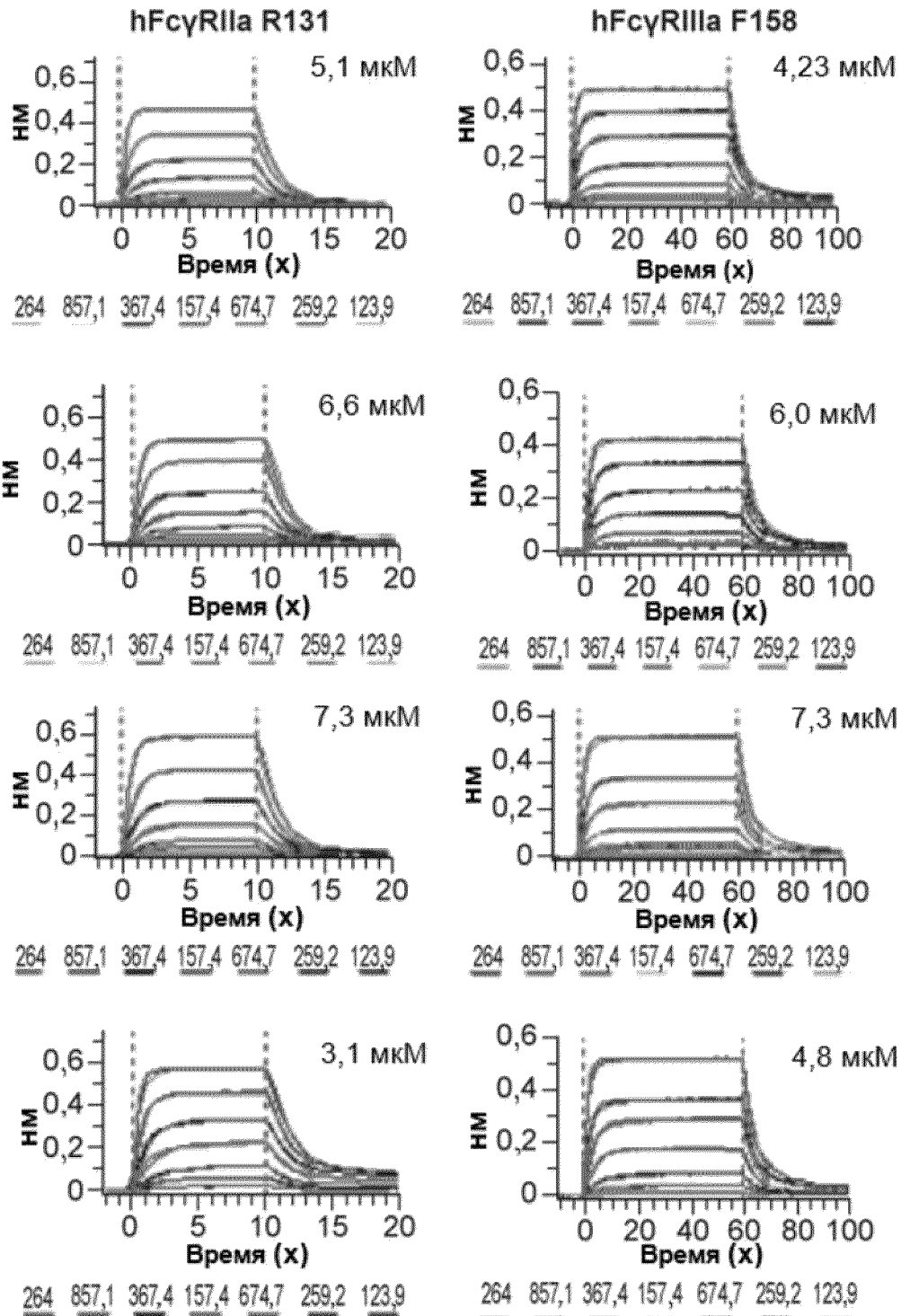
Фиг. 24



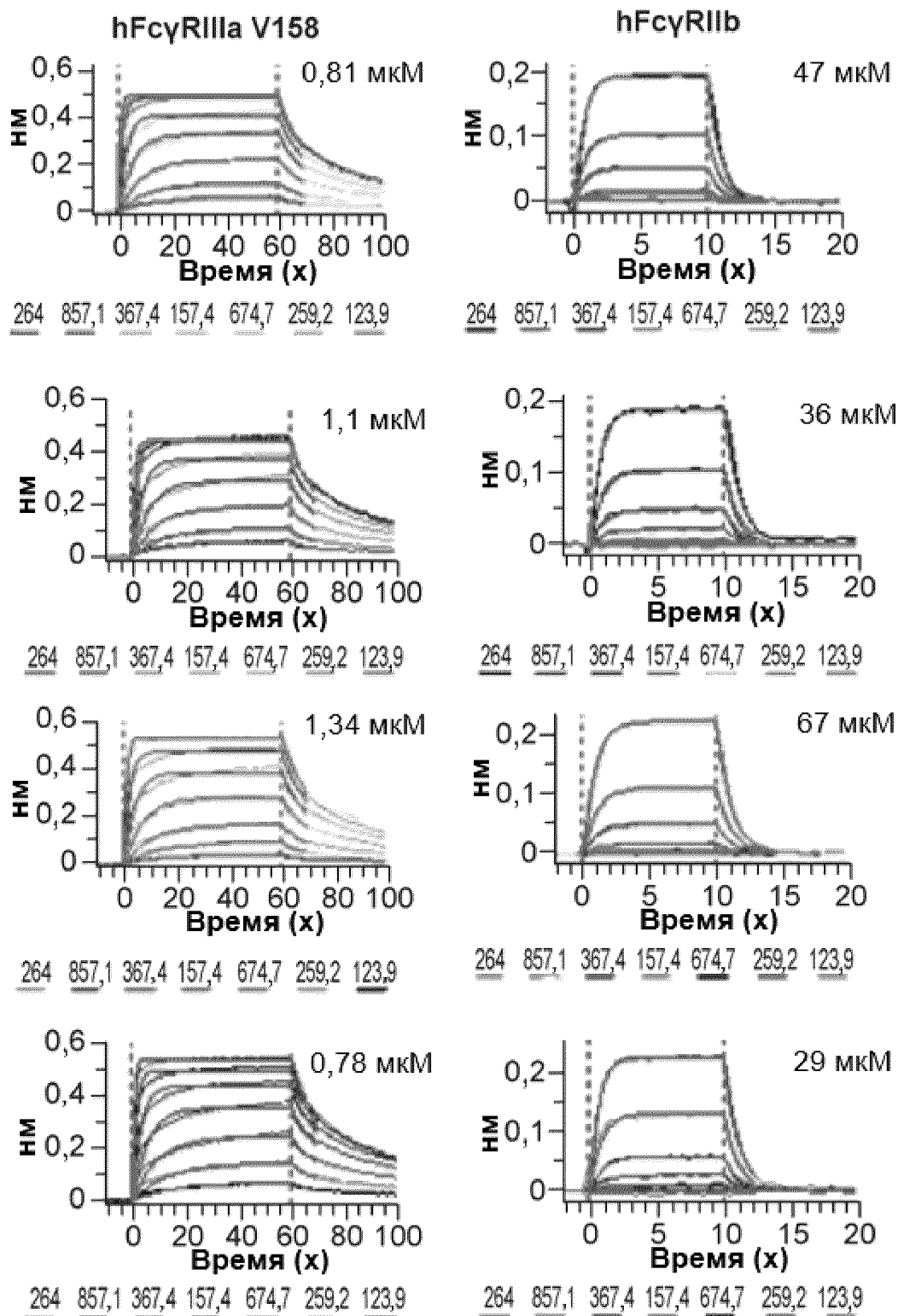
