

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(11) 046934

(13) B1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

- (45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.15
- (21) Номер заявки
202291523
- (22) Дата подачи заявки
2020.12.04
- (51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ $\alpha\upsilon\beta 6$ И КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

- (31) 62/943,959; 63/012,584
- (32) 2019.12.05; 2020.04.20
- (33) US
- (43) 2022.10.21
- (86) PCT/US2020/063390
- (87) WO 2021/113697 2021.06.10
- (71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СИДЖЕН ИНК. (US)
- (72) Изобретатель:
Райан Морин, Вестендорф Лори,
Мейер Эрик Брэдли, Костнер Хизер
Джин (US)
- (74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)
- (56) US-A1-20160017042
WO-A1-2019040608
US-A1-20160031992
US-A1-20120171699
US-A1-20160319032
US-A1-20160376368

-
- (57) Изобретение относится к новым антителам против $\alpha\upsilon\beta 6$ и конъюгатам антитело-лекарственное средство и способам применения таких антител против $\alpha\upsilon\beta 6$ и конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения злокачественных новообразований.

046934 B1

046934 B1

Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной заявке США № 62/943959, поданной 5 декабря 2019 г., и временной заявке США № 63/012584, поданной 20 апреля 2020 г., каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме для всех целей.

Ссылка на список последовательностей

Настоящая заявка включает список последовательностей в электронном формате в файле, названном AVB6-00212_ST25, созданном 16 ноября 2020 г., содержащем 52 КБ и, таким образом, включенном в настоящее описание в качестве ссылки.

Область техники

Настоящее изобретение относится к новым антителам против $\alpha\beta6$, конъюгатам антитело-лекарственное средство и способам применения таких антител против $\alpha\beta6$ и конъюгатов антитело-лекарственное средство для лечения злокачественных новообразований.

Уровень техники

$\alpha\beta6$, также известный как альфа- ν бета-6, является рецептором клеточной адгезии, связывающим белки внеклеточного матрикса, такие как фибронектин. $\alpha\beta6$ состоит из субъединицы альфа ν и субъединицы бета 6 и подвергается положительной регуляции во множестве злокачественных новообразований, включая немелкоклеточный рак легких (NSCLC).

NSCLC является наиболее распространенным типом рака легких. В прошлом году рак легких, являющийся основной причиной гибели от злокачественных новообразований, диагностировали у более чем 200000 людей. Таким образом, существует потребность в улучшенном лечении NSCLC.

Все цитируемые в настоящем описании ссылки, включая патентные заявки, патентные публикации и научную литературу, включены в него в качестве ссылки в полном объеме так, как если бы каждая отдельная ссылка была конкретно и отдельно включена в качестве ссылки.

Сущность изобретения

Настоящее изобретение относится к антителам против $\alpha\beta6$ и $\alpha\beta6$ -нацеленным конъюгатам антитело-лекарственное средство (ADC). Настоящее изобретение также относится к способам применения антител против $\alpha\beta6$ и их ADC для лечения $\alpha\beta6$ -экспрессирующих нарушений, включая злокачественные новообразования. Предпочтительные антитела против $\alpha\beta6$ содержат последовательности тяжелой цепи SEQ ID NO: 31, 32 и 33 и последовательности легкой цепи SEQ ID NO: 37, 42 и 39, что определяют посредством нумерации по Kabat.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны результаты анализа ELISA блокады LAP различными антителами против $\alpha\beta6$.

На фиг. 2 показаны результаты исследований насыщения связывания на клетках 293F, экспрессирующих $\alpha\beta6$ человека и яванского макака, с клоном мышинового антитела (обозначаемого как m2A2).

На фиг. 3 показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельной области тяжелой цепи родительского мышинового mAb (обозначаемого как m2A2) с выбранным человеческим акцептором зародышевой линии (обозначаемым как hIGHV1-46/HJ4) и гуманизированными вариантами тяжелой цепи 2A2. Звездочками указаны CDR, определенные по Kabat, и крестиками указаны CDR, определенные посредством IMGT.

На фиг. 4 показано выравнивание аминокислотных последовательностей вариабельной области легкой цепи родительского мышинового mAb (обозначаемого как m2A2) с выбранным человеческим акцептором зародышевой линии (обозначаемым как hIGKV1D-33/KJ2) и гуманизированными вариантами легкой цепи 2A2. Звездочками указаны CDR, определенные по Kabat, и крестиками указаны CDR, определенные посредством IMGT.

На фиг. 5 показаны результаты исследований конкурентного связывания на клетках 293F, экспрессирующих $\alpha\beta6$ человека, с гуманизированными антителами, имеющими легкие цепи LA и LB, и родительскими мышинными и химерными антителами (обозначаемыми как m2A2 и c2A2, соответственно).

На фиг. 6 показаны результаты исследований конкурентного связывания на клетках 293F, экспрессирующих $\alpha\beta6$ человека, с гуманизированными антителами, имеющими тяжелые цепи HA и HC, и родительскими мышинными и химерными антителами (обозначаемыми как m2A2 и c2A2, соответственно).

На фиг. 7 показаны повторные результаты исследований конкурентного связывания на клетках 293F, экспрессирующих $\alpha\beta6$ человека, с подгруппой гуманизированных антител и родительского мышинового антитела (обозначаемого как m2A2).

На фиг. 8 показаны результаты исследований насыщения связывания на клетках 293F, экспрессирующих $\alpha\beta6$ человека и яванского макака, с гуманизированным антителом h2A2 HCLG и родительским мышинным антителом (обозначаемым как m2A2).

На фиг. 9 показаны результаты исследований конкурентного связывания на клетках 293F, экспрессирующих $\alpha\beta6$ человека и яванского макака, с гуманизированным антителом HCLG и ADC.

На фиг. 10 показаны результаты исследований $\alpha\beta6$ -специфического связывания посредством

ELISA с $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ и $\alpha\beta 8$ человека с использованием гуманизованного антитела h2A2 HCLG.

На фиг. 11 показано, что ADC vsMMAE h2A2 HCLG против $\alpha\beta 6$ демонстрирует цитотоксичность *in vitro* против $\alpha\beta 6$ -экспрессирующих линий злокачественных клеток.

На фиг. 12 показаны результаты исследования ксенотрансплантации линии клеток рака головы и шеи Detroit 562 на бестимусных мышах. Доза и схема показаны на чертеже.

На фиг. 13 показаны результаты исследования ксенотрансплантации линии клеток рака поджелудочной железы HPAFII на бестимусных мышах. Доза и схема показаны на чертеже.

На фиг. 14 показаны результаты исследования ксенотрансплантации линии клеток рака поджелудочной железы VxPC-3 на бестимусных мышах. Доза и схема показаны на чертеже.

На фиг. 15 показаны результаты исследования ксенотрансплантации линии клеток рака мочевого пузыря SW780 на бестимусных мышах. Доза и схема показаны на чертеже.

На фиг. 16 показаны результаты исследования PDX на шести линиях клеток NSCLC на бестимусных мышах. ADC вводили в дозе 3 мг/кг q7dx3.

На фиг. 17 показаны результаты исследования PDX на шести линиях клеток карциномы яичника на бестимусных мышах. ADC вводили в дозе 5 мг/кг q7dx3.

На фиг. 18 показаны результаты сравнения h2A2 HCLG и h15H3 на двух моделях ксенотрансплантатов линий клеток. ADC вводили в дозе 3 мг/кг.

Подробное описание

I. Определения.

Для того чтобы сделать настоящее изобретение более понятным, сначала определены некоторые термины. В рамках изобретения, если в настоящем описании конкретно не указано иначе, каждый из следующих терминов должен иметь значение, указанное ниже. Дополнительные определения приведены на всем протяжении настоящей заявки.

Термин "и/или" при использовании в настоящем описании следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из двух указанных признаков или компонентов вместе с другим или без него. Таким образом, термин "и/или", как используют в настоящем описании в такой фразе, как "А и/или В", предназначен для включения "А и В", "А или В", "А" (в отдельности) и "В" (в отдельности). Аналогично, термин "и/или", как используют в такой фразе, как "А, В и/или С", предназначен для включения 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 (в отдельности); В (в отдельности) и С (в отдельности).

Следует понимать, что аспекты и варианты осуществления изобретения, представленные в настоящем описании, включают "содержащие", "состоящие" и "состоящие, по существу, из" аспектов и вариантов осуществления.

Если не указано иначе, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, обладают значением, общепринято понятным специалисту в области, к которой относится изобретение. Например, в Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; и Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press, приведены общие словари многих из терминов, используемых в настоящем описании.

Единицы, приставки и символы приведены в своей принятой форме из Международной системы единиц (СИ). Числовые диапазоны включают числа, определяющие диапазон. Заголовки в настоящем описании не ограничивают различные аспекты изобретения, на которые ссылаются в настоящем описании в целом. Таким образом, термины, определенные непосредственно ниже, полнее определены со ссылкой на описание в полном объеме.

Термины " $\alpha\beta 6$ ", "avb6", "альфа-в бета-6" или " $\beta 6$ " используют в настоящем описании взаимозаменяемо, и, если не указано иначе, они включают любые варианты, изоформы и видовые гомологи $\alpha\beta 6$ человека, как правило, экспрессируемые клетками или экспрессирующиеся на клетках, трансфицированных с использованием гена $\alpha\beta 6$.

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, где все четыре цепи соединены друг с другом дисульфидными связями. Структура иммуноглобулинов хорошо охарактеризована. См., например, Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)). В кратком изложении, каждая тяжелая цепь, как правило, состоит из варибельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании 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, как правило, соединены друг с другом дисульфидными связями в так называемой "шарнирной области". Каждая легкая цепь, как правило, состоит из варибельной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании 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. CL может иметь изотип κ (каппа) или λ (лямбда). Термины "константный домен" и "константная область" используют в настоящем описании взаимозаменяемо. Иммуноглобулин

можно получать из любого общеизвестного изотипа, включая, в качестве неограничивающих примеров, IgA, секреторный IgA, IgG и IgM. Подклассы IgG также хорошо известны специалисту в этой области и включают, в качестве неограничивающих примеров, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека. Термин "изотип" относится к классу или подклассу антитела (например, IgM или IgG1), кодируемому генами константной области тяжелой цепи.

Термин "вариабельная область" или "вариабельный домен" относится к домену тяжелой или легкой цепи антитела, участвующему в связывании антитела с антигеном. Вариабельные области тяжелой цепи и легкой цепи (V_H и V_L , соответственно) нативного антитела можно дополнительно разделять на области гипервариабельности (или гипервариабельные области, которые могут являться гипервариабельными по последовательности и/или форме структурно определенных петель), также обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, являющимися более консервативными и обозначаемыми как каркасные области (FR). Термины "определяющие комплементарность области" и "CDR", синонимичные относительно "гипервариабельных областей" или "HVR", известны в этой области для обозначения несмежных последовательностей аминокислот в вариабельных областях антитела, придающих специфичность к антигену и/или аффинность связывания. В основном, присутствуют три CDR в каждой вариабельной области тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) и три CDR в каждой вариабельной области легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3). Термины "каркасные области" и "FR" известны в этой области для обозначения не-CDR-частей вариабельных областей тяжелых и легких цепей. В основном, присутствуют 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 каждом V_H и V_L три CDR и четыре FR, как правило, расположены от аминоконца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4 (также см. Chothia and Lesk J. Mol. Biol., 195, 901-917 (1987)).

Термин "антитело" (Ab) в контексте настоящего изобретения относится к молекуле иммуноглобулина, фрагменту молекулы иммуноглобулина или производному любого из них, обладающему способностью специфически связываться с антигеном в типичных физиологических условиях со значительным временем полужизни, таким как по меньшей мере приблизительно 30 мин, по меньшей мере приблизительно 45 мин, по меньшей мере приблизительно один час (ч.), по меньшей мере приблизительно два часа, по меньшей мере приблизительно четыре часа, по меньшей мере приблизительно восемь часов, по меньшей мере приблизительно 12 ч, приблизительно 24 ч или более, приблизительно 48 ч или более, приблизительно три, четыре, пять, шесть, семь или более дней и т.д., или любой другой подходящий функционально определенный период (такой как время, достаточное для индуцирования, стимуляции, повышения и/или модуляции физиологического ответа, ассоциированного со связыванием антитела с антигеном, и/или время, достаточное для рекрутирования антитела эффекторной активности). Вариабельные области тяжелых и легких цепей молекулы иммуноглобулина содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител (Ab) могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (такие как эффекторные клетки) и компоненты системы комплемента, такие как C1q, первый компонент классического пути активации комплемента. Антитело также может являться биспецифическим антителом, диателом, полиспецифическим антителом или схожей молекулой.

В рамках изобретения термин "моноклональное антитело" относится к препарату молекул антител, полученных рекомбинантно, с одной первичной аминокислотной последовательностью, полученному из слитых В-клеток мыши. Композиция моноклонального антитела демонстрирует единую специфичность связывания и аффинность к конкретному эпитопу. Таким образом, термин "моноклональное антитело человека" относится к антителам, демонстрирующим одну специфичность связывания, имеющим вариабельные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Моноклональные антитела человека можно получать посредством гибридомы, включающей В-клетку, полученную из трансгенного или трансхромосомного, не являющегося человеком животного, такого как трансгенная мышь, имеющего геном, содержащий трансген тяжелой цепи человека и трансген легкой цепи, слитую с иммортализованной клеткой.

Термин "выделенное антитело" относится к антителу, по существу, не содержащему другие антитела, имеющие разные антигенные специфичности (например, выделенное антитело, специфически связывающееся с $\alpha\beta6$, по существу, не содержит антитела, специфически связывающиеся с иными антигенами, чем $\alpha\beta6$). Однако, выделенное антитело, специфически связывающееся с $\alpha\beta6$, может иметь перекрестную реактивность в отношении других антигенов, таких как молекулы $\alpha\beta6$ других биологических видов. Кроме того, выделенное антитело может, по существу, не содержать другой клеточный материал и/или химические вещества. В одном из вариантов осуществления выделенное антитело включает конъюгат антитела, соединенный с другим средством (например, низкомолекулярным лекарственным средством). В некоторых вариантах осуществления выделенное антитело против $\alpha\beta6$ включает конъюгат антитела против $\alpha\beta6$ с низкомолекулярным лекарственным средством (например, MMAE или MMAF).

Термин "антитело человека" (HuMAb) относится к антителу, имеющему вариабельные области, в которых и FR, и CDR получают из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Кроме того, если антитело содержит константную область, ее также получают из последовательностей иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека по изобретению могут включать аминокислотные остатки, некодируемые последовательностями иммуноглобулина зародышевой линии человека (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*). Однако, в рамках изобретения термин "антитело человека" не предназначен для включения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии другого вида млекопитающих, такого как мышь, пересеиваются на каркасные последовательности человека. Термины "антитела человека" и "полностью человеческие антитела" используют как синонимы.

В рамках изобретения термин "гуманизированное антитело" относится к генетически сконструированному, не принадлежащему человеку антителу, содержащему константные домены антитела человека и не принадлежащий человеку вариабельные домены, модифицированные так, что они имеют высокий уровень гомологии последовательности в отношении вариабельных доменов человека. Этого можно достигать посредством пересадки шести не принадлежащих человеку определяющих комплементарность областей антитела (CDR), которые вместе образуют антигенсвязывающий участок на гомологичной акцепторной каркасной области (FR) человека (см. WO92/22653 и EP0629240). Для полного восстановления аффинности связывания и специфичности родительского антитела может потребоваться замена каркасных остатков из родительского антитела (т.е. не принадлежащего человеку антитела) каркасными областями человека (обратные мутации). Моделирование структурной гомологии может помочь идентифицировать аминокислотные остатки в каркасных областях, важные для связывающих свойств антитела. Таким образом, гуманизированное антитело может содержать не принадлежащие человеку последовательности, главным образом каркасные области человека, необязательно, содержащие одну или более обратных мутаций аминокислот в не принадлежащую человеку аминокислотную последовательность, и полностью человеческие константные области. Необязательно, можно использовать дополнительные модификации аминокислот, которые могут не являться обратными мутациями, для получения гуманизированного антитела с предпочтительными характеристиками, такими как аффинность и биохимические свойства.

В рамках изобретения термин "химерное антитело", относится к антителу, где вариабельную область получают из не являющихся человеком видов (например, получают из грызунов), и константную область получают из другого биологического вида, такого как человек. Химерные антитела можно получать посредством конструирования антител. "Конструирование антител" является термином, используемым в общем смысле для разных типов модификаций антител и хорошо известным специалисту в этой области. В частности, химерное антитело можно получать стандартными способами ДНК, как описано в Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ch. 15. Таким образом, химерное антитело может являться генетически или ферментативно сконструированным рекомбинантным антителом. Специалисту в этой области известно, как получать химерное антитело, и, таким образом, получение химерного антитела по настоящему изобретению можно осуществлять иными способами, чем представленные в настоящем описании. Химерные моноклональные антитела для терапевтического использования разрабатывают для снижения иммуногенности антитела. Как правило, они могут содержать не принадлежащие человеку (например, мышьиные) вариабельные области, являющиеся специфическими для интересующего антигена, и константные домены тяжелой и легкой цепи антитела человека. Термины "вариабельная область" или "вариабельные домены" используют в контексте химерных антител в отношении области, содержащей CDR, и каркасных областей тяжелых и легких цепей иммуноглобулина.

Термин "антитело против антигена" относится к антителу, связывающемуся с антигеном. Например, антитело против $\alpha\upsilon\beta 6$ является антителом, связывающимся с антигеном $\alpha\upsilon\beta 6$.

Термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающий фрагмент" антитела относится к одному или более фрагментам антитела, сохраняющим способность специфически связываться с антигеном, связываемым целым антителом. Неограничивающие примеры фрагментов антител (например, антигенсвязывающего фрагмента) включают диатела; линейные антитела; одноцепочечные молекулы антител (например, scFv) и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Расщепление папаином антител приводит к образованию двух идентичных антигенсвязывающих фрагментов, названных "Fab"-фрагментами, каждый из которых имеет один антигенсвязывающий участок, и остаточного "Fc"-фрагмента, название которого отражает его способность легко кристаллизоваться. Обработка пепсином приводит к образованию F(ab')₂-фрагмента, имеющего два антигенсвязывающих участка и все равно способного к перекрестному связыванию антигена.

"Процент (%) идентичности последовательности" в отношении референсной полипептидной последовательности определяют как процентную долю аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, являющихся идентичными аминокислотным остаткам в референсной полипептидной

последовательности, после выравнивания последовательностей и внесения пропусков, при необходимости, для достижения максимального процента идентичности последовательности без учета каких-либо консервативных замен как части идентичности последовательности. Выравнивания в целях определения процента идентичности аминокислотных последовательностей можно достигать различными способами, известными специалистам в этой области, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как программное обеспечение BLAST, BLAST-2, SnapGene Align или ClustalW BioEdit. Специалисты в этой области могут определять соответствующие параметры для выравнивания последовательностей, включая любые алгоритмы, необходимые для достижения максимального выравнивания по всей длине сравниваемых последовательностей. Например, % идентичности указанной аминокислотной последовательности А в отношении указанной аминокислотной последовательности В (которую альтернативно можно называть указанной аминокислотной последовательностью А, имеющей некоторый % идентичности последовательности в отношении указанной аминокислотной последовательности В) вычисляют следующим образом:

$$100 \times X/Y,$$

где X является количеством аминокислотных остатков, подсчитываемым как идентичные совпадения последовательности при выравнивании А и В с помощью программы, и где Y является общим количеством аминокислотных остатков в В. Следует понимать, что, если длина аминокислотной последовательности А не равна длине аминокислотной последовательности В, % идентичности последовательности А в отношении В не будет равен % идентичности последовательности В в отношении А.

В рамках изобретения термины "связывание", "связывается" или "специфически связывается" в отношении связывания антитела с заранее определенным антигеном, как правило, означает связывание с аффинностью, соответствующей K_D приблизительно 10^{-6} М или менее, например, 10^{-7} М или менее, такой как приблизительно 10^{-8} М или менее, такой как приблизительно 10^{-9} М или менее, приблизительно 10^{-10} М или менее или приблизительно 10^{-11} М или даже менее при определении, например, посредством технологии интерферометрии биослоя (BLI) с помощью устройства Octet HTX с использованием антитела в качестве лиганда и антигена в качестве анализа, и где антитело связывается с заранее определенным антигеном с аффинностью, соответствующей K_D , являющейся по меньшей мере в десять раз более низкой, например, по меньшей мере в 100 раз более низкой, например, по меньшей мере в 1000 раз более низкой, такой как, по меньшей мере в 10000 раз более низкой, например, по меньшей мере в 100000 - раз более низкой, чем его K_D связывания с неспецифическим антигеном (например, BSA, казеином), иным, чем заранее определенный антиген или близкородственный антиген. Степень, в которой K_D связывания является более низкой, зависит от K_D антитела таким образом, что, если K_D антитела является очень низкой, то степень, с которой K_D связывания с антигеном является более низкой, чем K_D связывания с неспецифическим антигеном, может являться по меньшей мере в 10000 раз более низкой (т.е. антитело является высокоспецифическим).

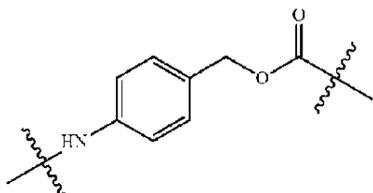
В рамках изобретения термин " K_D " (М) относится к равновесной константе диссоциации конкретного взаимодействия антитело-антиген. В рамках изобретения аффинность и K_D обратно пропорциональны, т.е. более высокая аффинность означает более низкую K_D , и более низкая аффинность означает более высокую K_D .

Термин "ADC" относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, который в контексте настоящего изобретения относится к антителу против $\alpha\upsilon\beta 6$, соединенному с остатком лекарственного средства (например, MMAE или MMAF), как описано в настоящей заявке.

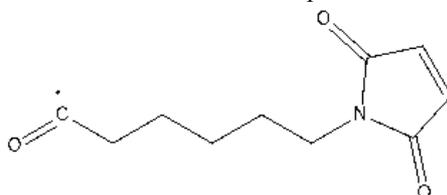
Сокращения "vc" и "val-cit" относятся к дипептиду валин-цитруллин.

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

Сокращение "PAB" относится к саморасщепляющемуся спейсеру:



Сокращение "MC" относится к вставке малеимидакапроила:



прогрессирования, развития, тяжести или рецидивирования симптома, осложнения, состояния или биохимических показателей, ассоциированных с заболеванием. В некоторых вариантах осуществления заболевание является злокачественным новообразованием.

Термин "индивидуум" включает любого человека или не являющегося человеком животного. Термин "не являющееся человеком животное" включает, в качестве неограничивающих примеров, позвоночных, таких как не являющиеся человеком приматы, овцы, собаки и грызуны, такие как мыши, крысы и морские свинки. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком. Термины "индивидуум" и "пациент" используют в настоящем описании взаимозаменяемо.

"Эффективное количество", или "терапевтически эффективное количество", или "терапевтически эффективная доза" лекарственного средства или терапевтического средства является любым количеством лекарственного средства, которое при использовании в отдельности или в комбинации с другим терапевтическим средством защищает индивидуума от дебюта заболевания или способствует регрессированию заболевания, о чем свидетельствует снижение тяжести симптомов заболевания, повышение частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания, или профилактике нарушения или потери трудоспособности по причине заболевания. Способность терапевтического средства способствовать регрессированию заболевания можно оценивать различными способами, известными специалисту в этой области, например, на людях во время клинических испытаний, в системах моделей на животных, являющихся прогностическими в отношении эффективности для людей, или посредством оценки активности средства в анализах *in vitro*.

В качестве примера, в случае лечения опухолей терапевтически эффективное количество противоопухолевого средства ингибирует рост клеток или рост опухоли по меньшей мере на приблизительно 10%, по меньшей мере на приблизительно 20%, по меньшей мере на приблизительно 30%, по меньшей мере на приблизительно 40%, по меньшей мере на приблизительно 50%, по меньшей мере на приблизительно 60%, по меньшей мере на приблизительно 70% или по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99% у подвергаемых лечению индивидуумов (например, одного или более подвергаемых лечению индивидуумов) относительно неподвергнутых лечению индивидуумов (например, одного или более неподвергнутых лечению индивидуумов). В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество противоопухолевого средства ингибирует рост клеток или рост опухоли на 100% у подвергнутых лечению индивидуумов (например, одного или более подвергнутых лечению индивидуумов) относительно неподвергнутых лечению индивидуумов (например, одного или более неподвергнутых лечению индивидуумов).

В других вариантах осуществления изобретения можно наблюдать регрессирование опухоли, и оно может продолжаться, в течение по меньшей мере приблизительно 20 дней, по меньшей мере приблизительно 30 дней, по меньшей мере приблизительно 40 дней, по меньшей мере приблизительно 50 дней или по меньшей мере приблизительно 60 дней.

Терапевтически эффективное количество лекарственного средства (например, конъюгата антитела против $\alpha\beta\gamma$ -лекарственное средство) включает "профилактически эффективное количество", являющееся любым количеством лекарственного средства, которое при введении в отдельности или в комбинации с противоопухолевым средством индивидууму, имеющему риск развития злокачественного новообразования (например, индивидууму, имеющему предзлокачественное состояние) или страдающему рецидивированием злокачественного новообразования, ингибирует развитие или рецидивирование злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления профилактически эффективное количество полностью предотвращает развитие или рецидивирование злокачественного новообразования. Термин "ингибирование" развития или рецидивирования злокачественного новообразования означает уменьшение вероятности развития или рецидивирования злокачественного новообразования или полное предотвращение развития или рецидивирования злокачественного новообразования.

В рамках изобретения термин "субтерапевтическая доза" означает дозу терапевтического соединения (например, конъюгата антитела против $\alpha\beta\gamma$ -лекарственное средство), меньшую, чем общепринятая или типичная доза терапевтического соединения при введении в отдельности для лечения гиперпролиферативного заболевания (например, злокачественного новообразования).

Термин "профиль иммуноопосредованного ответа" относится к профилю клинического ответа, зачастую наблюдаемого у пациентов со злокачественным новообразованием, которых лечат иммунотерапевтическими средствами, приводящими к противоопухолевым эффектам посредством индуцирования опухолеспецифических иммунных ответов или модификации нативных иммунных процессов. Этот профиль ответов отличается благоприятным терапевтическим эффектом, следующим за начальным повышением опухолевой нагрузки или появлением новых, которые при оценке общепринятых химиотерапевтических средств будут классифицировать как прогрессирование заболевания, и которое будет синонимично неэффективности лекарственного средства. Таким образом,

правильная оценка иммунотерапевтических средств может потребовать долговременного мониторинга эффектов этих средств в отношении целевого заболевания.

В качестве примера, "противоопухолевое средство" способствует регрессированию злокачественного новообразования у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективное количество лекарственного средства способствует регрессированию злокачественного новообразования до степени устранения злокачественного новообразования. Термин "способствование регрессированию злокачественного новообразования" означает, что введение эффективного количества лекарственного средства в отдельности или в комбинации с противоопухолевым средством приводит к снижению роста или размера опухоли, некрозу опухоли, снижению тяжести по меньшей мере одного симптома заболевания, повышению частоты и длительности бессимптомных периодов заболевания или профилактику нарушения или потери трудоспособности по причине заболевания. Кроме того, термины "эффективный" и "эффективность" в отношении лечения включают фармакологическую эффективность и физиологическую безопасность. Термин "фармакологическая эффективность" относится к способности лекарственного средства способствовать регрессированию злокачественного новообразования у пациента. Термин "физиологическая безопасность" относится к уровню токсичности или других побочных физиологических эффектов на уровне клеток, органа и/или организма (неблагоприятных эффектов), являющихся результатом введения лекарственного средства.

Термин "устойчивый ответ" относится к устойчивому эффекту в отношении снижения роста опухоли после прекращения лечения. Например, размер опухоли может оставаться таким же или уменьшаться по сравнению с размером в начале фазы введения. В некоторых вариантах осуществления устойчивый ответ имеет длительность, являющуюся по меньшей мере той же, что и длительность лечения или по меньшей мере в 1,5, 2,0, 2,5 или 3 раза большей, чем длительность лечения.

В рамках изобретения термин "полный ответ" или "CR" относится к исчезновению всех целевых очагов; термин "частичный ответ" или "PR" относится к по меньшей мере 30%-ному снижению суммы наибольших диаметров (SLD) целевых очагов, принимая в качестве референса исходную SLD; и термин "стабильное заболевание" или "SD" не относится ни к достаточному уменьшению целевых очагов для их классификации как PR, ни к достаточному повышению для их классификации как PD, принимая в качестве референса наименьшую SLD с начала лечения.

В рамках изобретения термин "выживаемость без прогрессирования" или "PFS" относится к продолжительности времени во время и после лечения, в течение которого подвергнутое лечению заболевание (например, злокачественное новообразование) не ухудшается. Выживаемость без прогрессирования может включать количество времени, в течение которого пациенты имеют полный ответ или частичный ответ, а также количество времени, в течение которого пациенты имеют стабильное заболевание.

В рамках изобретения "общая частота ответа" или "ORR" относится к сумме частоты полных ответов (CR) и частоты частичных ответов (PR).

В рамках изобретения термин "общая выживаемость" или "OS" относится к процентной доле индивидуумов в группе, которые, вероятно, будут живы после конкретного периода времени.

Фраза "фармацевтически приемлемый" означает, что вещество или композиция должна быть совместимой химически и/или токсикологически с другими ингредиентами, которые содержит состав, и/или млекопитающим, подвергаемым лечению с помощью них.

В рамках изобретения фраза "фармацевтически приемлемая соль" относится к фармацевтически приемлемым органическим или неорганическим солям соединения по изобретению. Неограничивающие примеры солей включают сульфат, цитрат, ацетат, оксалат, хлорид, бромид, йодид, нитрат, бисульфаты, фосфат, кислый фосфат, изоникотинат, лактат, салицилат, кислый цитрат, тартрат, олеат, таннат, пантотенат, битартрат, аскорбат, сукцинат, малеат, гентизинат, фумарат, глюконат, глюкуронат, сахарат, формиат, бензоат, глутамат, метансульфонат "мезилат", этансульфонат, бензолсульфонат, р-толуолсульфонат, памоат (т.е. 4,4'-метилден-бис-(2-гидрокси-3-нафтоат)), соли щелочных металлов (например, натрия и калия), соли щелочноземельных металлов (например, магния) и соли аммония. Фармацевтически приемлемая соль может включать включение другой молекулы, такой как ион ацетата, ион сукцината или другой противоион. Противоион может являться любым органическим или неорганическим остатком, стабилизирующим заряд на родительском соединении. Кроме того, фармацевтически приемлемая соль может иметь несколько заряженных атомов в своей структуре. Варианты, в которых множество заряженных атомов являются частью фармацевтически приемлемой соли, могут иметь множество противоионов. Таким образом, фармацевтически приемлемая соль может иметь один или более заряженных атомов и/или один или более противоионов.

Термин "введение" относится к физическому введению терапевтического средства индивидууму с использованием любых из различных способов и систем доставки, известных специалистам в этой области. Примеры путей введения конъюгата антитела против $\alpha\beta\delta$ -лекарственное средство включают внутривенный, внутримышечный, подкожный, интраперитонеальный, спинномозговой или другие парентеральные пути введения, например, посредством инъекции или инфузии (например, внутривенной

инфузии). В рамках изобретения фраза "парентеральное введение" означает способы введения, иные, чем энтеральное и топическое введение, как правило, посредством инъекции, и включает, в качестве неограничивающих примеров, внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, интратекальную, внутрилимфатическую, внутриочаговую, интракапсулярную, интраорбитальную, внутрисердечную, внутрикожную, интраперитонеальную, транстрахеальную, подкожную, субкутикулярную, внутрисуставную, субкапсулярную, субарахноидальную, интраспинальную, эпидуральную и внутригрудинную инъекцию и инфузию, а также электропорацию *in vivo*. Терапевтическое средство можно вводить непарентеральным путем или перорально. Другие непарентеральные пути включают топический, эпидермальный или слизистый путь введения, например, интраназальный, вагинальный, ректальный, сублингвальный или топический. Введение также можно осуществлять, например, однократно, множество раз и/или в течение одного или более длительных периодов.

Термины "исходный" или "исходное значение", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или характеристике симптома до введения терапевтического средства (например, конъюгата антитела против $\alpha\beta$ -лекарственное средство, как представлено в настоящем описании) или в начале введения терапевтического средства. Исходное значение можно сравнивать с референсным значением для определения снижения или улучшения симптома $\alpha\beta$ -ассоциированного заболевания, рассматриваемого в настоящем описании (например, злокачественного новообразования). Термины "референс" или "референсное значение", используемые в настоящем описании взаимозаменяемо, могут относиться к измерению или характеристике симптома после введения терапевтического средства (например, конъюгата антитела против $\alpha\beta$ -лекарственное средство, как описано). Референсное значение можно измерять один или более раз в течение схемы дозирования или цикла лечения или по завершении схемы дозирования или цикла лечения. "Референсное значение" может являться абсолютным значением; относительным значением; значением, имеющим верхний и/или нижний предел; диапазоном значений; усредненным значением; медианным значением; средним значением; или значением по сравнению с исходным значением.

Аналогично, "исходное значение" может являться абсолютным значением; относительным значением; значением, имеющим верхний и/или нижний предел; диапазоном значений; усредненным значением; медианным значением; средним значением; или значением по сравнению с референсным значением. Референсное значение и/или исходное значение можно получать от одного индивидуума, двух разных индивидуумов или группы индивидуумов (например, группы двух, трех, четырех, пяти или более индивидуумов).

В рамках изобретения термин "монотерапия" означает, что конъюгат антитела против $\alpha\beta$ -лекарственное средство является единственным противоопухолевым средством, вводимым индивидууму во время цикла лечения. Однако индивидууму можно вводить другие терапевтические средства. Например, противовоспалительные средства или другие средства, вводимые индивидууму со злокачественным новообразованием для лечения симптомов, ассоциированных со злокачественным новообразованием, но не самого основного злокачественного новообразования, включая, например, воспаление, боль, потерю веса и общее состояние, можно вводить в период монотерапии.

В рамках изобретения "нежелательное явление" (АЕ) является любым неблагоприятным и, как правило, незапланированным или нежелательным признаком (включая отклонения лабораторных показателей), симптомом или заболеванием, ассоциированным с использованием лечения. Лечение может иметь одно или более ассоциированных АЕ, и каждое АЕ может иметь тот же или иной уровень тяжести. Ссылка на способы, способные "изменять нежелательные явления", означает схему лечения, приводящую к снижению частоты и/или тяжести одного или более АЕ, ассоциированных с использованием другой схемы лечения.

В рамках изобретения "серьезное нежелательное явление" или "SAE" является нежелательным явлением, соответствующим одному из следующих критериев:

Является летальным или угрожающим жизни (как используют в определении серьезного нежелательного явления, термин "угрожающий жизни" относится к явлению, при котором пациент имел риск гибели на момент явления; он не относится к явлению, которое гипотетически может вызывать гибель, если бы оно было более тяжелым).

Приводит к постоянно или значительной недееспособности/нетрудоспособности.

Представляет собой врожденную аномалию/порок развития.

Является медицински значимым, т.е. его определяют как явление, которое может нести риск для пациента или может потребовать медицинского или хирургического вмешательства для профилактики одного из указанных выше исходов. При принятии решения о том, что АЕ является "медицински значимым", необходимо осуществлять медицинскую и научную оценку

Приводит к необходимости госпитализации или пролонгирования текущей госпитализации, исключая следующее: 1) рутинное лечение или мониторинг основного заболевания, неассоциированное с каким-либо ухудшением состояния; 2) выборочное или предварительно запланированное лечение ранее существовавшего состояния, несвязанное с показанием в рамках исследования и неухудшившееся с момента подписания информированного согласия; и 3) социальные причины и кратковременная

госпитализация взамен помощи ухаживающего лица в отсутствие какого-либо ухудшения общего состояния пациента.

Использование альтернативы (например, "или") следует понимать как означающее один, оба или любое сочетание альтернатив. В рамках изобретения термины в единственном числе следует понимать как относящиеся к "одному или более" из перечисленных или пронумерованных компонентов.

Термины "приблизительно" или "содержащий, по существу, из" относятся к значению или композиции, находящимся в приемлемом диапазоне ошибки для конкретного значения или композиции, определяемом специалистом в этой области, что будет зависеть частично от того, как измеряют или определяют значение или композицию, т.е. ограничений системы измерения. Например, термины "приблизительно" или "содержащий, по существу, из" могут означать в пределах 1 или более 1 стандартного отклонения в соответствии с практикой в этой области. Альтернативно, термины "приблизительно" или "содержащий, по существу, из" могут обозначать диапазон до 20%. Кроме того, особенно в отношении биологических систем или процессов, термины могут означать до порядка величины или до 5-кратного значения. Если не указано иначе, если конкретные значения или композиции приведены в заявке и формуле изобретения, значение "приблизительно" или "содержащий, по существу, из" следует рассматривать как находящееся в допустимом диапазоне ошибок для конкретного значения или композиции.

В настоящем описании ссылка на "приблизительное" значение или параметр включает варианты осуществления, относящиеся к этому значению или параметру самому по себе. Например, описание, относящееся к "приблизительно X", включает "X".

Как представлено в настоящем описании, любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в указанном диапазоне и, при необходимости, его доли (такие как одна десятая и одна сотая целого числа), если не указано иначе.

Различные аспекты изобретения более подробно описаны в следующих подразделах.

II. Общие сведения.

Изобретение относится к антителам, специфически связывающимся с $\alpha\upsilon\beta 6$. Настоящее изобретение частично основано на открытии того, что конъюгаты антитело-лекарственное средство, включая конъюгаты антитело-лекарственное средство vsMMAE, нацеленные на $\alpha\upsilon\beta 6$, особенно эффективны в уничтожении $\alpha\upsilon\beta 6^+$ -экспрессирующих клеток. Показано, что $\alpha\upsilon\beta 6$ экспрессируется в различных злокачественных новообразованиях, включая немелкоклеточный рак легких (NSCLC) (плоскоклеточный и железистый), рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи), рак пищевода, рак молочной железы (включая инвазивную карциному молочной железы), рак яичника, рак мочевого пузыря (включая уротелиальную карциному), рак кожи (плоскоклеточную карциному, или SCC), рак почки (включая светлоклеточный рак почки, папиллярную карциному почки и хромофобный почечно-клеточный рак), рак шейки матки, рак желудка, рак предстательной железы (включая аденокарциному предстательной железы), рак эндометрия (включая карциносаркому матки и рак тела матки), аденокарциному прямой кишки, карциному щитовидной железы, аденокарциному толстого кишечника, аденокарциному желудка и рак поджелудочной железы (включая аденокарциному поджелудочной железы).

III. Молекулы-мишени.

Если не указано иначе, термин " $\alpha\upsilon\beta 6$ " относится к $\alpha\upsilon\beta 6$ человека. Примеру последовательности $\beta 6$ человека приписан регистрационный номер Genbank AAA36122. Примеру последовательности $\alpha\upsilon$ человека приписан регистрационный номер NCBI NP_002201.1.

IV. Антитела по изобретению

Изобретение относится к антителу мыши и химерным, гуманизированным и человеческим антителам.

Аффинность антител по настоящему изобретению (например, химерных, гуманизированных и человеческих форм антитела мыши) к $\alpha\upsilon\beta 6$ человека, предпочтительно, эквивалентна аффинности антитела мыши к $\alpha\upsilon\beta 6$ человека, превышает аффинность антитела мыши к $\alpha\upsilon\beta 6$ человека или является в десять, пять или два раза более слабой, чем у антитела мыши, к $\alpha\upsilon\beta 6$ человека. Одним из способов измерения аффинности антитела к его антигену-мишени является определение кажущейся константы диссоциации антитела. Настоящее изобретение относится к антителам (например, химерным, гуманизированным и человеческим формам антитела мыши), имеющим кажущуюся константу диссоциации, по существу, такую же, как и у антитела мыши (т.е. в пределах ошибки эксперимента), а также антителам, имеющим константу диссоциации, более низкую или более высокую, чем у антитела мыши, к $\alpha\upsilon\beta 6$ человека. Химерные, гуманизированные и человеческие антитела специфически связываются с $\alpha\upsilon\beta 6$ человека в нативной форме и/или форме, рекомбинантно экспрессируемой клетками CHO, как и антитело мыши. Как правило, химерные, гуманизированные и человеческие антитела против $\alpha\upsilon\beta 6$ конкурируют с антителом мыши за связывание с $\alpha\upsilon\beta 6$ человека.

Предпочтительные антитела по изобретению ингибируют злокачественное новообразование (например, рост клеток, метастазирование и/или летальность для организмов), что показано на

злокачественных клетках, выращиваемых в культуре, в модели на животных или клиническом испытании. Модели на животных можно получать посредством имплантации $\alpha\beta6$ -экспрессирующих линий опухолевых клеток человека подходящим линиям грызунов с иммунодефицитом, например, бестимусным мышам или мышам SCID. Эти линии опухолевых клеток можно получать в грызунах с иммунодефицитом в виде солидной опухоли посредством подкожных инъекций или в виде диссеминированных опухолей посредством внутривенных инъекций. После развития в организме-хозяине, эти модели опухолей можно использовать для оценки терапевтической эффективности антител против $\alpha\beta6$ или их конъюгированных форм, как описано в примерах.

Как правило, антитела против $\alpha\beta6$ и/или конъюгаты антител против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство по изобретению связывается с $\alpha\beta6$, например, $\alpha\beta6$ человека, и осуществляют цитостатические и цитотоксические эффекты в отношении злокачественных клеток, таких как злокачественные клетки. Антитела против $\alpha\beta6$ по изобретению предпочтительно являются моноклональными и могут являться мультиспецифическими, человеческими, гуманизированными или химерными антителами, одноцепочечными антителами, Fab-фрагментами, F(ab')-фрагментами, фрагментами, продуцируемыми Fab-экспрессирующей библиотекой, и $\alpha\beta6$ -связывающими фрагментами любого из указанных выше. В некоторых вариантах осуществления антитела против $\alpha\beta6$ по изобретению специфически связываются с $\alpha\beta6$. Молекулы иммуноглобулинов по изобретению могут быть любого типа (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY), класса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подкласса молекулы иммуноглобулина.

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела против $\alpha\beta6$ являются антигенсвязывающими фрагментами (например, антигенсвязывающими фрагментами человека), как представлено в настоящем описании, и включают, в качестве неограничивающих примеров, Fab, Fab' и F(ab')₂, Fd, одноцепочечные Fv (scFv), одноцепочечные антитела, соединенные дисульфидными связями Fv (sdFv), и фрагменты, содержащие домен VL или VH. Антигенсвязывающие фрагменты, включая одноцепочечные антитела, могут содержать переменные области в отдельности или в комбинации с полным или частью следующего: шарнирной области и доменов CH1, CH2, CH3 и CL. В настоящее изобретение также включены антигенсвязывающие фрагменты, содержащие любую комбинацию переменных областей с шарнирной областью, доменами CH1, CH2, CH3 и CL. В некоторых вариантах осуществления антитела против $\alpha\beta6$ или их антигенсвязывающие фрагменты принадлежат человеку, мыши и крысе, ослу, овце, кролику, козе, морской свинке, верблюдовым, лошади, или курице.