ФИГ. 25



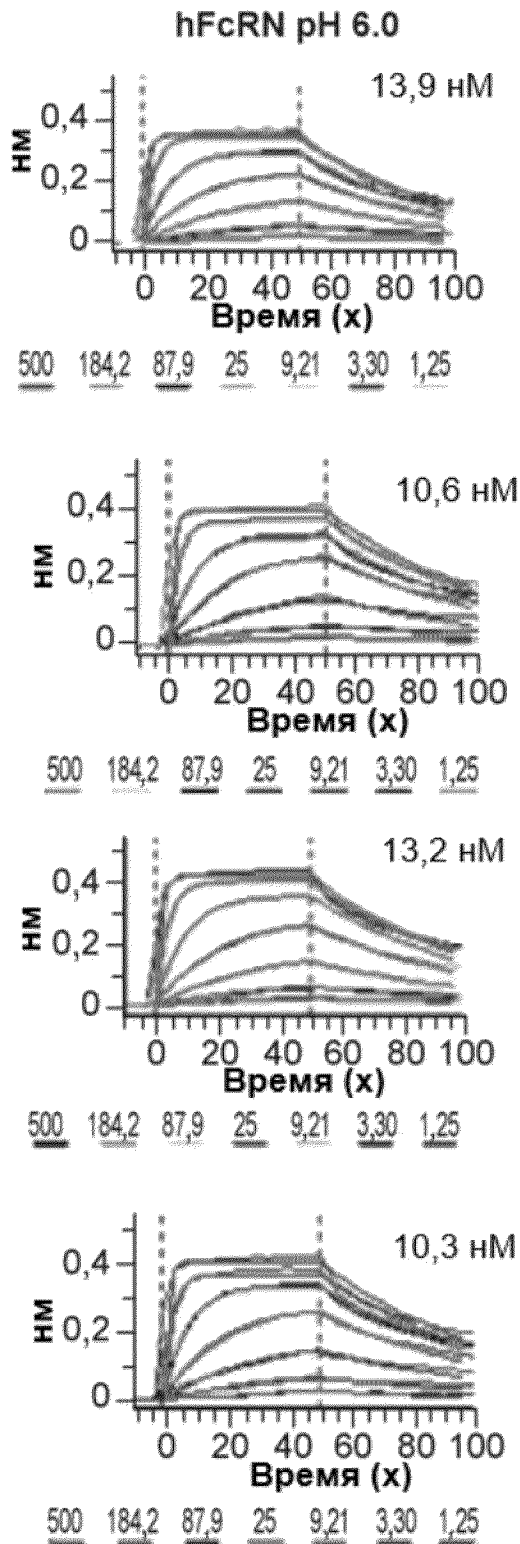