Антитела против $\alpha\beta6$ по изобретению могут являться моноспецифическими, биспецифическими, триспецифическими или более мультиспецифическими. Мультиспецифические антитела могут являться специфическими для разных эпитопов $\alpha\beta6$ или и для $\alpha\beta6$, и для гетерологичного белка.

Антитела против $\alpha\beta6$ по изобретению можно описывать или определять в терминах конкретных CDR, которые они содержат. Точные границы аминокислотной последовательности указанной CDR или FR легко можно определять с использованием любой из ряда хорошо известных схем, включая описанные в Kabat et al. (1991), "Sequences of Proteins of Immunological Interest," 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (схема нумерации "Kabat"); Al-Lazikani et al., (1997) JMB 273,927-948 (схема нумерации "Chothia"), MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), "Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography," J. Mol. Biol. 262, 732-745 (схема нумерации "Contact"); Lefranc MP et al., "IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains," Dev Comp Immunol, 2003 Jan;27(1):55-77 (схема нумерации "IMGT"); Honegger A and Plückthun A, "Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains: an automatic modeling and analysis tool," J Mol Biol, 2001 Jun 8;309(3):657-70 (схема нумерации "Aho"); и Martin et al., "Modeling antibody hypervariable loops: a combined algorithm," PNAS, 1989, 86(23):9268-9272 (схема нумерации "AbM"). Границы указанной CDR могут варьироваться в зависимости от используемой схемы идентификации. В некоторых вариантах осуществления "CDR", или "определяющая комплементарность область", или отдельные определенные CDR (например, CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) указанного антитела или его области (например, его переменной области) следует понимать как включающую (или она будет специфической) CDR, определенную с помощью любой из указанных выше схем. Например, если указано, что конкретная CDR (например, CDR-H3) содержит аминокислотную последовательность соответствующей CDR в аминокислотной последовательности области V_H или V_L, следует понимать, что такая CDR имеет последовательность соответствующей CDR (например, CDR-H3) в переменной области, как определено с помощью любой из указанных выше схем. Можно определять схему идентификации конкретной CDR или нескольких CDR, такой как способ по Kabat, Chothia, AbM или IMGT.

В варианте осуществления последовательности антитела против $\alpha\beta6$ и конъюгатов антител против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, представленных в настоящем описании соответствуют схеме нумерации Kabat. В другом варианте осуществления последовательности антител против $\alpha\beta6$ и конъюгатов антител против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, представленных в настоящем описании, соответствуют схеме нумерации IMGT.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу против $\alpha\beta6$, содержащему

вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и/или где вариабельная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, где CDR антитела против $\alpha\beta 6$ определяют с помощью схемы нумерации Kabat. В других вариантах осуществления CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 40. В других вариантах осуществления CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 38 или 41.

В одном из аспектов настоящее изобретение относится к антителу против $\alpha\beta 6$, содержащему вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи содержит (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34, (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35, и (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; и/или где вариабельная область легкой цепи содержит (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43, (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44, и (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, где CDR антитела против $\alpha\beta 6$ определяют с помощью схемы нумерации IMGT.

Антитело против $\alpha\beta 6$, представленное в настоящем описании, может содержать любую подходящую последовательность вариабельного домена каркаса при условии, что антитело сохраняет способность связываться с $\alpha\beta 6$ (например, $\alpha\beta 6$ человека). В некоторых вариантах осуществления антител против $\alpha\beta 6$, представленных в настоящем описании, вариабельные домены тяжелых и легких цепей содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 17, соответственно. В некоторых вариантах осуществления антител против $\alpha\beta 6$, представленных в настоящем описании, тяжелые и легкие цепи содержат аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 21 и SEQ ID NO: 29, соответственно.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против $\alpha\beta 6$ и/или конъюгату антитело против $\alpha\beta 6$ -лекарственное средство, содержащему вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен тяжелой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98, или 99% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референсной последовательности и сохраняет способность связываться с $\alpha\beta 6$ (например, $\alpha\beta 6$ человека). В некоторых вариантах осуществления всего в SEQ ID NO: 6 от 1 до 10 аминокислот подвергнуто замене, инсерции и/или делеции. В других вариантах осуществления всего в SEQ ID NO: 6 от 3 до 10 аминокислот подвергнуто замене, инсерции и/или делеции. В некоторых вариантах осуществления замены, инсерции или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) находятся в областях внутри CDR. В некоторых вариантах осуществления замены, инсерции или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) находятся в областях вне CDR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело против $\alpha\beta 6$ содержит последовательность вариабельного домена тяжелой цепи SEQ ID NO: 6, включающую посттрансляционные модификации этой последовательности.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу против $\alpha\beta 6$ и/или конъюгату антитело против $\alpha\beta 6$ -лекарственное средство, содержащему вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17. В некоторых вариантах осуществления вариабельный домен легкой цепи, содержащий аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17, содержит замены (например, консервативные замены), инсерции или делеции относительно референсной последовательности и сохраняет способность связываться с $\alpha\beta 6$ (например, $\alpha\beta 6$ человека). В некоторых вариантах осуществления всего в SEQ ID NO: 17 от 1 до 10 аминокислот подвергнуто замене, инсерции и/или делеции. В других вариантах осуществления всего в SEQ ID NO: 17 от 1 до 2 аминокислот подвергнуто замене, инсерции и/или делеции. В некоторых вариантах осуществления замены, инсерции или делеции (например, 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот) находятся в областях внутри CDR (т.е. в FR). В некоторых вариантах осуществления антитело против $\alpha\beta 6$ содержит последовательность вариабельного домена легкой цепи SEQ ID NO: 17, включающую посттрансляционные модификации этой последовательности.

Существует пять классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, имеющих тяжелые цепи, обозначенные как α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Классы γ и α дополнительно разделяют на подклассы, например, люди экспрессируют следующие подклассы: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Антитела IgG1 могут существовать во множестве полиморфных вариантов, обозначенных как аллотипы (обзор в Jefferis and Lefranc 2009. mAbs Vol 1 Issue 41-7), любой из которых подходит для использования в некоторых из вариантов осуществления настоящего изобретения. Распространенными аллотипическими вариантами в популяциях людей являются те, которые обозначают буквами a, f, n, z или их комбинациями. В любом из вариантов осуществления настоящего изобретения антитело может содержать Fc-область тяжелой цепи, содержащую Fc-область IgG человека. В дополнительных вариантах осуществления Fc-область IgG человека содержит IgG1 человека.

Антитела по изобретению также включают производные, являющиеся модифицированными, т.е. посредством ковалентного присоединения любого типа молекулы к антителу, таким образом, что ковалентное присоединение не предотвращает связывание антитела с $\alpha\beta$ или вызывание цитостатического или цитотоксического эффекта в отношении клеток HD. В качестве неограничивающих примеров, производные антител включают антитела, модифицированные, например, посредством гликозилирования, ацетилирования, пегилирования, фосфорилирования, амидирования, дериватизации с помощью известных защитных/блокирующих групп, протеолитического расщепления, связывания с клеточным лигандом или другим белком, и т.д. Любую из многочисленных химических модификаций можно осуществлять известными способами, включая, в качестве неограничивающих примеров, специфическое химическое расщепление, ацетилирование, формилирование, метаболический синтез туникамицина и т.д. Кроме того, производное может содержать одну или более неклассических аминокислот.

Гуманизированные антитела.

Гуманизированное антитело является генетически сконструированным антителом, в котором CDR из не принадлежащего человеку "донорного" антитела пересаживают на человеческие "акцепторные" последовательности антитела (см., например, Queen, патенты США №№ 5530101 и 5585089; Winter, патент США № 5225539; Carter, патент США № 6407213; Adair, патент США № 5859205; м Foote, патент США № 6881557). Акцепторные последовательности антитела могут являться, например, последовательностью зрелого антитела человека, составной структурой из таких последовательностей, консенсусной последовательностью из последовательностей антитела человека или последовательностью области зародышевой линии. Предпочтительной акцепторной последовательностью для тяжелой цепи является экзон IGHV1-46 V_H зародышевой линии и для экзона J (J_H) - экзон IGHJ4. Для легкой цепи предпочтительной акцепторной последовательностью является экзон IGKV1D-33 и в случае J - экзон IGKJ2. Альтернативные предпочтительные акцепторные последовательности для тяжелой цепи включают экзоны J (J_H), IGHJ1, IGHJ2, IGHJ3, IGHJ5 или IGHJ6. Альтернативные предпочтительные акцепторные последовательности для легкой цепи включают экзоны J IGKJ1, IGKJ3, IGKJ4 или IGKJ5. Таким образом, гуманизированное антитело является антителом, имеющим некоторые или все CDR полностью или по существу из донорного антитела и последовательности каркаса варибельной области и константных областей, при их наличии, полностью или по существу из последовательностей антитела человека. Аналогично, гуманизированная тяжелая цепь имеет по меньшей мере одну, две и, как правило, все три CDR полностью или по существу из тяжелой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность варибельной области тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, при их наличии, по существу из последовательностей каркаса варибельной области и константной области тяжелой цепи человека. Аналогично, гуманизированная легкая цепь имеет по меньшей мере одну, две и, как правило, все три CDR полностью или по существу из легкой цепи донорного антитела, и каркасную последовательность варибельной области легкой цепи и константную область легкой цепи, при их наличии, по существу из последовательностей каркаса варибельной области и константной области легкой цепи человека. За исключением нанотел и dAb, гуманизированное антитело содержит гуманизированную тяжелую цепь и гуманизированную легкую цепь. CDR в гуманизированном антителе, по существу, получена из соответствующей CDR в не принадлежащем человеку антителе, если по меньшей мере 60%, 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков (как определено по Kabat) идентичны между соответствующими CDR. Каркасные последовательности варибельной области цепи антитела или константная область цепи антитела, по существу, получены из каркасной последовательности варибельной области человека или константной области человека, соответственно, если по меньшей мере 85%, 90%, 95% или 100% соответствующих остатков, определенных по Kabat, являются идентичными.

Хотя гуманизированные антитела зачастую включают все шесть CDR (предпочтительно, определенные по Kabat) из антитела мыши, их также можно получать таким образом, что не все CDR (например, по меньшей мере, 3, 4 или 5) получены из антитела мыши (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; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

Некоторые аминокислоты из каркасных остатков варибельной области человека можно выбирать

для замены на основе их возможного влияния на конформацию и/или связывание с антигеном. Исследование такого возможного влияния осуществляют посредством моделирования, изучения характеристик аминокислот в конкретных локациях или эмпирического наблюдения эффектов замены или мутагенеза конкретных аминокислот.

Например, если аминокислота отличается между каркасным остатком вариательной области мыши и выбранным каркасным остатком вариательной области человека, аминокислоту каркаса человека можно заменять эквивалентной аминокислотой каркаса антитела мыши, когда разумно ожидать, что аминокислота:

- (1) нековалентно связывается с антигеном напрямую,
- (2) является смежной с областью CDR,
- (3) иным образом взаимодействует с областью CDR (например, находится в пределах приблизительно 6 Å от области CDR); или
- (4) опосредует взаимодействие между тяжелыми и легкими цепями.

Хотя антитело 2A2 идентифицировано как антитело мыши, настоящая заявка также включает антитела 2A2 человека. Термин "антитело 2A2 человека" означает антитело, полученное из последовательностей генов иммуноглобулинов человека и имеющее CDR, по существу, идентичные CDR антитела мыши, и демонстрирующие схожие свойства, т.е. специфичность связывания с $\alpha\text{v}\beta 6$. В некоторых аспектах антитело 2A2 человека содержит вариательную область тяжелой цепи, по существу, идентичную вариательной области тяжелой цепи, представленной в настоящем описании, и/или вариательную область легкой цепи, по существу, идентичную вариательной области легкой цепи, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления антитело 2A2 по настоящему изобретению не является антителом человека, например, антитело 2A2 по настоящему изобретению является мышинным, химерным или гуманизированным антителом.

Один из аспектов изобретения относится к гуманизированным формам антитела 2A2 мыши. Один из таких гуманизированных вариантов антитела 2A2 мыши обозначают как HCLG. HCLG содержит зрелую вариательную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и зрелую вариательную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17. Гуманизированные антитела по изобретению включают варианты гуманизированного антитела HCLG, в котором гуманизированная зрелая вариательная область тяжелой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичности в отношении SEQ ID NO: 6, и гуманизированная зрелая вариательная область легкой цепи демонстрирует по меньшей мере 90%, 95% или 99% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 17. Предпочтительно, в таких антителах сохраняются некоторые или все из обратных мутаций в HCLG. Другими словами, по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 или предпочтительно все 9 из положений тяжелой цепи H2, H28, H48, H67, H69, H71, H73, H78 и H93 заняты F, S, I, A, L, V, K, A и T, соответственно. Аналогично, положение L69, предпочтительно, занято R, и L71, предпочтительно, занято Y. Области можно определять с помощью любого общепринятого определения (например, по Chothia), но, предпочтительно, определяют по Kabat или IMGT. В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR SEQ ID NO: 6 и каркасы вариательной области с по меньшей мере 95% идентичности в отношении каркасов вариательной области SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, содержащую 3 CDR SEQ ID NO: 17 и каркасы вариательной области с по меньшей мере 95% идентичности в отношении каркасов вариательной области SEQ ID NO: 17. В дополнительном варианте осуществления гуманизированное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR SEQ ID NO: 6 и каркасы вариательной области с по меньшей мере 98% идентичности в отношении каркасов вариательной области SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, содержащую 3 CDR SEQ ID NO: 17 и каркасы вариательной области с по меньшей мере 98% идентичности в отношении каркасов вариательной области SEQ ID NO: 17. В одном из вариантов осуществления гуманизированное антитело содержит тяжелую цепь, содержащую 3 CDR SEQ ID NO: 6 и каркасы вариательной области с по меньшей мере 99% идентичности в отношении каркасов вариательной области SEQ ID NO: 6. В другом варианте осуществления гуманизированное антитело содержит легкую цепь, содержащую 3 CDR SEQ ID NO: 17 и каркасы вариательной области с по меньшей мере 99% идентичности в отношении каркасов вариательной области SEQ ID NO: 17.

Одним из возможных вариантов является замена некоторых остатков в CDR антитела мыши соответствующими остатками из последовательностей CDR человека, как правило, из CDR акцепторных последовательностей человека, используемых в дизайне примеров гуманизированных антител. В некоторых антителах только часть CDR, а именно подгруппы остатков CDR, необходимых для связывания, обозначаемых как SDR, необходимы для сохранения связывания в гуманизированном антителе. Остатки, не контактирующие с антигеном и не находящиеся в SDR, можно идентифицировать с учетом предыдущих исследований (например, остатки H60-H65 в CDR H2 зачастую не требуются), из областей CDR по Kabat, находящихся вне гипервариабельных петель по Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987), посредством молекулярного моделирования и/или эмпирически, или как описано в Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863 (2004). В таких гуманизированных антителах в положениях, в

которых один или более донорных остатков CDR отсутствуют, или в которых вся донорная CDR отсутствует, аминокислота, занимающая положение, может являться аминокислотой, занимающей соответствующее положение (при нумерации по Kabat) в акцепторной последовательности антитела. Количество таких замен акцепторных аминокислот на донорные аминокислоты в CDR, подлежащих включению, отражает баланс вопросов конкуренции. Такие замены являются потенциально благоприятными для снижения количества аминокислот мыши в гуманизованном антителе и, таким образом, снижения потенциальной иммуногенности. Однако замены также могут вызывать изменения аффинности, а предпочтительно избегать значительного снижения аффинности. Положения для замены в CDR и аминокислоты для замены также можно выбирать эмпирически.

Хотя это и не предпочтительно, можно осуществлять другие замены аминокислот, например, в каркасных остатках, неконтактирующих с CDR, или даже некоторых потенциальных CDR-контактирующих остатков аминокислот в CDR. Зачастую замены, сделанные в вариантах гуманизованных последовательностей, являются консервативными в отношении замененных аминокислот HCLG. Предпочтительно, замены относительно HCLG (консервативные или нет) не имеют существенного эффекта в отношении аффинности связывания или активности гуманизованного mAb, т.е. его способности связываться с $\alpha\beta$ человека и ингибировать рост злокачественных клеток.

Выбор константной области.

Вариабельные области тяжелой и легкой цепи гуманизованных антител можно соединять с по меньшей мере частью константной области человека. Выбор константной области частично зависит от того, являются ли желательными антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз и/или обусловленная комплементом цитотоксичность. Например, изотипы IgG1 и IgG3 человека имеют сильную комплементзависимую цитотоксичность, изотип человека IgG2 - слабую комплементзависимую цитотоксичность, и у IgG4 человека отсутствует комплементзависимая цитотоксичность. IgG1 и IgG3 человека также индуцируют более сильные клеточно-опосредованные эффекторные функции, чем IgG2 и IgG4 человека. Константные области легкой цепи могут являться лямбда или каппа. Антитела могут экспрессироваться в виде тетрамеров, содержащих две легкие и две тяжелые цепи, в виде отдельных тяжелых цепей, легких цепей, в виде Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv, или в виде одноцепочечных антител, в которых вариабельные домены тяжелых и легких цепей соединены с помощью спейсера.

Константные области человека демонстрируют аллотипическую вариацию и изоаллотипическую вариацию между разными индивидуумами, т.е. константные области могут отличаться у разных индивидуумов в одном или более полиморфных положениях. Изоаллотипы отличаются от аллотипов тем, что сыворотки, распознающие изоаллотип, связываются с непалиморфной областью одного или более других изотипов.

Одна или несколько аминокислот на amino- или карбоксиконце легкой и/или тяжелой цепи, такие как C-концевой лизин тяжелой цепи, могут отсутствовать, или их можно дериватизировать в части или всех из молекул. Замены можно осуществлять в константных областях для снижения или повышения эффекторных функций, таких как комплементзависимая цитотоксичность или ADCC (см., 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 пролонгирования времени полужизни у людей (см., например, Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004).

Примеры замен включают замену нативной аминокислоты остатком цистеина, встраиваемую в положение аминокислоты 234, 235, 237, 239, 267, 298, 299, 326, 330 или 332, предпочтительно, мутацию S239C в изотипе человека IgG1 (US 20100158909). Наличие дополнительного остатка цистеина делает возможным образование межцепочечной дисульфидной связи. Такое образование межцепочечной дисульфидной связи может вызывать стерическое затруднение, таким образом, снижая аффинность связывающего взаимодействия Fc-область-FcγR. Остатки цистеина, встроенные в Fc-область константной области IgG или вблизи нее, также могут служить в качестве участков для конъюгации с терапевтическими средствами (т.е. присоединения цитотоксических лекарственных средств с использованием тиол-специфических реагентов, таких как малеимидные производные лекарственных средств). Наличие терапевтического средства вызывает стерическое затруднение, таким образом, дополнительно снижая аффинность связывающего взаимодействия Fc-область-FcγR. Другие замены в любом из положений 234, 235, 236 и/или 237 снижают аффинность к рецепторам Fcγ, в частности, рецептору FcγRI (см., например, патент США № 6624821, патент США № 5624821).

Время полужизни антитела *in vivo* также может влиять на его эффекторные функции. Время полужизни антитела можно повышать или снижать для модификации его терапевтических активностей. FcRn является рецептором, структурно схожим с антигеном MHC класса I, нековалентно связывающимся с β2-микроглобулином. FcRn регулирует катаболизм IgG и их трансцитоз через ткани (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 IgG возвращаться обратно в циркуляцию (Ghetie and Ward, 2000, Ann. Rev. Immunol. 18:739-766; Ghetie and Ward, 2002, Immunol. Res. 25:97-113). Картирована область на IgG1

человека, участвующая в связывании FcRn (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Аланиновые замены в положениях Pro238, Thr256, Thr307, Gln311, Asp312, Glu380, Glu382 или Asn434 IgG1 человека повышают связывание FcRn (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). Молекулы IgG1, несущие эти замены, имеют большее время полужизни в сыворотке. Таким образом, эти модифицированные молекулы IgG1 могут выполнять свои эффекторные функции и, таким образом, демонстрировать свою терапевтическую эффективность в течение большего периода времени по сравнению с немодифицированным IgG1. Другие примеры замен для повышения связывания с FcRn включают Gln в положении 250 и/или Leu в положении 428. Нумерацию EU используют для всех положений в константной области.

Олигосахариды, ковалентно присоединенные к консервативному Asn297, вовлечены в способность Fc-области IgG связываться с FcγR (Lund et al., 1996, J. Immunol. 157:4963-69; Wright and Morrison, 1997, Trends Biotechnol. 15:26-31). Конструирование этой гликоформы на IgG может значительно улучшать IgG-опосредованную ADCC. Добавление модификаций N-ацетилглюкозамина в точках ветвления (Umana et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotech. Bioeng. 74:288-94) в 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, улучшающего связывание между Fc и FcγR и, таким образом, повышающего активность Ig-опосредованной ADCC.

С помощью системной замены гидрофильных аминокислот Fc-области IgG1 человека получали варианты IgG с измененными аффинностями связывания FcγR (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604). При сравнении с родительским IgG1, подгруппа этих вариантов, включающих замены Thr256/Ser298, Ser298/Glu333, Ser298/Lys334 или Ser298/Glu333 Lys334 на Ala, демонстрирует повышение аффинности связывания с FcγR и активности ADCC (Shields et al., 2001, J. Biol. Chem. 276:6591-604; Okazaki et al., 2004, J. Mol. Biol. 336:1239-49).

Активность связывания комплемента антителами (связывание C1q и активность CDC) можно улучшать посредством замен в Lys326 и Glu333 (Idusogie et al., 2001, J. Immunol. 166:2571-2575). С помощью тех же замен в остоле IgG2 человека можно превращать изотип антитела, плохо связывающийся с C1q и имеющий выраженный дефицит активности активации комплемента, в изотип, способный связываться с C1q и опосредовать CDC (Idusogie et al., 2001, J. Immunol. 166:2571-75). Для улучшения активности связывания комплемента антител также используют несколько других способов. Например, пересаживание карбокси-концевого хвоста из 18 аминокислот IgM на карбокси-концы IgG значительно повышает их активность CDC. Это наблюдали даже в случае IgG4, который в норме не обладает детектируемой активностью CDC (Smith et al., 1995, J. Immunol. 154:2226-36). Кроме того, замена Ser444, локализуемая вблизи карбокси-конца тяжелой цепи IgG1 на Cys индуцировала димеризацию "хвост-к-хвосту" IgG1 с 200-кратным повышением активности CDC относительно мономерного IgG1 (Shopes et al., 1992, J. Immunol. 148:2918-22). Кроме того, конструкция биспецифического диатела со специфичностью к C1q также придает активность CDC (Kontermann et al., 1997, Nat. Biotech. 15:629-31).

Активность комплемента можно снижать посредством мутации по меньшей мере одного из аминокислотных остатков 318, 320 и 322 тяжелой цепи в остаток, имеющий другую боковую цепь, такой как Ala. Другие алкил-замещенные неионные остатки, такие как Gly, Ile, Leu или Val, или такие ароматические неполярные остатки, как Phe, Tyr, Trp и Pro, вместо любого из трех остатков также снижают или устраняют связывание C1q. Для снижения или устранения активности связывания C1q можно использовать Ser, Thr, Cys и Met в остатках 320 и 322, но не 318.

Замена остатка 318 (Glu) полярным остатком может модифицировать, но не устранять активность связывания C1q. Замена остатка 297 (Asn) на Ala приводит к устранению литической активности, но лишь немного снижает (приблизительно в три раза слабее) аффинность к C1q. Это изменение разрушает участок гликозилирования и наличие углевода, необходимого для активации комплемента. Любая другая замена в этом участке также разрушает участок гликозилирования. Следующие мутации и любая их комбинация также снижают связывание C1q: D270A, K322A, P329A и P311S (см. WO 06/036291). Мутация L234A/L235A (или мутация LALA) также снижает связывание C1q, а также связывание FcγR.

Ссылка на константную область человека включает константную область с любым природным аллотипом или любую пермутацию остатков, занимающих полиморфные положения в природных аллотипах. Кроме того, могут присутствовать до 1, 2, 5 или 10 мутаций относительно природной константной области человека, таких как указанные выше, для снижения связывания рецептора Fcγ или повышения связывания с FcRN.

V. Экспрессия рекомбинантных антител.

Гуманизированные антитела, как правило, получают посредством рекомбинантной экспрессии. Конструкции рекомбинантных полинуклеотидов, как правило, включают последовательность контроля экспрессии, функционально связанную с кодирующими последовательностями цепей антитела, включая природно-ассоциированные или гетерологичные промоторные области. Предпочтительно, последовательности контроля экспрессии представляют собой эукариотические промоторные системы в

векторах, с помощью которых можно трансформировать или трансфицировать эукариотические клетки-хозяева. После встраивания вектора в подходящий организм-хозяин, организм-хозяин поддерживает в условиях, подходящих для высокого уровня экспрессии нуклеотидных последовательностей и сбора и очистки перекрестно реагирующих антител.

Клетки млекопитающих являются предпочтительными хозяевами для экспрессии нуклеотидных сегментов, кодирующих иммуноглобулины или их фрагменты. См. Winnacker, *From Genes to Clones*, (VCH Publishers, NY, 1987). В этой области разработан ряд подходящих линий клеток-хозяев, способных секретировать интактные гетерологичные белки, и они включают линии клеток CHO (например, DG44), различные линии клеток COS, клетки HeLa, клетки HEK293, L-клетки и непродуцирующие антитела миеломы, включая Sp2/0 и NS0. Предпочтительно, клетки не принадлежат человеку. Экспрессирующие векторы для этих клеток могут включать последовательности контроля экспрессии, такие как участок начала репликации, промотор, энхансер (Queen et al., *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)) и необходимые участки для процессинга информации, такие как участки связывания рибосомы, участки сплайсинга РНК, участки полиаденилирования и последовательности терминации транскрипции. Предпочтительными последовательностями контроля экспрессии являются промоторы, полученные из эндогенных генов, цитомегаловируса, SV40, аденовируса, папилломавируса крупного рогатого скота и т.п. См. Co et al., *J. Immunol.* 148:1149 (1992).

После экспрессии антитела можно очищать стандартными способами, включая очистку ВЭЖХ, хроматографию на колонках, электрофорез в геле и т.п. (в целом, см. Scopes, *Protein Purification* (Springer-Verlag, NY, 1982)).

VI. Нуклеиновые кислоты.

Изобретение дополнительно относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим любые из гуманизованных тяжелых и легких цепей, описанных выше. Как правило, нуклеиновые кислоты также кодируют сигнальный пептид, слитый со зрелыми тяжелыми и легкими цепями. Кодирующие последовательности на нуклеиновых кислотах могут находиться в функциональной связи с регуляторными последовательностями для обеспечения экспрессии кодирующих последовательностей, таких как промотор, энхансер, участок связывания рибосомы, сигнал терминации транскрипции и т.п. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, могут находиться в выделенной форме, или их можно клонировать в один или более векторов. Нуклеиновые кислоты можно синтезировать, например, посредством твердофазного синтеза или ПЦР перекрывающихся олигонуклеотидов. Нуклеиновые кислоты, кодирующие тяжелые и легкие цепи, можно соединять в виде одной смежной нуклеиновой кислоты, например, в экспрессирующем векторе, или они могут быть отдельными, например, каждая клонирована в свой экспрессирующий вектор.

В некоторых аспектах настоящее изобретение также относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитело против $\alpha\beta6$ или его антигенсвязывающий фрагмент, как представлено в настоящем описании. Настоящее изобретение дополнительно относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против $\alpha\beta6$ или его антигенсвязывающий фрагмент, как представлено в настоящем описании. Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам-хозяевам, экспрессирующим нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против $\alpha\beta6$ или его антигенсвязывающий фрагмент, как представлено в настоящем описании. Настоящее изобретение дополнительно относится к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие нуклеиновые кислоты, кодирующие антитело против $\alpha\beta6$ или его антигенсвязывающий фрагмент, как представлено в настоящем описании.

Антитела против $\alpha\beta6$, представленные в настоящем описании, можно получать хорошо известными рекомбинантными способами с использованием хорошо известных систем экспрессирующих векторов и клеток-хозяев. В одном из вариантов осуществления антитела получают в клетках CHO с использованием системы экспрессирующего вектора GS, как описано в De la Cruz Edmunds et al., 2006, *Molecular Biotechnology* 34; 179-190, EP216846, патенте США № 5981216, WO 87/04462, EP323997, патенте США № 5591639, патенте США № 5658759, EP338841, патенте США № 5879936 и патенте США № 5891693.

Моноклональные антитела против $\alpha\beta6$, представленные в настоящем описании, например, можно получать гибридным способом, впервые описанным в Kohler et al., *Nature*, 256, 495 (1975), или способами рекомбинантной ДНК. Моноклональные антитела также можно выделять из фаговых библиотек антител способами, описанными, например, в Clackson et al., *Nature*, 352, 624-628 (1991) и Marks et al., *JMol. Biol.*, 222(3):581-597 (1991). Моноклональные антитела можно получать из любого подходящего источника. Таким образом, например, моноклональные антитела можно получать из гибридом, полученных из В-клеток селезенки мыши, полученных из мышей, иммунизированных интересующим антигеном, например, в форме клеток, экспрессирующих антиген на поверхности, или нуклеиновой кислоты, кодирующей интересующий антиген. Моноклональные антитела также можно получать из гибридом, полученных из антитело-экспрессирующих клеток иммунизированных людей или не являющихся человеком млекопитающих, таких как крысы, собаки, приматы и т.д.

VII. Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Антитела против $\alpha\beta6$ можно конъюгировать с цитотоксическими или цитостатическими остатками (включая их фармацевтически совместимые соли) с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Особенно подходящими остатками для конъюгации с антителами являются цитотоксические средства (например, химиотерапевтические средства), пролекарство-конвертирующие ферменты, радиоактивные изотопы или соединения или токсины (эти остатки в совокупности обозначают как терапевтическое средство). Например, антитело против $\alpha\beta6$ можно конъюгировать с цитотоксическим средством, таким как химиотерапевтическое средство, или токсином (например, цитостатическим или цитотоксическим средством, таким как, например, абрин, ризин А, псевдомонадный экзотоксин или дифтерийный токсин).

Антитело против $\alpha\beta6$ можно конъюгировать с пролекарство-конвертирующим ферментом. Пролекарство-конвертирующий фермент можно подвергать рекомбинантному слиянию с антителом или химически конъюгировать с ним известными способами. Примерами пролекарство-конвертирующих ферментов являются карбоксипептидаза G2, бета-глюкуронидаза, пенициллин-V-амидаза, пенициллин-G-амидаза, β -лактамаза, β -глюкозидаза, нитратредуктаза и карбоксипептидаза А.

Способы конъюгации терапевтических средств с белками, и в частности с антителами, хорошо известны (см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy* (Reisfeld et al. eds., Alan R. Liss, Inc., 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery," в *Controlled Drug Delivery* (Robinson et al. eds., Marcel Dekker, Inc., 2nd ed. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications* (Pinchera et al. eds., 1985); "Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy* (Baldwin et al. eds., Academic Press, 1985); и Thorpe et al., 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Также см., например, публикацию PCT № WO 89/12624).

Терапевтическое средство можно конъюгировать так, чтобы снижать его активность, если оно не отщепляется от антитела (например, посредством гидролиза, деградации антитела или под действием расщепляющего средства). Такое терапевтическое средство присоединяют к антителу с расщепляемым линкером, чувствительным к расщеплению во внутриклеточной среде $\alpha\beta6$ -экспрессирующей злокачественной клетки, но, по существу, нечувствительной к внеклеточной среде, таким образом, что конъюгат отщепляется от антитела, когда он интернализуется $\alpha\beta6$ -экспрессирующей злокачественной клеткой (например, в эндосомальном или, например, в силу чувствительности к рН или чувствительности к протеазе, в лизосомальном окружении или в кавеоларном окружении).

Как правило, ADC содержит линкерную область между терапевтическим средством и антителом против $\alpha\beta6$. Как указано выше, как правило, линкер отщепляется во внутриклеточных условиях, таким образом, что расщепление линкера приводит к высвобождению терапевтического средства из антитела во внутриклеточной среде (например, в лизосоме, или эндосоме, или кавеоле). Линкер может являться, например, пептидным линкером, расщепляемым внутриклеточной пептидазой или протеазой, включая лизосомальную или эндосомальную протеазу. Как правило, пептидный линкер имеет длину по меньшей мере две аминокислоты или по меньшей мере три аминокислоты. Расщепляющие средства могут включать катепсины В и D и плазмин (см., например, Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123). Наиболее типичными являются пептидными линкерами, расщепляемыми ферментами, присутствующими в $\alpha\beta6$ -экспрессирующих клетках. Например, можно использовать пептидный линкер, расщепляемый тиол-зависимой протеазой катепсином-В, высокоэкспрессирующейся в злокачественной ткани, (например, линкер, содержащий Phe-Leu или пептид Gly-Phe-Leu-Gly). Другие такие линкеры описаны, например, в патенте США № 6214345. В конкретных вариантах осуществления пептидный линкер, расщепляемый внутриклеточной протеазой, содержит линкер Val-Cit или дипептид Phe-Lys (см., например, патент США № 6214345, в котором описывают синтез доксорубина с линкером Val-Cit). Одним из преимуществ использования внутриклеточного протеолитического высвобождения терапевтического средства является то, что средство, как правило, ослабляют при конъюгации, и стабильность конъюгатов в сыворотке, как правило, является высокой.

Расщепляемый линкер может являться рН-чувствительным, т.е. чувствительным к гидролизу при некоторых значениях рН. Как правило, рН-чувствительный линкер гидролизует в кислых условиях. Например, можно использовать кислото-лабильный линкер, гидролизуемый в лизосоме (например, гидразон, семикарбазон, тиосемикарбазон, цис-аконитовый амид, ортоэфир, ацеталь, кеталь или т.п.) (см., например, патенты США №№ 5122368; 5824805; 5622929; Dubowchik and Walker, 1999, *Pharm. Therapeutics* 83:67-123; Neville et al., 1989, *Biol. Chem.* 264: 14653-14661). Такие линкеры являются относительно стабильными в условиях нейтрального рН, таких как в крови, но нестабильными при более низком рН 5,5 или 5,0, приблизительноном рН лизосомы. В некоторых вариантах осуществления гидролизуемый линкер является тиоэфирным линкером (таким как, например, тиоэфир, присоединенный к терапевтическому средству с помощью ацилкарбазиновой связи (см., например, патент США № 5622929)).

Другие линкеры расщепляются в восстановительных условиях (например, дисульфидный линкер). Дисульфидные линкеры включают линкеры, которые могут образовываться с помощью SATA (N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетата), SPDP (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионата), SPDB (N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)бутирата) и SMPT (N-сукцинимидил-оксикарбонил-альфа-метил-альфа-(2-пиридилдитио)толуола), SPDB и SMPT (см., например, Thorpe et al., 1987, *Cancer Res.* 47:5924-5931; Wawrzynczak et al., In *Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimager and Therapy of Cancer* (C.W. Vogel ed., Oxford U. Press, 1987. Также см. патент США № 4880935)).

Линкер также может являться малонатным линкером (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), а малеимидобензоильным линкером (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304) или 3'-N-амидным аналогом (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12). Линкер также может являться малонатным линкером (Johnson et al., 1995, *Anticancer Res.* 15:1387-93), малеимидобензоильным линкером (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304) или 3'-N-амидным аналогом (Lau et al., 1995, *Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12).

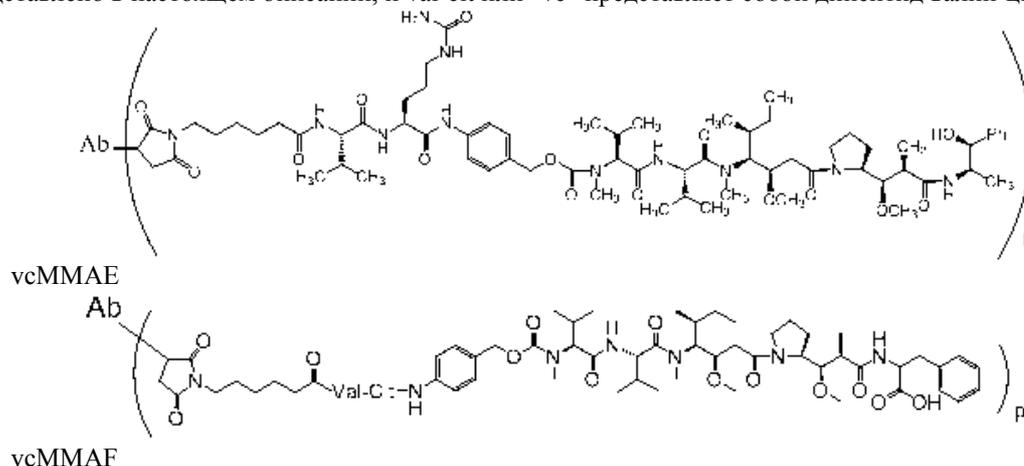
Линкер также может являться нерасщепляемым линкером, таким как малеимидо-алкиленовый или малеимидо-арильный линкер, напрямую присоединенный к терапевтическому средству (например, лекарственному средству). Активное лекарственное средство-линкер высвобождается при деградации антитела.

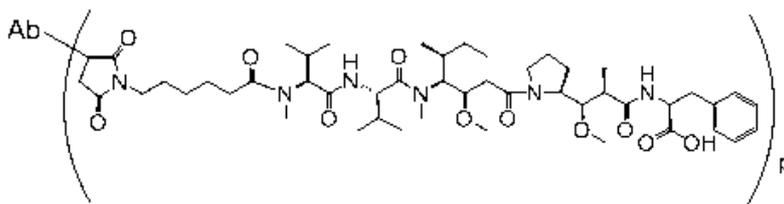
Линкер может способствовать интернализации в клетку. Линкер может способствовать интернализации в клетку при конъюгации с терапевтическим средством (т.е. в условиях остатка линкер-терапевтическое средство в ADC или производном ADC, как представлено в настоящем описании). Альтернативно, линкер может способствовать интернализации в клетку при конъюгации с терапевтическим средством и антителом против $\alpha\beta6$ (т.е. в условиях ADC, как представлено в настоящем описании).

Антитело против $\alpha\beta6$ можно конъюгировать с линкером через гетероатом антитела. Эти гетероатомы могут присутствовать на антителе в своем природном состоянии, или их можно встраивать в антитело. В некоторых аспектах антитело против $\alpha\beta6$ будут конъюгировать с линкером через атом азота остатка лизина. В других аспектах антитело против $\alpha\beta6$ будут конъюгировать с линкером через атом серы остатка цистеина. Остаток цистеина может являться природным или сконструированным в антителе. В этой области способы конъюгации линкеров и лекарственного средства-линкера с антителами через остатки лизина и цистеина известны.

Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе ауристатина (т.е. лекарственным компонентом является лекарственное средство ауристатин). Ауристатины связываются с тубулином и, как показано, противодействуют динамике микротрубочек и делению ядра и клеток, а также имеют противоопухолевую активность. Как правило, конъюгат антитело-лекарственное средство на основе ауристатина содержит линкер между лекарственным средством ауристатином и антителом против $\alpha\beta6$. Линкер может являться, например, расщепляемым линкером (например, пептидным линкером, углеводным линкером) или нерасщепляемым линкером (например, линкером, высвобождаемым при деградации антитела). Ауристатины включают (в качестве неограничивающих примеров) ауристатин Т, MMAF и MMAE. Синтез и структура примеров ауристатинов описаны в патентных публикациях США №№ 7659241, 7498298, 2009-0111756, 2009-0018086 и 7968687, каждая из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей.

Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство на основе ауристатина включают конъюгаты антитело-лекарственное средство vcMMAE (или 1006), vcMMAF и mcMMAF, как показано ниже, где p представляет собой лекарственную нагрузку, Ab является антителом против $\alpha\beta6$, как представлено в настоящем описании, и val-cit или "vc" представляет собой дипептид валин-цитруллин:



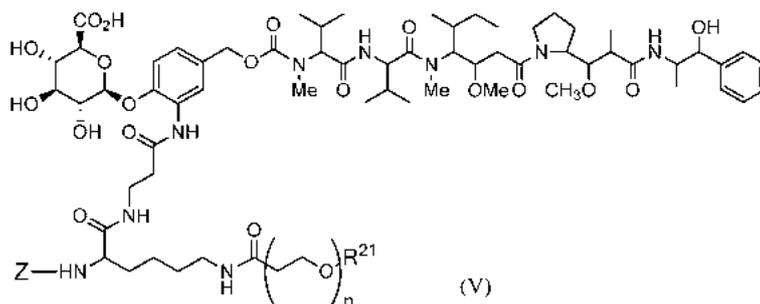


mcMMAF

или их фармацевтически приемлемую соль. Лекарственная нагрузка указана как p , количество молекул лекарственного средства-линкера на антитело. Что касается $\alpha\nu\beta 6$ -нацеленных конъюгатов антитело-лекарственное средство, подстрочный индекс p соответствует лекарственной нагрузке и, в зависимости от контекста, может представлять собой количество молекул лекарственного средства-линкера, присоединенных к отдельной молекуле антитела и, в связи с этим, является целым числом, или может представлять собой среднюю лекарственную нагрузку и, в связи с этим, может являться целым или нецелым значением, но, как правило, является нецелым значением. Средняя лекарственная нагрузка представляет собой среднее количество молекул лекарственного средства-линкера на антитело в популяции. Часто, но не всегда, когда авторы настоящего изобретения ссылаются на антитело, например, моноклональное антитело, они ссылаются на популяцию молекул антител. В композиции, содержащей популяцию молекул конъюгатов антитело-лекарственное средство, средняя лекарственная нагрузка является важным качеством, т.к. оно определяет количество лекарственного средства, которое можно доставить в клетку-мишень. Процент неконъюгированных молекул антител в композиции включен в среднее значение лекарственной нагрузки.