Фиг. 26



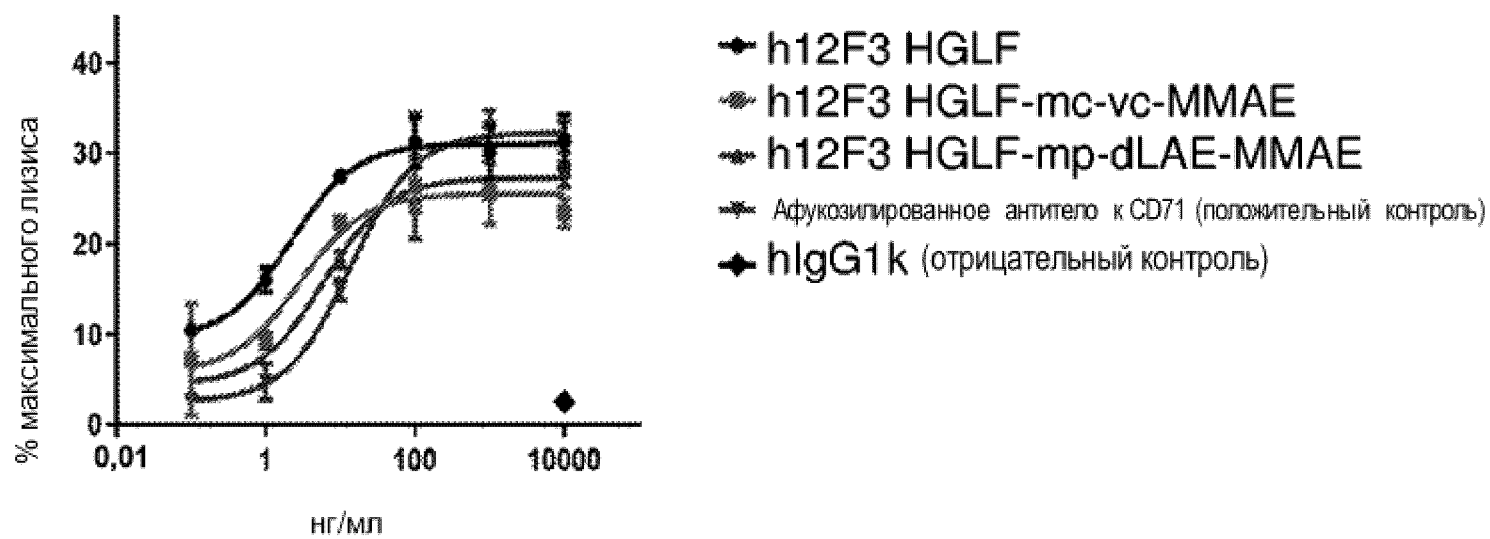
Фиг. 26 (Прод. 1)