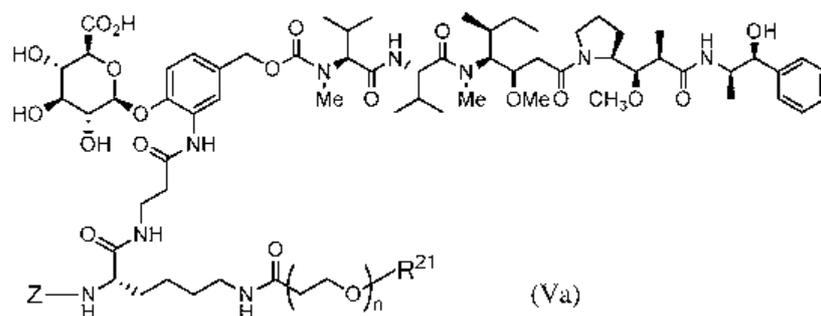
В предпочтительных аспектах по настоящему изобретению средняя лекарственная нагрузка в отношении композиции, содержащей популяцию соединений конъюгатов антитело-лекарственное средство, составляет от 1 до приблизительно 16, предпочтительно - от приблизительно 2 до приблизительно 14, более предпочтительно - от приблизительно 2 до приблизительно 10. В варианте осуществления DAR составляет от приблизительно 2 до приблизительно 5. В дополнительном варианте осуществления DAR составляет 4. В другом варианте осуществления DAR составляет от приблизительно 6 до приблизительно 10. В дополнительном варианте осуществления DAR составляет 8. Среднее количество лекарственных средств на антитело в препарате можно охарактеризовывать общепринятыми способами, такими как масс-спектрокопия, НИС, ELISA и ВЭЖХ. В некоторых аспектах антитело против $\alpha\nu\beta 6$ присоединяют к лекарственному средству-линкеру через остаток цистеина антитела. В некоторых аспектах остаток цистеина является остатком, сконструированным в антителе. В других аспектах остаток цистеина является остатком цистеина межцепочечной дисульфидной связи.

В некоторых вариантах осуществления встраивание полимера полиэтиленгликоля в качестве боковой цепи в расщепляемый β -глюкуронидный лекарственное средство-линкер MMAE позволяет получать конъюгаты антитело-лекарственное средство со сниженным плазменным клиренсом и повышенной противоопухолевой активностью в моделях ксенотрансплантатов по сравнению с непегилированным контролем. Таким образом, особенно предпочтительные лекарственные средства-линкеры для присоединения к антителам по настоящему изобретению имеют следующую формулу V:



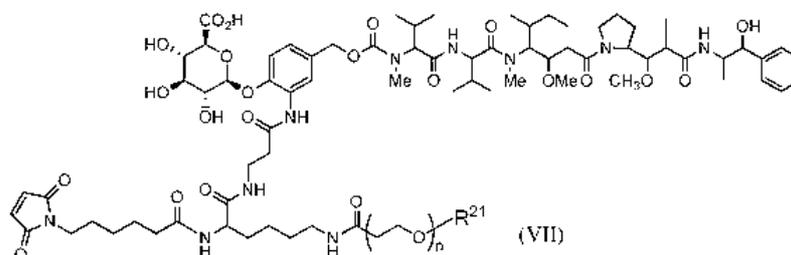
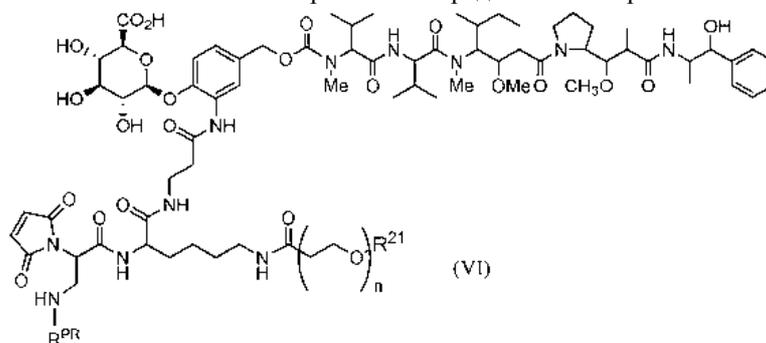
или их фармацевтически приемлемая соль.

Предпочтительная стереохимия для такого лекарственного средства-линкера показана ниже в формуле Va:



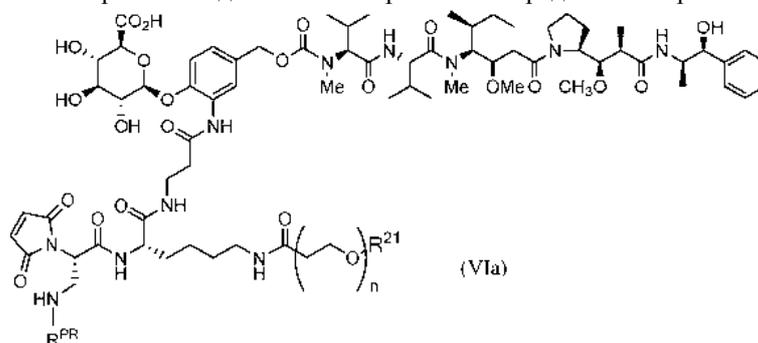
или его фармацевтически приемлемой соли, где в формулах V и Va Z представляет собой органический остаток, имеющий активный центр, способный реагировать с функциональной группой на антителе с ковалентным присоединением к ней, n находится в диапазоне от 8 до 36 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 (наиболее предпочтительно - 12), R²¹ является единицей для кэпирования остатка полиэтиленгликоля, предпочтительно - CH₃ или -CH₂CH₂CO₂H.

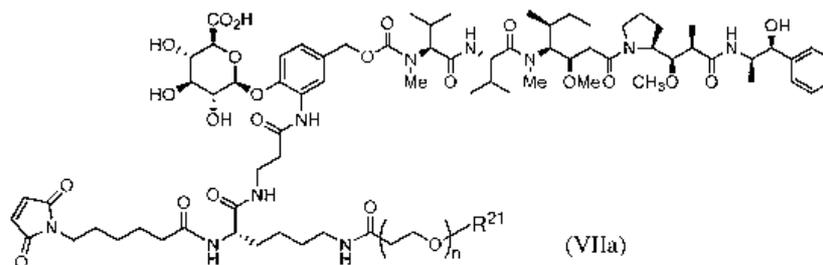
Предпочтительный остаток Z является малеимид-содержащим остатком. Особенно предпочтительные остатки Z показаны в лекарственных средствах-линкерах ниже:



или их фармацевтически приемлемой соли.

Предпочтительная стереохимия для таких лекарственных средств-линкеров показана ниже:





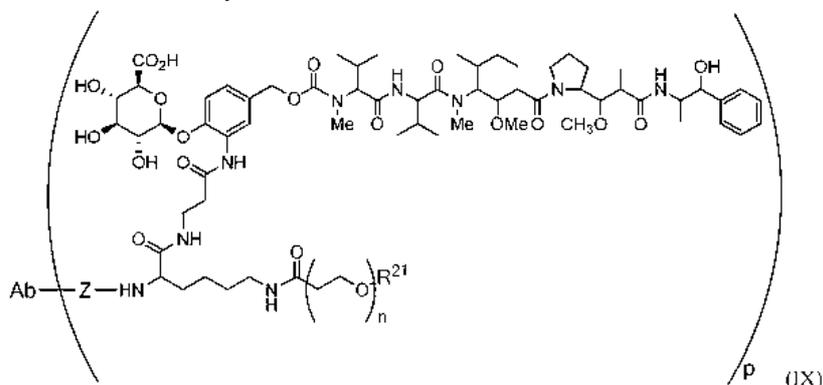
или их фармацевтически приемлемой соли, где в формулах VI, VIa, VII и VIIa n находится в диапазоне от 8 до 36 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 (наиболее предпочтительно - 12), R^{PR} является атомом водорода или защитной группой, например, кислото-лабильной защитной группой, например, BOC, R^{21} является единицей для кэпирования остатка полиэтиленгликоля, предпочтительно - CH_3 или $-CH_2CH_2CO_2H$.

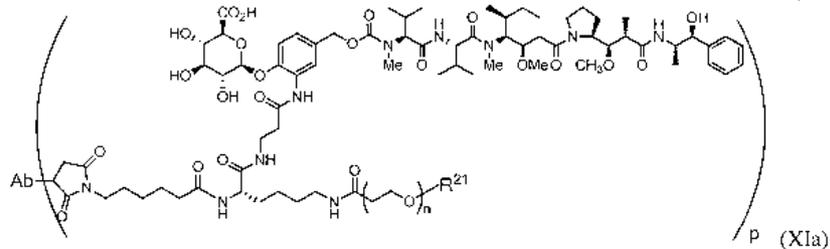
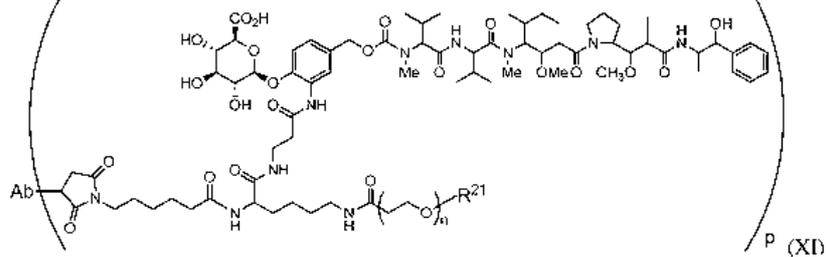
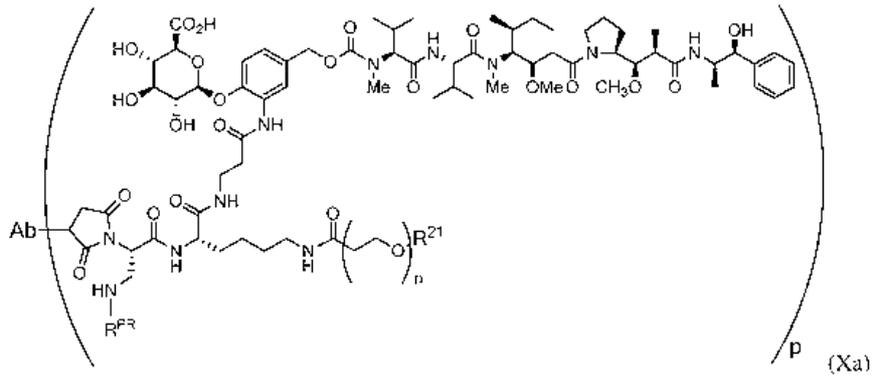
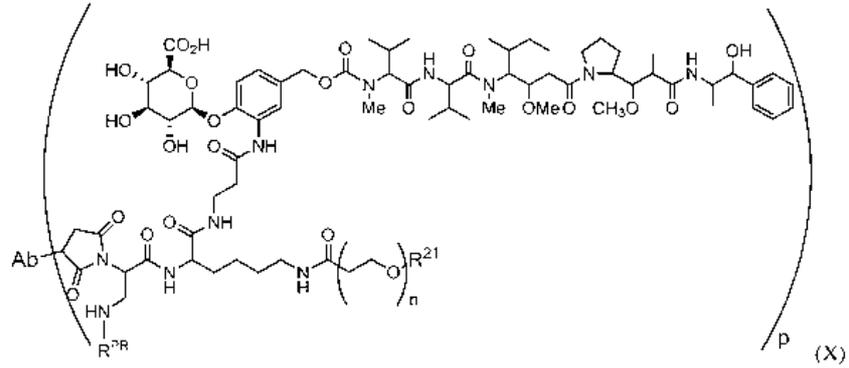
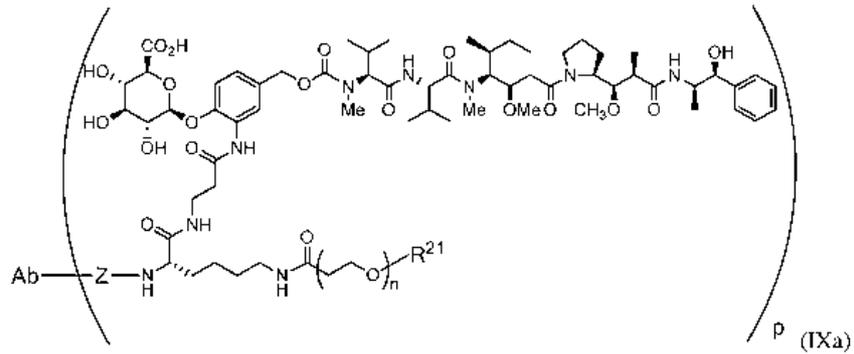
Как указано выше, R^{PR} может являться атомом водорода или защитной группой. В рамках изобретения термины "защитные группы" относятся к группам, селективно блокирующим, временно или постоянно, активный центр в многофункциональном соединении. Защитная группа является подходящей защитной группой, если она может позволять предотвращать или избегать нежелательных побочных реакций или преждевременной потери защитной группы в реакционных условиях, необходимых для осуществления желаемого химического превращения где-либо в молекуле и во время очистки недавно образованной молекулы, при желании, и ее можно удалять в условиях, не влияющих неблагоприятно на структуру или стереохимическую целостность недавно образованной молекулы. Подходящие защитные аминогруппы включают кислото-лабильные азотные защитные группы, включая описанные в Isidro-Llobel et al. "Amino acid-protecting groups" Chem. Rev. (2009) 109: 2455-2504. Как правило, кислото-лабильная азотная защитная группа превращает первичную или вторичную аминогруппу в соответствующий карбамат и включает *t*-бутил-, аллил- и бензилкарбаматы.

Как указано выше, R^{21} является единицей кэпирования для остатка полиэтиленгликоля. Как будет понятно специалистам в этой области, единицы полиэтиленгликоля можно кэпировать на концах с использованием широкого спектра органических остатков, как правило, являющихся относительно химически неактивными. Алкил и замещенные алкильные группы являются предпочтительными.

В случае пегилированных ADC MMAE, примеры которых приведены в настоящем описании, особенно предпочтительная средняя лекарственная нагрузка составляет приблизительно 8. В иллюстративных вариантах осуществления лекарственные средства-линкеры конъюгированы с остатками цистеина восстановленных межцепочечных дисульфидных связей. В некоторых аспектах точная лекарственная нагрузка для отдельных молекул антител в популяции соединений конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет от 1 до 10 (или от 6 до 10 или от 6 до 8) с преобладающей лекарственной нагрузкой 8. Более высокой лекарственной нагрузки можно достигать, например, если, в дополнение к межцепочечным дисульфидным связям, лекарственное средство-линкер конъюгируют с встроенными остатками цистеина (такими как остаток цистеина, встроенный в положение 239 по индексу EU).

Примеры ADC включают следующие:





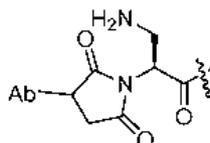
или их фармацевтически приемлемую соль, где n находится в диапазоне от 8 до 36 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 (наиболее предпочтительно - 12), R^{PR} является атомом водорода или защитной группой, например, кислото-лабильной защитной группой, например, BOC , R^{21} является единицей кэпирования для остатка полиэтиленгликоля, предпочтительно - CH_3 или $-CH_2CH_2CO_2H$. Ab представляет собой антитело против $\alpha\beta 6$, и p представляет собой целое число в диапазоне от 1 до 16, предпочтительно - от 1 до 14, от 6 до 12, от 6 до 10 или от 8 до 10 в отношении отдельных молекул антител или средней лекарственной нагрузке от приблизительно 4 или от приблизительно 6 до

приблизительно 14, предпочтительно - приблизительно 8 в отношении популяции молекул антител.

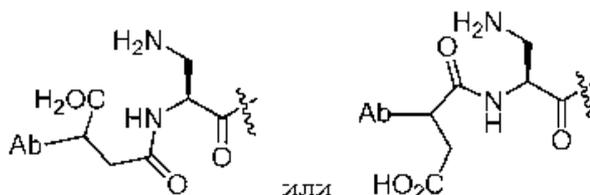
Как указано выше, PEG-часть (полиэтиленгликоль) лекарственного средства-линкера может находиться в диапазоне от 8 до 36, однако, обнаружено, что PEG из 12 единиц этиленоксида является особенно предпочтительным. Обнаружено, что более длинные цепи PEG могут приводить к более медленному клиренсу, в то время как более короткие цепи PEG могут приводить к сниженной активности. Таким образом, нижний индекс n во всех вариантах осуществления выше составляет предпочтительно от 8 до 14, от 8 до 12, от 10 до 12 или от 10 до 14 и, наиболее предпочтительно, 12.

Полидисперсные PEG, монодисперсные PEG и дискретные PEG можно использовать для получения пегилированных конъюгатов антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению. Полидисперсные PEG являются гетерогенной смесью PEG разных размеров и молекулярных масс, в то время как монодисперсные PEG, как правило, очищены из гетерогенных смесей и, таким образом, имеют единую длину цепи и молекулярную массу. Предпочтительные единицы PEG представляют собой дискретные PEG, соединения, синтезируемые постадийно, а не с помощью полимеризации. Дискретные PEG представляют собой одну молекулу с определенной длиной цепи. Как и в случае нижнего индекса "p", в отношении популяций конъюгатов антитело-лекарственное средство значение нижнего индекса "n" может являться средним количеством и может представлять собой целочисленное или нецелочисленное значение.

В предпочтительных вариантах осуществления ковалентное присоединение антитела к лекарственному средству-линкеру осуществляют через сульфгидрильную функциональную группу антитела, взаимодействующую с малеимидной функциональной группой лекарственного средства-линкера с образованием тио-замещенного сукцинимида. Сульфгидрильная функциональная группа может присутствовать на единице-лиганда в природном состоянии лиганда, например, в природном остатке (остатки межцепочечной дисульфидной связи), или их можно встраивать в лиганд посредством химической модификации, или биоинженерии, или комбинация их двух. Следует понимать, что антитело-замещенный сукцинимид может существовать в гидролизованных формах. Например, в предпочтительных вариантах осуществления ADC состоит из остатка сукцинимида, который при связывании с антителом представлен структурой:

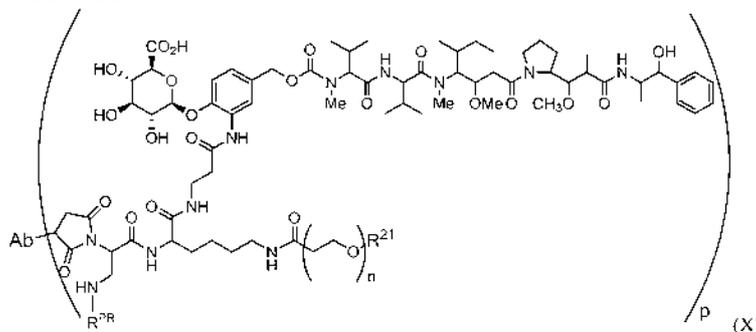


или состоит из соответствующего остаток амида кислоты, который при связывании с антителом представлен структурой:



Волнистой линией указана связь с остальной частью лекарственного средства-линкера.

В некоторых вариантах осуществления антитело против $\alpha\beta 6$ по изобретению конъюгировано с монометилауристатином E через линкер MDPr-PEG(12)-gluc, образуя конъюгат антитело-лекарственное средство, имеющий структуру:



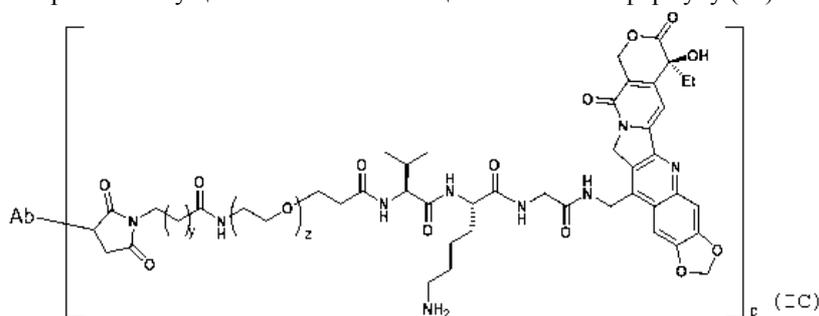
или его фармацевтически приемлемую соль, где n находится в диапазоне от 8 до 36 и, наиболее предпочтительно, от 8 до 14 (наиболее предпочтительно - 12), R^{PR} является атомом водорода или защитной группой, например, кислото-лабильной защитной группой, например, BOC , R^{21} является единицей для кэпирования остатка полиэтиленгликоля, предпочтительно - CH_3 или $-CH_2CH_2CO_2H$, Ab представляет собой антитело против $\alpha\beta 6$, и p является целым числом в диапазоне от 1 до 16,

предпочтительно - от 1 до 14, от 6 до 12, от 6 до 10 или от 8 до 10 в отношении отдельных молекул антител или средней лекарственной нагрузке от приблизительно 4 или от приблизительно 6 до приблизительно 14, предпочтительно - приблизительно 8 в отношении популяции молекул антител.

Примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство также включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе камптотецина (т.е. лекарственный компонент является лекарственным средством камптотецином). Камптотецины являются ингибиторами топоизомеразы, которые, как показано, имеют противоопухолевую активность. Как правило, конъюгат антитело-лекарственное средство на основе камптотецина содержит линкер между лекарственным средством камптотецином и антителом против $\alpha\beta6$. Линкер может являться, например, расщепляемым линкером (например, пептидным линкером, углеводным линкером) или нерасщепляемым линкером (например, линкером, высвобождаемым при деградации антитела). Синтез и структура примеров лекарственное средство-линкеров на основе камптотецина описаны в PCT/US19/025968 (поданной 5 апреля 2019 г.), включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме и для всех целей.

Примеры конъюгатов антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство включают следующие конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе камптотецина, где р представляет собой лекарственную нагрузку, и Ab представляет собой антитело против $\alpha\beta6$.

В некоторых вариантах осуществления камптотецин ADC имеет формулу (IC):



или его фармацевтически приемлемая соль;

где Ab является антителом против $\alpha\beta6$;

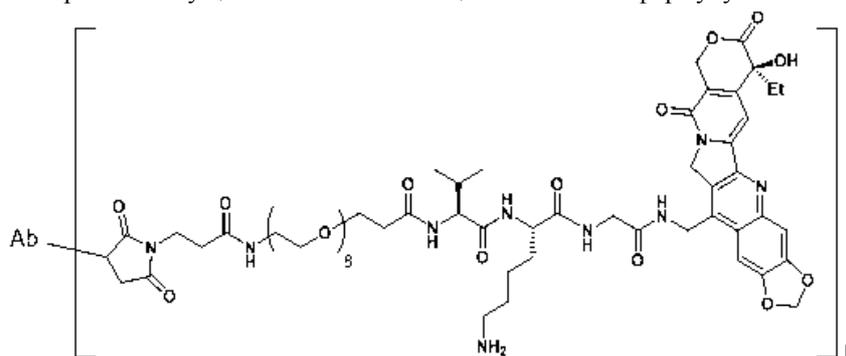
у составляет 1, 2, 3 или 4 или составляет 1 или 4 и

z является целым числом от 2 до 12 или составляет 2, 4, 8 или 12;

и р составляет 1-16.