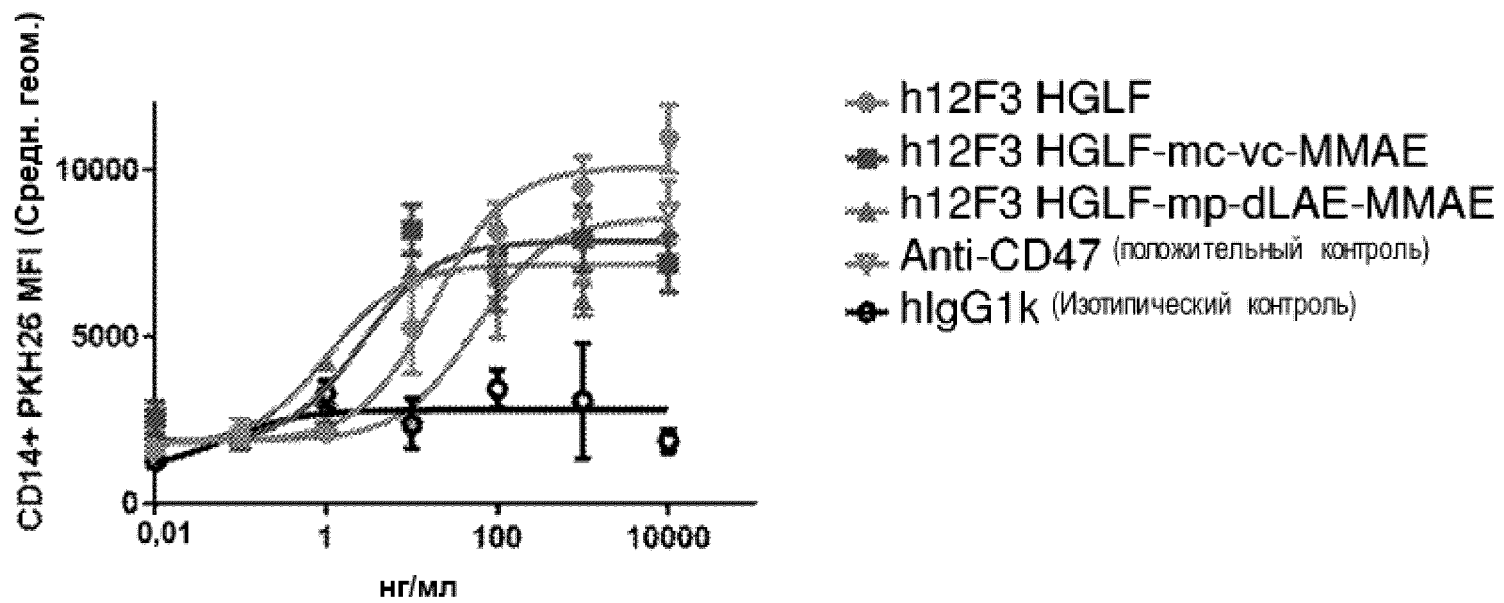
Фиг. 26 (Прод. 2)



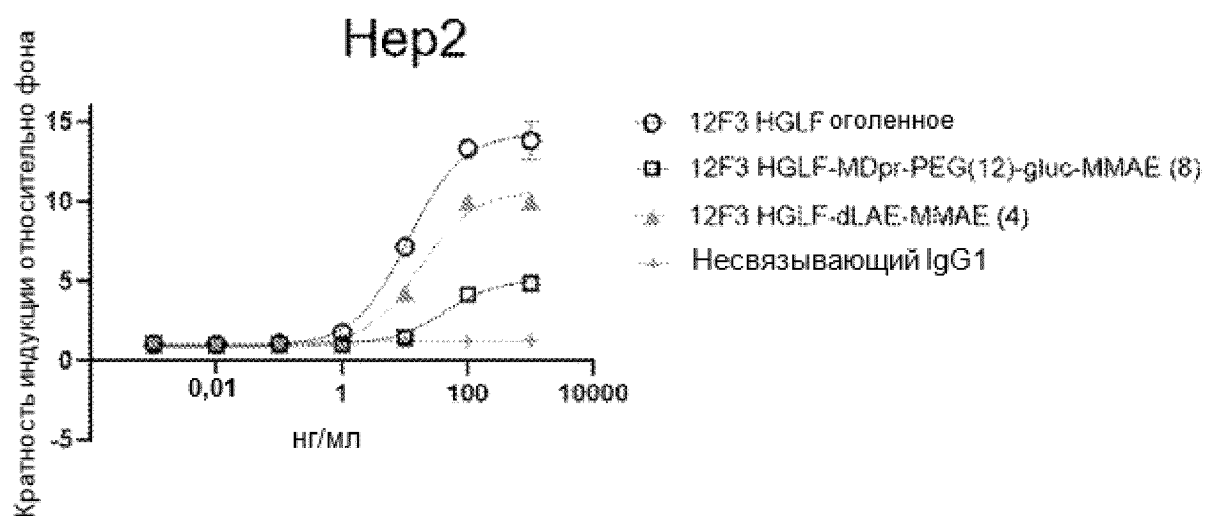
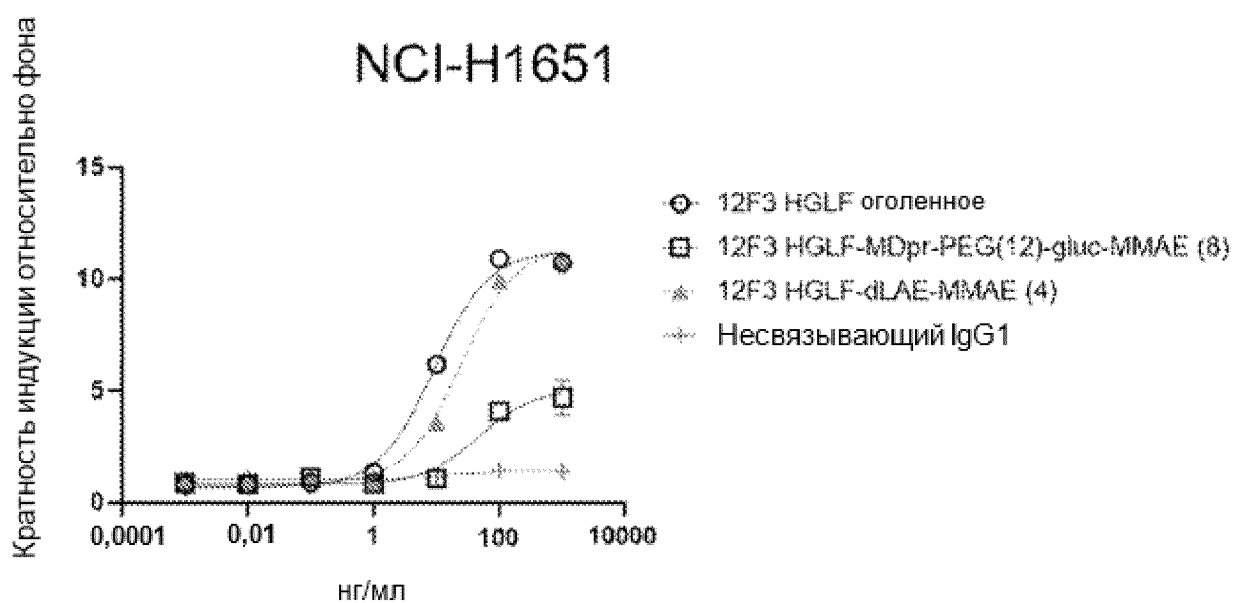
Фиг. 26 (Прод. 3)