В некоторых аспектах этих вариантов осуществления р составляет 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10. В некоторых аспектах р составляет 2, 4 или 8.

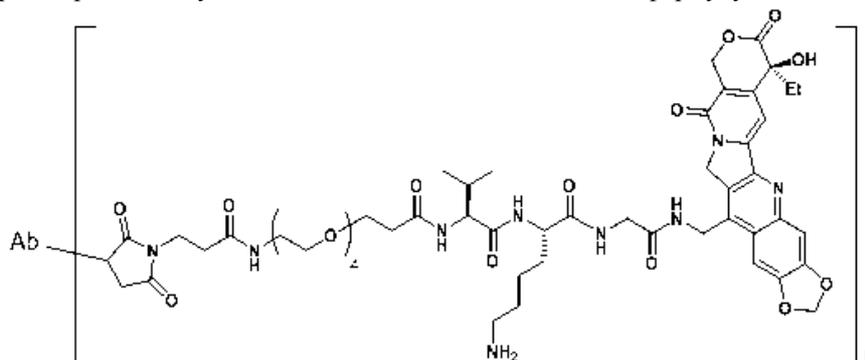
В некоторых вариантах осуществления камптотецин ADC имеет формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль;

где р составляет 2, 4 или 8, предпочтительно - р составляет 8.

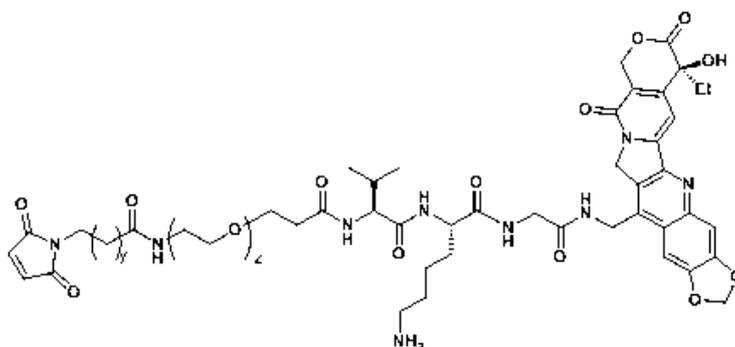
В некоторых вариантах осуществления камптотecin ADC имеет формулу:



или его фармацевтически приемлемая соль;

где r составляет 2, 4 или 8, предпочтительно - r составляет 8.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство-линкер на основе камптотецина имеет формулу:

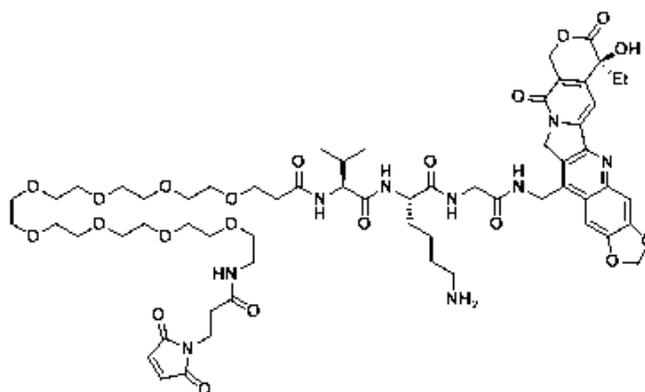


или его фармацевтически приемлемая соль;

где y составляет 1, 2, 3 или 4 или составляет 1 или 4 и

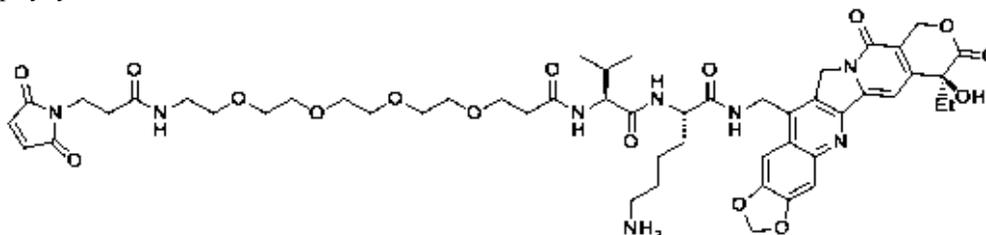
z является целым числом от 2 до 12 или составляет 2, 4, 8 или 12.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство-линкер на основе камптотецина имеет формулу:



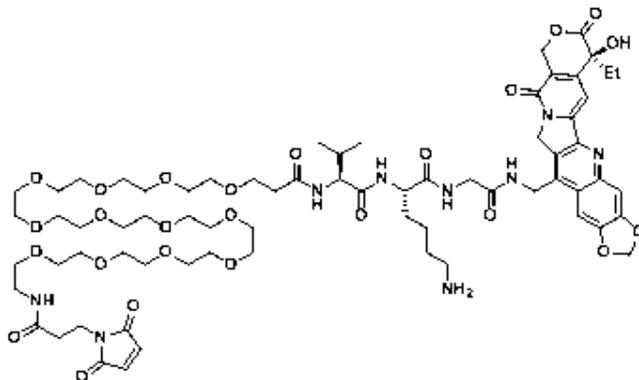
MP-PEG8-VKG-Камптотecin.

В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство-линкер на основе камптотецина имеет формулу:



MP-PEG4-VKG-Камптотецин.

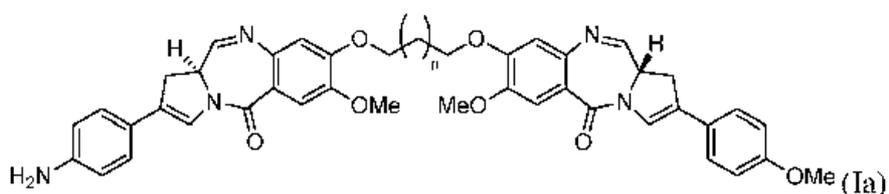
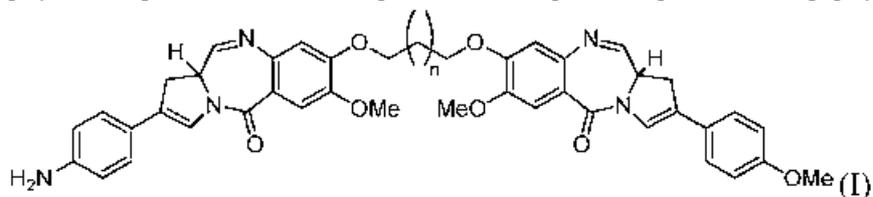
В некоторых вариантах осуществления лекарственное средство-линкер на основе камптотецина имеет формулу:



MP-PEG12-VKG-Камптотецин.

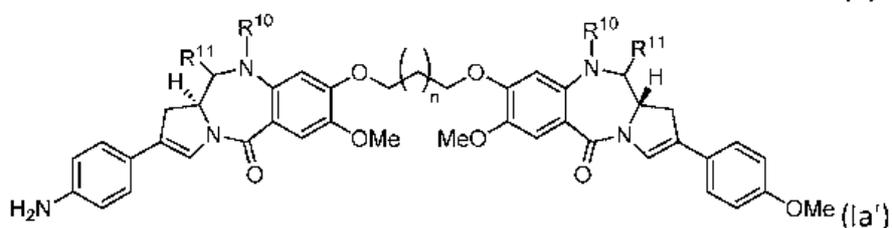
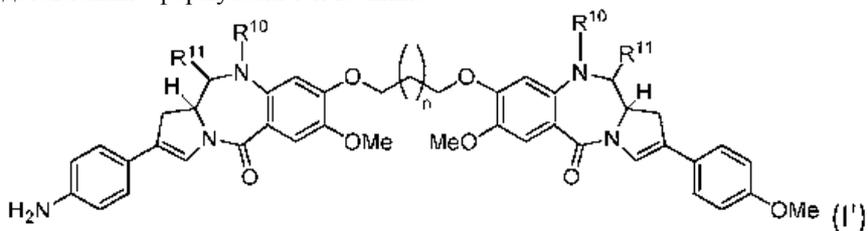
Другие примеры конъюгатов антитело-лекарственное средство включают конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе майтанзиноида (т.е. лекарственный компонент является лекарственным средством майтанзиноидом) и конъюгаты антитело-лекарственное средство на основе бензодиазепина (т.е. лекарственный компонент является бензодиазепином (например, димерами пирроло[1,4]бензодиазепина (димером PBD), димерами индолинобензодиазепина и димерами оксазолидинобензодиазепина)).

В некоторых вариантах осуществления димер PBD для использования в настоящем изобретении представлен формулой I. Предпочтительная стереохимия димера PBD представлена формулой Ia:



или его фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где нижний индекс n составляет 1 или 3.

Сольваты формы (I) и (Ia), как правило, образуются при добавлении воды или спиртового растворителя через иминную функциональную группу одного или обоих мономеров PBD с образованием карбиноламинов и/или простых эфиров карбиноламинов. Например, в положении N10-C11 может находиться имин (N=C), карбиноламин (NH-CH(OH)) или простой эфир карбиноламина (NH-CH(OMe)), представленные формулами I' и Ia' ниже:



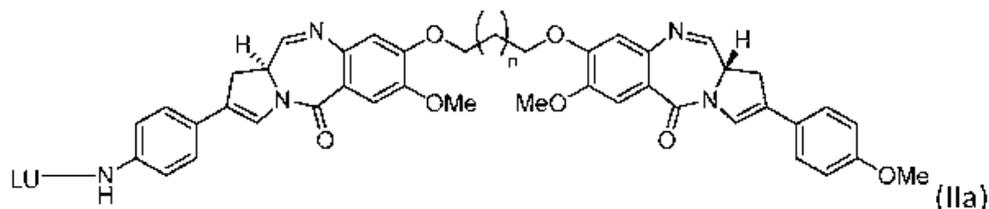
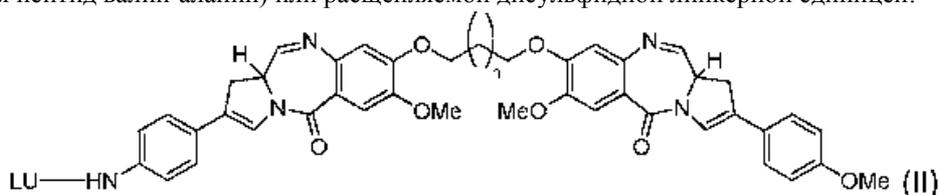
где:

(a) R^{10} является H, и R^{11} является OH или OR^A , где OR^A является насыщенным C_{1-4} -алкилом (предпочтительно, метилом); или

(b) R^{10} и R^{11} образует азот-углеродную двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны; или

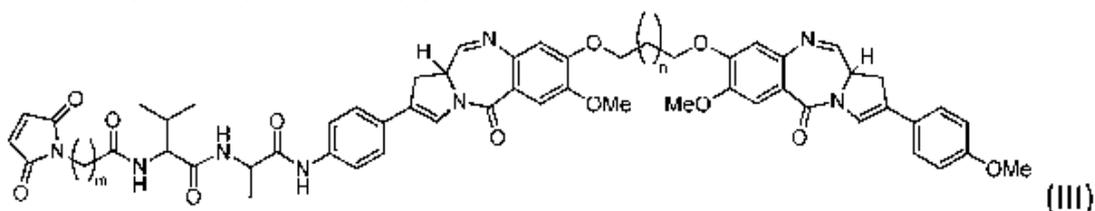
(c) один из R^{10} является H, и R^{11} является OH или OR^A , где OR^A является насыщенным C_{1-4} -алкилом (предпочтительно, метилом); и другой из R^{10} и R^{11} образует азот-углеродную двойную связь между атомами азота и углерода, с которыми они связаны.

Димер PBD формулы I или Ia (или его фармацевтически приемлемая соль, сольват или сольват соли), как правило, связан с антителом через линкерную единицу, LU. Линкерная единица действует, высвобождая димер PBD формулы I или Ia (или его фармацевтически приемлемую соль, сольват или сольват соли) в целевом участке (например, внутри злокачественной клетки). Соединение лекарственное средство-линкер на основе PBD для использования в настоящем изобретении представлено формулой II ниже (предпочтительная стереохимия показана на IIa), где LU является линкерной единицей. Линкерная единица может являться, например, расщепляемой пептидной линкерной единицей (например, линкером, содержащим пептид валин-аланин) или расщепляемой дисульфидной линкерной единицей:



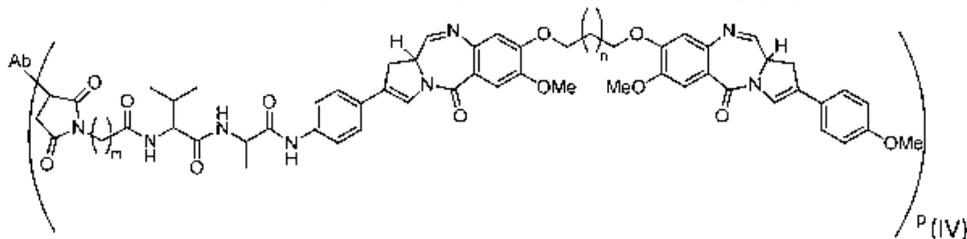
или его фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где нижний индекс n составляет 1 или 3.

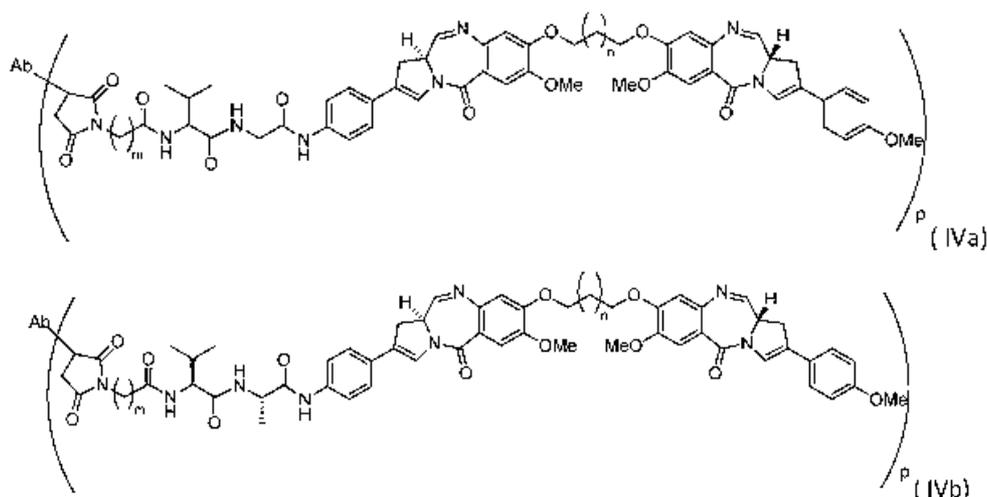
Предпочтительное соединение лекарственное средство-линкер на основе PBD для использования в настоящем изобретении представлено формулой III ниже:



или его фармацевтически приемлемой солью, сольватом или сольватом соли; где нижний индекс n составляет 1 или 3, и нижний индекс m является целым числом от 2 до 5.

Лекарственное средство-линкер на основе PBD конъюгируют с антителом против $\alpha\beta6$ для получения $\alpha\beta6$ -нацеленного конъюгата антитело-лекарственное средство. Например, антитело можно конъюгировать с лекарственным средством-линкером формулы II или формулы III. Пример $\alpha\beta6$ -нацеленного конъюгата антитело-лекарственное средство показан ниже в формулах:





или его фармацевтически приемлемой соли, сольвата или сольвата соли; где нижний индекс p составляет 1 или 3; нижний индекс m является целым числом от 2 до 5; и нижний индекс r составляет от 1 до 4.

Полезные классы цитотоксических средств для конъюгации с антителами против $\alpha\beta6$ включают, например, антитубулиновые средства, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, химиотерапевтические сенсibilizаторы или т.п. Другие примеры классов цитотоксических средств включают антрациклины, ауристатины, камптотецины, дуокармицины, этопозиды, майтанзиноиды и алкалоиды барвинка. Некоторые примеры цитотоксических средств включают ауристатины (например, ауристин Т, ауристин Е, АРР, монометилауристин F (ММАF), липофильный монометилауристин F, монометилауристин, средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК (например, енедины и лекситропсины), дуокармицины, таксаны (например, паклитаксел и доцетаксел), алкалоиды барвинка, ингибитор никотинамидфосфорибозилтрансферазы (NAMPTi), тубулизин М, доксорубицин, морфолино-доксорубицин и цианоморфолино-доксорубицин.

Цитотоксическое средство может являться химиотерапевтическим средством, таким как, например, доксорубицин, паклитаксел, мелфалан, алкалоиды барвинка, метотрексат, митоминин С или этопозид. Средство также может являться аналогом СС-1065, калихимицином, майтанзином, аналогом доластатина 10, ризоксином или палитоксином.

Цитотоксическое средство также может являться ауристатином. Ауристин может являться производным ауристината Е, являющимся, например, сложным эфиром, образующимся между ауристином Е и кетокислотой. Например, можно проводить реакцию ауристината Е с параацетилбензойной кислотой или бензоилвалериановой кислотой для получения АЕВ и АЕВВ, соответственно. Другие типичные ауристатины включают ауристин Т, АРР, ММАF и ММАЕ. Синтез и структура различных ауристинов описаны, например, в патентных публикациях США №№ 2005-0238649 и 2006-0074008.

Цитотоксическое средство может являться средством, связывающимся с малой бороздкой ДНК (см., например, патент США № 6130237). Например, средство, связывающееся с малой бороздкой, может являться соединением СВ1 или енедином (например, калихимицином).

Цитотоксическое или цитостатическое средство может являться антитубулиновым средством. Примеры антитубулиновых средств включают таксаны (например, Тахол® (паклитаксел), Тахотере® (доцетаксел)), Т67 (Tularik), алкалоиды барвинка (например, винкрестин, винбластин, виндезин и винорелбин) и ауристатины (например, ауристин). Примеры ауристинов показаны ниже в формулах III-XIII. Другие подходящие антитубулиновые средства включают, например, производные баккатина, аналоги таксана (например, эпотилон А и В), нокодазол, колхицин и колцемид, эстрамустин, криптофизины, цемадотин, майтанзиноиды, комбретастатины, дискодермолид и элеутеробин.

Цитотоксическое средство может являться майтанзиноидом, другой группой антитубулиновых средств (например, DM1, DM2, DM3, DM4). Например, майтанзиноид может являться майтанзином или майтанзин-содержащим лекарственным средством-линкером, таким как DM-1 или DM-4 (ImmunoGen, Inc.; также см. Chari et al., 1992, Cancer Res.).

VIII. Терапевтическое использование.

Антитела по изобретению, в отдельности или в виде их конъюгатов антител против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, можно использовать для лечения злокачественных новообразований. Некоторые такие злокачественные новообразования демонстрируют детектируемые уровни $\alpha\beta6$, измеряемые на уровне белка (например, посредством иммунологического анализа с использованием одного из примеров антител) или мРНК. Некоторые такие злокачественные новообразования демонстрируют повышенные уровни $\alpha\beta6$ относительно незлокачественной ткани того же типа, предпочтительно, от того же

пациента. Пример уровня $\alpha\beta6$ на злокачественных клетках, поддающихся лечению, составляет 5000-500000 молекул $\alpha\beta6$ на клетку, хотя лечение можно проводить при более высоких или низких уровнях. Необязательно, уровень $\alpha\beta6$ в злокачественном новообразовании измеряют до осуществления лечения.

Примеры злокачественных новообразований, ассоциированных с экспрессией $\alpha\beta6$ и поддающихся лечению, включают немелкоклеточный рак легких (NSCLC) (плоскоклеточный и железистый), рак головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи), рак пищевода, рак молочной железы (включая инвазивную карциному молочной железы), рак яичника, рак мочевого пузыря (включая уротелиальную карциному), рак кожи (плоскоклеточную карциному, или SCC), рак почки (включая светлоклеточный рак почки, папиллярную карциному почки и хромофобный почечно-клеточный рак), рак шейки матки, рак желудка, рак предстательной железы (включая аденокарциному предстательной железы), рак эндометрия (включая карциносаркому матки и рак тела матки), аденокарциному прямой кишки, карциному щитовидной железы, аденокарциному толстого кишечника, аденокарциному желудка и рак поджелудочной железы (включая аденокарциному поджелудочной железы). В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения NSCLC. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака кожи. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака пищевода. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака молочной железы. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака яичников. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака шейки матки. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака желудка. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака почки. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака эндометрия. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака желудка. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака поджелудочной железы. Лечение можно использовать в отношении пациентов, имеющих первичные или метастатические опухоли этих типов. Лечение также можно использовать в отношении пациентов, являющихся рефрактерными к общепринятому лечению или имеющих рецидив после ответа на такое лечение.