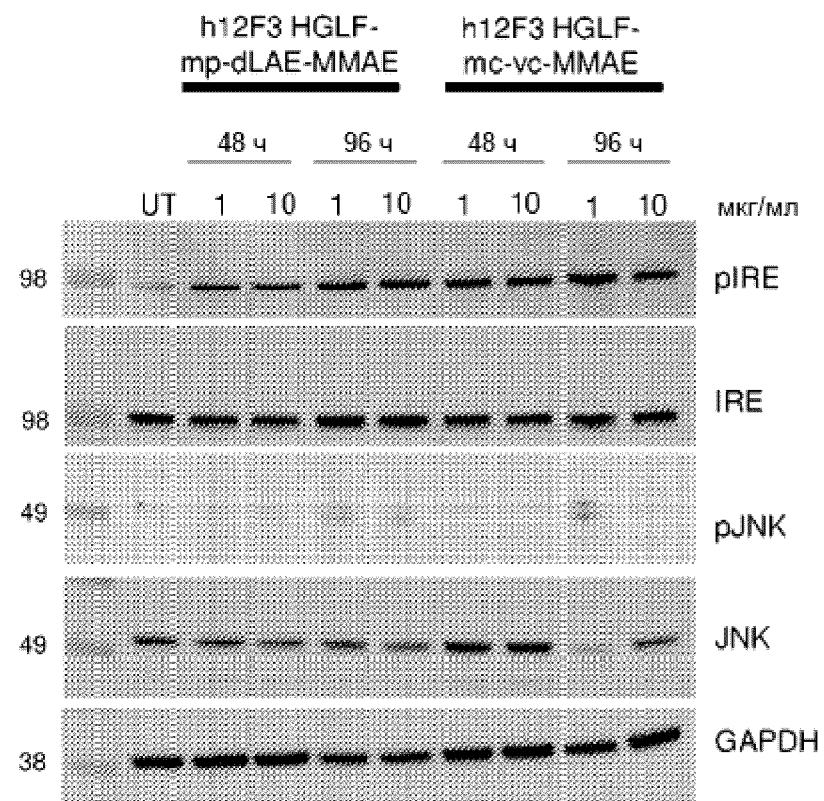
Фиг. 27



Фиг. 28



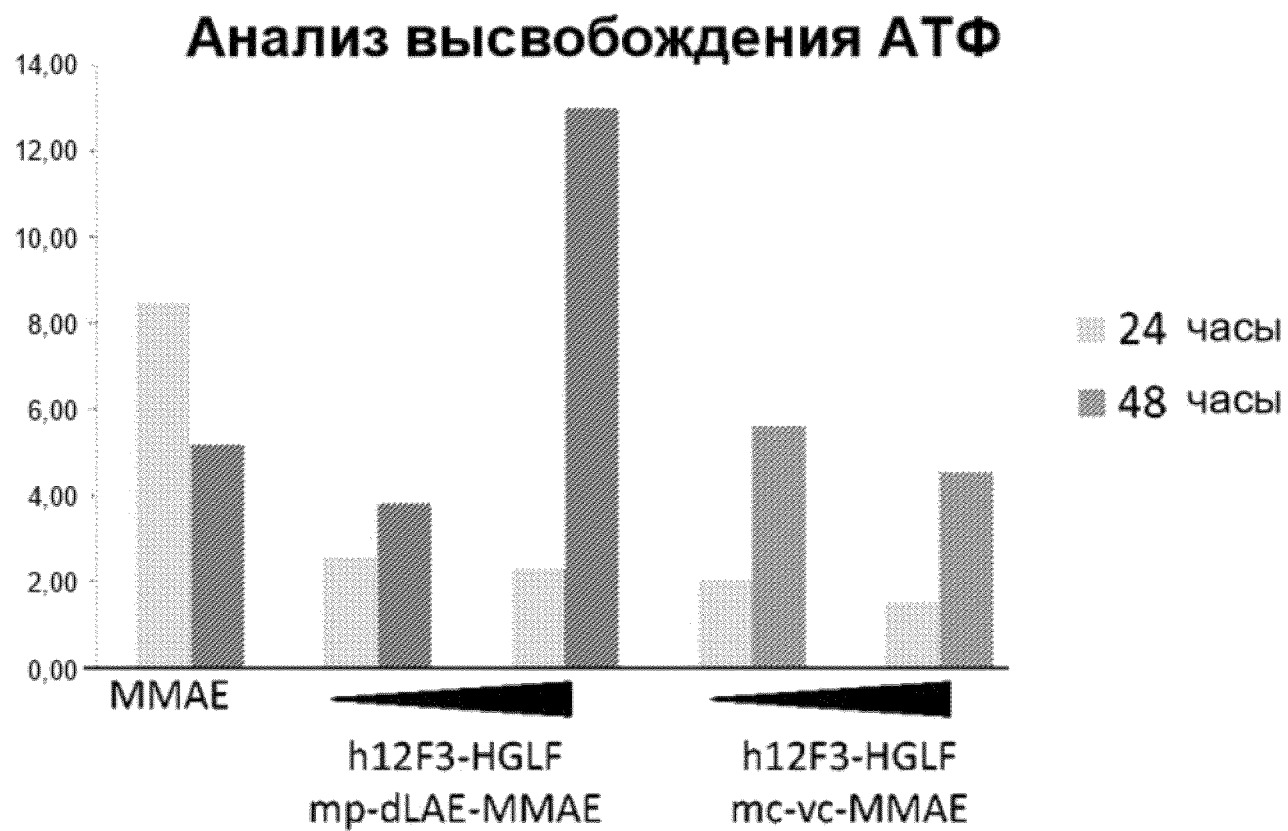
Фиг. 29



33/34

Фиг. 30

Кратность изменения относительно отсутствия обработки



Фиг. 31