Антитела по настоящему изобретению, такие как гуманизированные антитела, в отдельности или в виде их конъюгатов, вводят в эффективной схеме, означающей дозу, путь введения и частоту введения, замедляющей дебют, снижающей тяжесть, ингибирующей дальнейшее ухудшение и/или улучшающей по меньшей мере один признак или симптом злокачественного новообразования. Если пациент уже страдает злокачественным новообразованием, схему можно обозначать как терапевтически эффективную схему. Если пациент имеет повышенный риск развития злокачественного новообразования относительно общей популяции, но у него еще не наблюдают симптомы, схему можно обозначать как профилактически эффективную схему. В некоторых случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно наблюдать у отдельного пациента относительно архивных контролей или прошлых наблюдений у того же пациента. В других случаях терапевтическую или профилактическую эффективность можно продемонстрировать в доклиническом или клиническом испытании на популяции подвергнутых лечению пациентов относительно контрольной популяции неподвергнутых лечению пациентов.

Примерами доз моноклонального антитела являются от 0,1 мг/кг до 50 мг/кг массы тела пациента, более типично - от 1 мг/кг до 30 мг/кг, от 1 мг/кг до 20 мг/кг, от 1 мг/кг до 15 мг/кг, от 1 мг/кг до 12 мг/кг или от 1 мг/кг до 10 мг/кг или от 2 мг/кг до 30 мг/кг, от 2 мг/кг до 20 мг/кг массы тела пациента, 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 дозы. В некоторых способах пациенту вводят дозу по меньшей мере 1,5 мг/кг, по меньшей мере 2 мг/кг или по меньшей мере 3 мг/кг, вводимых один раз в три недели или более. Доза зависит, помимо других факторов, от частоты введения, состояния пациента и ответа на предшествующее лечение, если это целесообразно, является ли лечение профилактическим или терапевтическим, и является ли нарушение острым или хроническим.

Введение может являться парентеральным, внутривенным, пероральным, подкожным, интраартериальным, внутримышечным, интратекальным, интраперитонеальным, топическим, интраназальным или внутримышечным. Введение также может быть локализовано непосредственно в опухоли. Введение в системный кровоток посредством внутривенного или подкожного введения

является предпочтительным. Внутривенное введение можно осуществлять, например, посредством инфузии за период, такой как 30-90 мин, или посредством одной болюсной инъекции.

Частота введения зависит, помимо прочих факторов, от времени полужизни антитела или конъюгата в кровотоке, состояния пациента и пути введения. Частота может являться ежедневной, еженедельной, ежемесячной, ежеквартальной или иметь нерегулярные интервалы в ответ на изменения состояния пациента или прогрессирование злокачественного новообразования, подвергаемого лечению. Примером частоты в случае внутривенного введения является введение от двух раз в неделю до ежеквартального в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. Другими примерами частоты в случае внутривенного введения является введение еженедельное или в три из каждых четырех недель в течение непрерывного курса лечения, хотя также возможно более или менее частое введение. В случае подкожного введения примером частоты введения является введение от ежедневного до ежемесячного, хотя также возможно более или менее частое введение.

Количество вводимых доз зависит от природы злокачественного новообразования (например, присутствия острых или хронических симптомов) и ответа нарушения на лечение. В случае острых нарушений или обострений хронического нарушения от 1 до 10 доз зачастую достаточно. Иногда одной болюсной дозы, необязательно - в дробной форме, достаточно в случае острого нарушения или обострения хронического нарушения. Лечение можно повторять в случае рецидива острого нарушения или обострения. В случае хронических нарушений антитело можно вводить с регулярными интервалами, например, еженедельно, раз в две недели, ежемесячно, ежеквартально, каждые шесть месяцев в течение по меньшей мере 1, 5 или 10 лет или жизни пациента.

Фармацевтические композиции для парентерального введения являются, предпочтительно, стерильными и, по существу, изотоническими, и их производят в условиях GMP. Фармацевтические композиции можно предоставлять в стандартной лекарственной форме (т.е. дозе для однократного введения). Фармацевтические композиции можно составлять с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, дилуентов, эксципиентов или вспомогательных средств. Состав зависит от выбранного пути введения. В случае инъекции антитела можно составлять в водных растворах, предпочтительно, в физиологически совместимых буферах, таких как раствор Хэнкса, раствор Рингера, или физиологический раствор, или ацетатный буфер (для снижения дискомфорта в месте инъекции). Раствор может содержать вспомогательные вещества, такие как суспендирующие, стабилизирующие и/или диспергирующие средства. Альтернативно, антитела могут находиться в лиофилизированной форме для разведения подходящим носителем, например, стерильной водой без пирогенов, перед использованием. Концентрация антитела в жидком составе может составлять, например, 1-100 мг/мл, например, 10 мг/мл.

Лечение антителами по изобретению можно комбинировать с химиотерапией, лучевой терапией, лечением стволовыми клетками, хирургическим вмешательством, другими способами лечения, эффективными против нарушения, подвергаемого лечению. Полезные классы других средств, которые можно вводить с антителами против $\alpha\beta6$ и конъюгатами антитело-лекарственное средство, как представлено в настоящем описании, включают, например, антитела против других рецепторов, экспрессирующихся на злокачественных клетках, антитубулиновые средства (например, ауристатин), средства, связывающиеся с малой бороздкой ДНК, ингибиторы репликации ДНК, алкилирующие средства (например, комплексы платины такие как цисплатин, моно(платина), бис(платина) и трехядерные комплексы платины и карбоплатин), антрациклины, антибиотики, антифолаты, антиметаболиты, химиотерапевтические сенсibilизаторы, дуокармицины, этопозиды, фторированные пиримидины, ионофоры, лекситропсины, нитрозомочевины, платинолы, соединения для предварительного составления, антиметаболиты пурина, пурамицины, сенсibilизаторы для лучевой терапии, стероиды, таксаны, ингибиторы топоизомеразы, алкалоиды барвинка и т.п.

Лечение антителом против $\alpha\beta6$ или конъюгатом антитело-лекарственное средство, необязательно, в комбинации с любыми из других средств или схем, описанных выше, в отдельности или в виде конъюгата антитело-лекарственное средство, может повышать медиану выживаемости без прогрессирования или общую выживаемость пациентов с опухолями (например, немелкоклеточным раком легких (NSCLC) (плоскоклеточным и железистым), раком головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи), раком пищевода, раком молочной железы (включая инвазивную карциному молочной железы), раком яичника, раком мочевого пузыря (включая уротелиальную карциному), раком кожи (плоскоклеточной карциномой, или SCC), раком почки (включая светлоклеточный рак почки, папиллярную карциному почки и хромофобный почечно-клеточный рак), раком шейки матки, раком желудка, раком предстательной железы (включая аденокарциному предстательной железы), раком эндометрия (включая карциносаркому матки и рак тела матки), аденокарциномой прямой кишки, карциномой щитовидной железы, аденокарциномой толстого кишечника, аденокарциномой желудка и раком поджелудочной железы (включая аденокарциному поджелудочной железы)), особенно при рецидивировании или рефрактерности, по меньшей мере на 30% или 40%, но предпочтительно - 50%, от 60% до 70% или даже 100% или более, по сравнению с тем же

лечением (например, химиотерапией), но без антитела против $\alpha\beta6$ в отдельности или в виде конъюгата. Дополнительно или альтернативно, лечение (например, стандартная химиотерапия), включающее антитело против $\alpha\beta6$ в отдельности или в виде конъюгата, может повышать частоту полных ответов, частоту частичных ответов или частоту объективных ответов (полных+частичных) пациентов с опухолями на по меньшей мере 30% или 40%, но предпочтительно 50%, от 60% до 70% или даже 100% по сравнению с тем же лечением (например, химиотерапией), но без антитела против $\alpha\beta6$ в отдельности или в виде конъюгата.

Как правило, в клиническом испытании (например, испытании фазы II, фазы II/III или фазы III) указанные выше повышения медианы выживаемости без прогрессирования и/или частоты ответов пациентов, которых лечат с помощью стандартной терапии и антитела против $\alpha\beta6$ в отдельности или в виде конъюгата, относительно контрольной группы пациентов, подвергаемых стандартной терапии в отдельности (или с плацебо), являются статистически значимыми, например, при $p=0,05$, или $0,01$, или даже $0,001$. Частоты полных и частичных ответов определяют с помощью объективных критериев, общепотребительных в клинических испытаниях в случае злокачественного новообразования, например, как указано или принято Национальным институтом онкологии США и/или Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США.

IX. Промышленные изделия и наборы.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к промышленному изделию или набору, содержащему антитело против $\alpha\beta6$ или конъюгат антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, представленное в настоящем описании. Промышленное изделие или набор может дополнительно содержать инструкции по использованию антитела против $\alpha\beta6$ или конъюгата антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, представленного в настоящем описании, в способах по изобретению. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления промышленное изделие или набор содержит инструкции по использованию антитела против $\alpha\beta6$ или конъюгата антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, представленного в настоящем описании, в способах лечения злокачественного новообразования (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (плоскоклеточного и железистого), рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи), рака пищевода, рака молочной железы (включая инвазивную карциному молочной железы), рака яичника, рака мочевого пузыря (включая уротелиальную карциному), рака кожи (плоскоклеточной карциномы, или SCC), рака почки (включая светлоклеточный рак почки, папиллярную карциному почки и хромофобный почечно-клеточный рак), рака шейки матки, рака желудка, рака предстательной железы (включая аденокарциному предстательной железы), рака эндометрия (включая карциносаркому матки и рак тела матки), аденокарциномы прямой кишки, карциномы щитовидной железы, аденокарциномы толстого кишечника, аденокарциномы желудка и рака поджелудочной железы (включая аденокарциному поджелудочной железы)) у индивидуума, включающих введение индивидууму эффективного количества антитела против $\alpha\beta6$ или конъюгата антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство, представленного в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является NSCLC. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком головы и шеи. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком пищевода. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком молочной железы. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком яичника. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака почки. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака эндометрия. В некоторых вариантах осуществления антитела или конъюгаты антитело-лекарственное средство по изобретению используют в способах лечения рака желудка. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком мочевого пузыря. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком кожи. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком шейки матки. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком желудка. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является раком поджелудочной железы. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Промышленное изделие или набор дополнительно может содержать контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как однокамерные или двухкамерные шприцы) и пробирки. В некоторых вариантах осуществления контейнер является флаконом. Контейнер можно получать из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер удерживает состав.

Промышленное изделие или набор дополнительно может содержать ярлык или вкладыш в упаковку, находящийся на контейнере или прикрепленный к нему контейнер, где можно указывать инструкции по восстановлению и/или использованию состава. На ярлыке или вкладыше в упаковку можно дополнительно указывать, что состав пригоден или предназначен для подкожного, внутривенного (например, внутривенной инфузии) или других способов введения для лечения злокачественного

новообразования у индивидуума (например, немелкоклеточного рака легких (NSCLC) (плоскоклеточного и железистого), рака головы и шеи (включая плоскоклеточную карциному головы и шеи), рака пищевода, рака молочной железы (включая инвазивную карциному молочной железы), рака яичника, рака мочевого пузыря (включая уротелиальную карциному), рака кожи (плоскоклеточной карциномы, или SCC), рака почки (включая светлоклеточный рак почки, папиллярную карциному почки и хромофобный почечно-клеточный рак), рака шейки матки, рака желудка, рака предстательной железы (включая аденокарциному предстательной железы), рака эндометрия (включая карциносаркому матки и рак тела матки), аденокарциномы прямой кишки, карциномы щитовидной железы, аденокарциномы толстого кишечника, аденокарциномы желудка и рака поджелудочной железы (включая аденокарциному поджелудочной железы)). Контейнер, удерживающий состав, может являться одноразовым флаконом или многоразовым флаконом, делающим возможным повторное введение восстановленного состава. Промышленное изделие или набор дополнительно может содержать второй контейнер, содержащий подходящий дилуэнт. Промышленное изделие или набор дополнительно может включать другие материалы, желаемые с коммерческой точки зрения, терапевтической точки зрения и точки зрения пользователя, включая другие буферы, дилуэнты, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши в упаковку с инструкциями по использованию.

Промышленное изделие или набор по изобретению, необязательно, дополнительно содержит контейнер, содержащий второе лекарственное средство, где антитело против $\alpha\beta6$ или конъюгат антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство является первым лекарственным средством, и где промышленное изделие или набор дополнительно содержит инструкции на ярлыке или вкладыше в упаковку для лечения индивидуума с помощью второго лекарственного средства в эффективном количестве. В некоторых вариантах осуществления второе лекарственное средство предназначено для устранения или снижения тяжести одного или более нежелательных явлений.

В некоторых вариантах осуществления антитело против $\alpha\beta6$ или конъюгат антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство находится в контейнере в виде лиофилизированного порока. В некоторых вариантах осуществления лиофилизированный порошок находится в герметично запаянном контейнере, таком как флакон, ампула или саше, на котором указано количество активного средства. Если фармацевтическое средство вводят посредством инъекции, необязательно, например, в качестве части набора можно предоставлять ампулу стерильной воды для инъекций или физиологического раствора, таким образом, что ингредиенты можно смешивать перед введением. Как будет понятно специалистам в этой области, такие наборы могут включать, при желании, один или более из различных общепринятых фармацевтических компонентов, таких как, например, контейнеры с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями, дополнительные контейнеры и т.д. В набор также можно включать печатные инструкции, в виде вкладышей или ярлыков, где указаны количества компонентов, подлежащих введению, инструкции по введению и/или инструкции по смешиванию компонентов.

Х. Другое использование.

Антитела против $\alpha\beta6$, представленные в настоящем описании, такие как гуманизированные антитела против $\alpha\beta6$, можно использовать для детекции $\alpha\beta6$ в контексте клинической диагностики, или лечения, или исследований. Экспрессия $\alpha\beta6$ на злокачественном новообразовании является признаком того, что злокачественное новообразование может поддаваться лечению антителами по настоящему изобретению. Антитела также можно продавать в качестве исследовательских реагентов для лабораторных исследований в детекции клеток, несущих $\alpha\beta6$, и их ответа на различные стимулы. При таком использовании моноклональные антитела можно метить флуоресцентными молекулами, молекулами со спиновыми метками, ферментами или радиоизотопами и предоставлять в форме набора со всеми необходимыми реагентами для осуществления анализа $\alpha\beta6$. Антитела, представленные в настоящем описании, можно использовать для детекции экспрессии белка $\alpha\beta6$ и определения того, поддается ли злокачественное новообразование лечению с помощью ADC $\alpha\beta6$.

Все патентные заявки, веб-сайты, другие публикации, регистрационные номера и т.п., процитированные выше или ниже, в полном объеме включены в качестве ссылки для всех целей в той же степени, как если бы каждый отдельный пункт был конкретно и отдельно указан как включенный в качестве ссылки. Если в разные моменты времени с регистрационным номером ассоциированы разные версии последовательности, подразумевают версию, ассоциированную с регистрационным номером на действительную дату подачи настоящей заявки. Термин "действительная дата подачи" означает более раннюю из точной даты подачи или даты подачи приоритетной заявки, относящейся к регистрационному номеру, если это целесообразно. Аналогично, если разные версии публикации, веб-сайта или т.п. опубликованы в разные моменты времени, подразумевают последнюю опубликованную версию на действительную дату подачи заявки, если не указано иначе. Любой признак, стадию, элемент, вариант осуществления или аспект по изобретению можно использовать в комбинации с любым другим, если не указано иначе. Хотя настоящее изобретение описано в некоторых подробностях с помощью иллюстраций и примеров для ясности и понимания, очевидно, что некоторые изменения и модификации можно осуществлять на практике в объеме формулы изобретения.

Примеры

Материалы.

Линии клеток, описанные в следующих примерах, поддерживали в культуре в соответствии с условиями, определенными American Type Culture Collection (ATCC), Национальным институтом онкологии США (NCI) или Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig, Germany (DMSZ). Линии клеток SW780, линии клеток Detroit 562, линии клеток HPAFII и линии клеток VxPC3 получали из ATCC. Эпителиальные клетки почки человека FreeStyle™ 293-F (Invitrogen Corp) и соответствующих трансфектантов поддерживали по инструкциям производителя. Реагенты для культивирования клеток получали от Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA.), Molecular Devices (Sunnydale, CA) и других поставщиков. Реагенты-вторичные антитела приобретали в Jackson ImmunoResearch Laboratories (West Grove, PA). Рекombинантные $\alpha\beta 1$, $\alpha\beta 3$, $\alpha\beta 5$, $\alpha\beta 6$ и $\alpha\beta 8$ приобретали в R&D Systems (Minneapolis, MN). Клетки FreeStyle™ 293-F экспрессируют эндогенный интегрин $\alpha\upsilon$, и их стабильно трансфицировали с использованием полноразмерной кДНК, кодирующей интегрин $\beta 6$ человека, яванского макака или мыши, для получения линий клеток HEK293F:hu $\beta 6$, HEK293F:супо $\beta 6$ и HEK293F:mu $\beta 6$, соответственно. Клетки HEK293F, трансфицированные с использованием пустого вектора (HEK293F:вектор), использовали в качестве отрицательного контроля. Клетки 3T3 и FDC-P1 мыши, экспрессирующие эндогенный интегрин $\alpha\upsilon$ мыши, трансфицировали с использованием полноразмерного клона кДНК для интегрин $\beta 6$ человека и мыши для получения 3T3:hu $\beta 6$ и FDC-P1:mu $\beta 6$, соответственно.

Способы.

Получение антитела 2A2.

Мышей ICR (CD-1) три раза иммунизировали с помощью интраперитонеальных инъекций $\sim 5 \times 10^6$ трансфектантов 3T3:hu $\beta 6$. За три дня до слияния мышам делали последнюю инъекцию очищенного рекомбинантного $\alpha\upsilon\beta 6$ человека, вводимого внутривенно (6 мкг) и интраперитонеально (30 мкг). Лимфоциты, собранные из селезенки и лимфоузлов, подвергали слиянию с миеломными клетками P3X63Ag8.653 с использованием полиэтиленгликоля. Слитые клетки восстанавливали в течение ночи в средах для выращивания гибридом (IMDM, содержащей 4 мМ глутамин, 10% фетального клона I, 10% фактора клонирования и пенициллин/стрептомицин). После восстановления клетки центрифугировали, а затем высевали в полутвердые среды. Полутвердые среды состояли из среды CloneMatrix, дополненной средами для выращивания гибридом с НАТ для селекции гибридом и CloneDetect для продукции IgG. Гибридомы инкубировали в течение 10 дней при 37°C. В день 10 продуцирующие клоны гибридомы выбирали с использованием ClonePixFL (Molecular Devices) и переносили в 96-луночные планшеты, содержащие IgG-истощенные среды для выращивания гибридом с НТ. Супернатанты культур гибридом подвергали скринингу на трансфектантах 293F:hu $\beta 6$ и идентифицировали положительные клоны с помощью меченого AlexaFluor-647 вторичного антитела для детекции. Планшеты считывали с помощью FMAT 8200 (Applied Biosystems). Гибридомы, связанные с 293F:hu $\beta 6$ и 293F:супо $\beta 6$, но не 293F:вектор, подвергали экспансии для прямой конъюгации с лекарственными средствами-линкерами. Панель напрямую конъюгированных антител тестировали в анализах связывания и цитотоксичности.

ELISA блокирования LAP.

96-луночные планшеты для микротитрования (Nunc) покрывали в течение ночи при 4°C с использованием 0,3 мкг/мл рекомбинантного ассоциированного с латентностью пептида человека (rhuLAP) (полученного своими силами; лот № 09-19-09DS) в 1-кратном PBS. После удаления покрывающего раствора планшеты блокировали 3% BSA в Tris-забуференном физиологическом растворе (TBS) в течение одного часа при комнатной температуре, а затем промывали 5 раз PBS+0,05% Tween-20 (PBST) перед использованием. В отдельном 96-луночном планшете с коническим дном 0,25 мкг/мл рекомбинантного $\alpha\upsilon\beta 6$ -биотина человека (rhu) (полученного своими силами rhu $\alpha\upsilon\beta 6$ -биотин, лот № 171030A) предварительно инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре с увеличивающимися концентрациями очищенного антитела в буфере TBS, содержащем 1 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂ и 1 мг/мл BSA в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем смесь антитело/ $\alpha\upsilon\beta 6$ -биотин переносили в покрытый LAP планшет и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч. Планшеты промывали, как описано выше, и инкубировали с 50 мкл/лунку конъюгированного с пероксидазой стрептавидина (Jackson ImmunoResearch, #016-030-084), разведенного 1:1000 в TBS+1 мг/мл BSA, при комнатной температуре в течение 1 ч. Связанный белок и сигнал определяли с использованием ТМВ (Invitrogen, #00-2023), инкубировали в течение 5,5 мин, а затем тушили 1 Н H₂SO₄ (Fisher, #SA212-1). Планшеты незамедлительно считывали с помощью спектрофотометра для чтения планшетов (спектрофотометра для чтения микропланшетов Molecular Devices Vmax Kinetic) при длине волны 450 нм. Данные экспортировали в Microsoft Excel и анализировали с помощью GraphPad Prism v5.03.

Анализы конкурентного связывания - гуманизированные варианты антител 2A2.

Анализы конкурентного связывания осуществляли с использованием линии клеток 293F:hu $\beta 6$. $0,1 \times 10^6$ антиген-экспрессирующих клеток аликвотировали в каждую лунку 96-луночного планшета с v-образным дном на льду. Клетки инкубировали в течение 1 ч с 2 нМ меченого AlexaFluor-647 m2A2 и

увеличивающимися концентрациями (0,03-500 нМ) немеченого гуманизированного варианта антитела 2A2 в буфере для FACS (Tris-забуференном физиологическом растворе, 2% эмбриональной телячьей сыворотке, 0,5 мМ $MnCl_2$, 0,02% NaN_3). Клетки осаждали и промывали 3 раза TBS/FBS. Клетки осаждали и ресуспендировали в 125 мкл TBS/FBS. Флуоресцентный сигнал связывания определяли с использованием Becton Dickinson Biosciences LSR II (San Jose, CA). Процент насыщенного флуоресцентного сигнала использовали для определения процента связанного меченого гуманизированного антитела 2A2 и последующей экстраполяции EC_{50} посредством аппроксимации данных к сигмовидной кривой доза-эффект с переменным угловым коэффициентом с использованием программного обеспечения GraphPad (LaJolla, CA).

Анализ конкурентного связывания - $\alpha\beta6$ человека и яванского макака.

Анализ конкурентного связывания осуществляли с использованием линий клеток 293F:hu $\beta6$ и HEK293F:cyно $\beta6$. $0,1 \times 10^6$ антиген-экспрессирующих клеток аликвотировали в каждую лунку 96-луночного планшета с v-образным дном на льду. Клетки инкубировали в течение 1 ч с 2 нМ меченого AlexaFluor-647 гуманизированного 2A2 HCLG и увеличивающимися концентрациями (4 пМ-1 мкМ) немеченого гуманизированного антитела 2A2 HCLG и h2A2-Mdpr-PEG(12)-gluc-MMAE(8) в буфере (Tris-забуференном физиологическом растворе, 2% эмбриональной телячьей сыворотке, 0,5 мМ $MnCl_2$, 0,02% NaN_3). Клетки осаждали и промывали 3 раза TBS/FBS. Клетки осаждали и ресуспендировали в 125 мкл TBS/FBS. Флуоресцентный сигнал связывания определяли с использованием Becton Dickinson Biosciences LSR II (San Jose, CA). Процент насыщенного флуоресцентного сигнала использовали для определения процента меченого гуманизированного антитела 2A2, связанного с клетками, и последующей экстраполяции EC_{50} посредством аппроксимации данных к сигмовидной кривой доза-эффект с переменным угловым коэффициентом с использованием программного обеспечения GraphPad (LaJolla, CA).

Анализ насыщения связывания $\alpha\beta6$ - $\alpha\beta6$ человека и яванского макака.

Исследования насыщения связывания осуществляли с использованием следующих антиген-экспрессирующих линий клеток: 293F:hu $\beta6$ и 293F:cyно $\beta6$. $0,1 \times 10^6$ антиген-экспрессирующих клеток аликвотировали на лунку 96-луночного планшета с v-образным дном. m2A2 и h2A2 HCLG напрямую метили AlexaFluor-647 и добавляли в клетки в концентрациях в диапазоне от 6 пМ до 340 нМ в буфере (Tris-забуференном физиологическом растворе, 2% эмбриональной телячьей сыворотке, 0,5 мМ $MnCl_2$, 0,02% NaN_3). Клетки инкубировали в течение 1 ч, затем осаждали и промывали 3 раза TBS. Клетки осаждали и ресуспендировали в 120 мкл TBS. Флуоресцентный сигнал связывания определяли с использованием Becton Dickinson Biosciences LSR II (San Jose, CA). EC_{50} вычисляли с использованием программного обеспечения GraphPad (LaJolla, CA).

ELISA.

96-луночные планшеты Maxisorb (Nunc) покрывали в течение ночи при 4°C 1 мкг/мл рекомбинантного $\alpha\beta1$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$ и $\alpha\beta8$ человека (R&D Systems, MN), разведенного в 50 мМ карбонатного буфера (Sa, MO). Планшеты промывали PBS+0,05% Tween 20 (PBS-T). Промывочный буфер удаляли и планшеты блокировали в течение 2 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере TBS (TBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA). Планшеты промывали, а затем инкубировали в течение 2 ч с гуманизированным антителом 2A2, разведенным в связывающем буфере TBS (TBS, 0,05% Tween 20, 1% BSA, 1 мМ $MnCl_2$) в концентрациях в диапазоне от 1 пМ до 67 нМ (10 мкг/мл). Планшеты промывали, инкубировали в течение 1 ч с разведением 1:5000 HRP-конъюгированного антитела против Fc человека (Jackson ImmunoResearch, PA), промывали, а затем инкубировали с субстратом TMB в течение 5 мин. Реакцию прекращали с помощью 1 М HCl. Поглощение при 450 нм считывали с использованием спектрофотометра для чтения планшетов Fusion HT (Perkin Elmer, Waltham, MA).

Количественный проточный цитометрический анализ.

Количество копий $\alpha\beta6$ на поверхности клеток определяли с использованием mAb против $\alpha\beta6$ мыши в качестве первичного антитела и непрямого проточного цитометрического анализа DAKO QiFiKit по инструкциям производителя (DAKO A/S, Glostrup, Denmark) и оценивали с помощью проточного цитометра Becton Dickinson FACScan.

Анализ цитотоксичности *in vitro*.

Опухолевые клетки инкубировали с конъюгатами антитело против $\alpha\beta6$ -лекарственное средство в течение 96 ч при 37°C. Жизнеспособность клеток определяли с использованием люминесцентного анализа CellTiter-Glo® (Promega Corporation, Madison, WI) и результаты измеряли с помощью многоканального спектрофотометра для чтения планшетов EnVision (Perkin Elmer, Waltham, MA). Результаты регистрировали как IC_{50} , определяемую как концентрация, приводящая к полумаксимальному ингибированию роста по ходу кривой титрования.

Получение конъюгатов антитело-лекарственное средство.

Конъюгаты антитело-лекарственное средство антител против $\alpha\beta6$ получали, как описано в US20050238649 и WO2015/057699. Лекарственные средства-линкеры vMMAE (также известные как 1006) и mCMMAF описаны в US20050238649, включенном в настоящее описание в качестве ссылки для всех целей. Лекарственное средство-линкер MDpr-Lys(PEGx)-глюкуронид-линкер MMAE описано в

WO2015/057699, включенном в настоящее описание в качестве ссылки для всех целей.

Исследование активности *in vivo*.

Для терапевтических экспериментов на полученных из линий клеток ксенотрансплантатах 5×10^6 клеток (ATCC) инъецировали подкожно 5-8 самкам бестимусных (nu/nu) мышей (Envigo) для исследований клеток VxPC3, Detroit 562, HPAF-II и SW780. Мышей случайным образом разделяли на исследуемые группы и вводили им тестируемый препарат посредством интраперитонеальной инъекции после достижения опухолями приблизительно 100 мм^3 . Животных умерщвляли, когда объемы опухолей достигали $500-1000 \text{ мм}^3$. Объем опухоли вычисляли по формуле (объем = $\frac{1}{2} \times \text{длина} \times \text{ширина} \times \text{ширина}$). Мышей, демонстрировавших устойчивое регрессирование, умерщвляли приблизительно в день 40-65 после имплантации. Во всех исследованиях ксенотрансплантатов не наблюдали потери веса или связанной с лечением токсичности у мышей, которых лечили любым из тестовых препаратов. Все процедуры с животными осуществляли по протоколу, одобренному Институциональным комитетом по содержанию и использованию животных в виварии, аккредитованном Международной ассоциацией оценки и аккредитации лабораторных исследований на животных.

В дополнение к полученным из линий клеток ксенотрансплантатам, противоопухолевую активность ADC h2A2 vsMMAE против моделей полученных из пациентов ксенотрансплантатов (PDX) немелкоклеточного рака легких (NSCLC) исследовали с использованием моделей, поддерживаемых с помощью Champions Oncology (Hackensack NJ). Эти модели PDX включают образцы NSCLC железистой и плоскоклеточной гистологии. Эти модели получали посредством имплантации иммунокомпрометированным мышам и позволяли им расти до объема опухоли $150-300 \text{ мм}^3$, затем мышей рандомизировали в группы лечения и контрольные группы и вводили им h2A2 vsMMAE или несвязывающий контроль ADC h00 vsMMAE. Мышам вводили 3 мг/кг ADC еженедельно всего в трех дозах. Объемы опухолей измеряли дважды в неделю в течение 28 дней после первой дозы или до достижения опухолями объема 1500 мм^3 .

Противоопухолевую активность h2A2 vsMMAE ADC дополнительно оценивали в моделях PDX карциномы яичника, поддерживаемых с помощью Champions Oncology (Hackensack NJ). Эти модели получали посредством имплантации иммунокомпрометированным мышам и позволяли им расти до объема опухоли $150-300 \text{ мм}^3$, затем мышей рандомизировали в группы лечения и контрольные группы и вводили им ADC. Мышам вводили 5 мг/кг ADC еженедельно всего в трех дозах. Объемы опухолей измеряли дважды в неделю в течение 28 дней после первой дозы или до достижения опухолями объема 1500 мм^3 до максимума 60 дней.

Результаты.

Мышиный клон m2A2 выбирали из панели гибридом, т.к. он демонстрировал цитотоксическую активность в качестве ADC на множестве $\alpha\beta6$ -положительных линий опухолевых клеток, и он имел сравнимую аффинность с формами антигена человека и яванского макака. Специфичность 2A2 мыши подтверждали в исследованиях связывания FMAT и проточной цитометрии, где было показано, что антитела связывались с трансфектантами 293F:hu $\beta6$, но не $\alpha\beta5$ -положительной родительской линией (293F:вектор). Показано, что интегрин $\alpha\beta6$ является рецептором для участков RGD в фибронектине (Weinacker et al., 1994), тенасцине (Prieto et al., 1993), витронектине (Huang et al., 1998) и ассоциированном с латентностью пептиде (LAP) (Munger et al., 1999). Связывание интегрин $\alpha\beta6$ с LAP может индуцировать пространственно ограниченную активацию трансформирующего фактора роста бета 1 (TGF β) (Munger et al., 1999). Осуществляли анализ блокирования ассоциированного с латентностью пептида (LAP) (фиг. 1), показавший, что m2A2 (SG-44.2A2) не блокирует LAP в отличие от антитела против $\alpha\beta6$ m15H3 (SG-42.15H3) (см. WO2013/123152) и положительного контроля 10D5. Это позволяет предполагать, что антитело 2A2 можно доставлять независимо от связывания лиганда. Отрицательным контролем являлся несвязывающий контроль, и SG-44.8B9, SG-33.20B8, SG-44.32A6 и SG-44.34D6 являлись другими клонами, выбранными из панели гибридом.

Связывание антитела мыши.

EC₅₀ связывания моноклонального антитела мыши определяли для $\alpha\beta6$ человека и яванского макака посредством исследований насыщения связывания с использованием генетически сконструированных линий клеток (293F:hu $\beta6$, 293F:супо $\beta6$) (фиг. 2). Генетически сконструированные линии клеток экспрессируют эндогенный $\alpha\beta$, спаривающийся с рекомбинантной цепью $\beta6$ с образованием гетеродимерного рецептора, состоящего из эндогенного $\alpha\beta$ и рекомбинантного $\beta6$.

Дизайн и селекция гуманизированных антител.

Начальной точкой или донорным антителом для гуманизации в этом примере является антитело мыши. Использовали геномные последовательности, представленные IGHV1-46 и IGHJ4 для тяжелой цепи и IGKV1D-33 и IGKJ2 для легкой цепи.

При гуманизации идентифицировали десять положений в каркасе тяжелой цепи (H2, H28, H48, H67, H69, H71, H73, H74, H78, H93; фиг. 3) и два положений в каркасе легкой цепи (L69 и L71; фиг. 4), в которых акцепторная последовательность человека отличается от донорной последовательности, и которые могут влиять на связывание антитела в результате прямого контакта с антигеном, что влияет на конформацию CDR или упаковывание между тяжелыми и легкими цепями. Получали четыре варианта

гуманизированной тяжелой цепи (vHA, vHB, vHC, vHD; фиг. 3) и восемь вариантов гуманизированной легкой цепи (vLA, vLB, vLC, vLD, vLE, vLF, vLG, vLH; фиг. 4), включающие обратные мутации в различных пермутациях этих положений. Эти обратные мутации определены в табл. 1-4. Остальная часть положений каркаса занята остатками из акцепторной последовательности человека.

Таблица 1

Гуманизирующие мутации в вариантах тяжелой цепи

Вариант vH	Акцепторная последовательность экзона HV	Донорные каркасные остатки мыши	Акцепторные остатки человека
hvHA	IGHV1-46/HJ4	H2, H28, H93	нет
hvHB	IGHV1-46/HJ4	H2, H28, H74, H93	нет
hvHC	IGHV1-46/HJ4	H2, H28, H48, H67, H69, H71, H73, H78, H93	нет
hvHD	IGHV1-46/HJ4	H2, H28, H48, H67, H69, H71, H73, H74, H78, H93	нет

Таблица 2

Специфические мутации каркаса мыши в вариантах тяжелой цепи

Вариант	2	28	48	67	69	71	73	74	78	93	% человека
hvHA	F	S								T	85,7
hvHB	F	S						P		T	84,7
hvHC	F	S	I	A	L	V	K		A	T	79,6
hvHD	F	S	I	A	L	V	K	P	A	T	78,6

Таблица 3

Гуманизирующие мутации в вариантах легкой цепи каппа

Вариант vK	Акцепторная последовательность экзона KV	Донорные каркасные остатки мыши	Акцепторные остатки человека
hvLA	IGKV1D-33/KJ2	нет	нет
hvLB	IGKV1D-33/KJ2	L69, L71	нет
hvLC	IGKV1D-33/KJ2	L69, L71	L56
hvLD	IGKV1D-33/KJ2	L71	нет
hvLE	IGKV1D-33/KJ2	L69, L71	L24
hvLF	IGKV1D-33/KJ2	L71	L24, L56
hvLG	IGKV1D-33/KJ2	L69, L71	L55
hvLH	IGKV1D-33/KJ2	L69	нет

Таблица 4

Специфические мутации каркаса мыши в вариантах легкой цепи каппа

Вариант	69	71	% человека
hvLA			84,2
hvLB	R	Y	82,1
hvLC	R	Y	83,2
hvLD		Y	83,2
hvLE	R	Y	83,2
hvLF		Y	85,3
hvLG	R	Y	83,2
hvLH	R		83,2

Затем экспрессируют гуманизированные антитела, представляющие собой комбинаторные пермутации этих гуманизированных вариантов тяжелой и легкой цепи. Кривые конкурентного связывания получаемых вариантов гуманизированного антитела (вместе с антителом мыши 2A2 и химерным антителом человека-мыши) с $\alpha\beta6$ человека показаны на фиг. 5-7. Для дальнейшего анализа активности *in vitro* выбирали четыре гуманизированных варианта. Противоопухолевую активность *in vitro* гуманизированных вариантов HCLE, HCLG, HCLH, HALG и гуманизированного антитела против $\alpha\beta6$ 15H3-HTLC (каждое из которых конъюгировано с лекарственным средством-линкером. Via, n=12, R^{PK}=H, R²¹=CH₃) измеряли с использованием анализа цитотоксичности в четырех линиях клеток, экспрессирующих $\alpha\beta6$ на различных уровнях с учетом количественного проточного цитометрического

анализа (клетки рака поджелудочной железы HPAFII и VxPC-3, клетки рака головы и шеи Detroit 562 и клетки рака мочевого пузыря SW780). Результаты показаны в табл. 5.

Таблица 5

Анализ активности *in vitro* ($\times 50$, нМ)

	VxPC-3	Detroit 562	HPAF-II	SW780
HCLE	6	17,6	14,8	7,9
HCLG	5,1	13,2	10	5,2
HCLH	15,5	28,4	28,7	11,6
HALG	8,2	21,2	17,9	19,6
m2A2	11,1	19,4	15,6	11,7
h15H3-HTLC	8,4	305	8,9	13,8

Для дальнейшего анализа выбирали гуманизированный вариант, содержащий вариант тяжелой цепи hvHC и вариант легкой цепи hvLG (h2A2 HCLG).

Связывание h2A2 HCLG с $\alpha\nu\beta 6$ человека и яванского макака подтверждали по насыщению связывания (фиг. 8), включающее родительское 2A2 мыши в качестве референса для демонстрации сравнимого связывания между ним и гуманизированным вариантом. Связывание h2A2 HCLG с $\alpha\nu\beta 6$ человека и яванского макака также подтверждали по конкурентному связыванию относительно флуоресцентно меченого 2A2 мыши (фиг. 9). Этот анализ также включал связывание ADC, полученного с использованием h2A2 HCLG и лекарственного средства-линкера SGD-5088, посредством восстановления межцепочечных дисульфидных связей антитела и конъюгации с восемью копиями лекарственного средства-линкера. Конъюгация не оказывает влияния на связывание с $\alpha\nu\beta 6$ человека или яванского макака. Специфичность связывания h2A2 HCLG также подтверждали посредством ELISA, в котором антитело связывалось с рекомбинантным $\alpha\nu\beta 6$ человека, но не $\alpha\nu\beta 1$, $\alpha\nu\beta 3$, $\alpha\nu\beta 5$ или $\alpha\nu\beta 8$ (фиг. 10).

Противоопухолевая активность ADC h2A2 *in vitro*.

Противоопухолевую активность *in vitro* гуманизованного варианта HCLG при конъюгации с vcMMAE измеряли с использованием анализов цитотоксичности в четырех линиях клеток, экспрессирующих $\alpha\nu\beta 6$, на различных уровнях с учетом количественного проточного цитометрического анализа (клетки рака поджелудочной железы HPAFII и VxPC-3, клетки рака головы и шеи Detroit 562 и клетки рака мочевого пузыря SW780). На фиг. 11 показано, что гуманизированный ADC 2A2 против $\alpha\nu\beta 6$ демонстрировал свойства уничтожения клеток в этих анализах.

Противоопухолевая активность ADC h2A2 *in vivo*.

Используя те же четыре линии клеток, тестируемые *in vitro*, демонстрировали противоопухолевую активность гуманизованного антитела HCLG 2A2, конъюгированного с vcMMAE (в среднем 4 лекарственных средства на антитело) *in vivo* (фигуры 12-15). Наблюдали значительную задержку роста опухоли или регрессирование опухоли по сравнению с необработанными и несвязывающими контрольными ADC. Обозначение "h2A2 HCLG-1006(4)" относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство гуманизированной формы HCLG родительского антитела мыши 2A2, имеющей в среднем 4 молекулы лекарственного средства-линкера vcMMAE на антитело. Обозначение "h00-1006 (4)" относится к конъюгату антитело-лекарственное средство несвязывающего контрольного антитела, имеющего в среднем 4 молекулы лекарственного средства-линкера vcMMAE на антитело.

В моделях PDX NSCLC гуманизованное антитело 2A2 HCLG, конъюгированное с vcMMAE (в среднем 4 лекарственных средства на антитело), также демонстрировало противоопухолевую активность (фиг. 16). Наблюдали значительную задержку роста опухоли или регрессирование опухоли по сравнению с необработанными и несвязывающими контрольными ADC. Обозначение "h2A2 HCLG-1006 (4)" относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство гуманизированной формы HCLG родительского антитела мыши 2A2, имеющего в среднем 4 молекулы лекарственного средства-линкера vcMMAE на антитело. Обозначение "h00-1006 (4)" относится к конъюгату антитело-лекарственное средство несвязывающего контрольного антитела, имеющего в среднем 4 молекулы лекарственного средства-линкера на антитело.

В моделях PDX карциномы яичника гуманизованное антитело 2A2 HCLG, конъюгированное с vcMMAE (в среднем 4 лекарственных средства на антитело), также демонстрировало противоопухолевую активность (фиг. 17). Наблюдали значительную задержку роста опухоли или регрессирование опухоли по сравнению с необработанными опухолями. Обозначение "h2A2 HCLG-1006 (4)" относится к конъюгатам антитело-лекарственное средство гуманизированной формы HCLG родительского антитела мыши 2A2, имеющего в среднем 4 молекулы лекарственного средства-линкера vcMMAE на антитело.

Противоопухолевую активность h2A2 HCLG сравнивали с h15H3 при конъюгации с лекарственным средством-линкером VIa ($n=12$, $R^{PR}=H$, $R^{21}=CH_3$) с DAR 8. Протокол исследования являлся таким же, как описано выше для моделей ксенотрансплантатов, полученных из линий клеток, с использованием линий клеток HPAFII и VxPC3. Животным однократно вводили 3 мг/кг h2A2 HCLG, h15H3 или

ненаправленного контрольного (h00) ADC (фиг. 18). В обеих моделях ADC h2A2 HCLG демонстрировали длительное регрессирование имплантированных опухолей, в то время как ADC h15H3 демонстрировали задержку роста.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 - vH m2A2
 EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNVNWVKQSNQKSLEWIGVINPKYGTTR
 YNQKFKGKATLTVDKPSSAYMQLNSLTSEDSAVYYCTRGLNNAWDYWGQGASVTVSS

SEQ ID NO: 2 - mIGHV1-39 (наиболее близкий V-ген зародышевой линии мыши)
 EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNQKSLEWIGVINPNYGTTS
 YNQKFKGKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR

SEQ ID NO: 3 - hIGHV1-46/HJ4
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGQGLEWMGIINPSGGS
 TSYAQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARYFDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 4 - vHA h2A2
 QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNVNWVWRQAPGQGLEWMGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SS

SEQ ID NO: 5 - vHB h2A2
 QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNVNWVWRQAPGQGLEWMGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRVTMTRDTPSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SS

SEQ ID NO: 6 - vHC h2A2
 QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNVNWVWRQAPGQGLEWIGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SS

SEQ ID NO: 7 - vHD h2A2
 QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYSFTDYNVNWVWRQAPGQGLEWIGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRATLTVDKPTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SS

SEQ ID NO: 8 - vL m2A2
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALNHWYQRKQKSPQLLIYGATNLADGMS
 SRFSGSGSGRQYSFKISSLHPDDVATYYCQNVLTTPYTFGGGKLEIL

SEQ ID NO: 9 - mIGKV12-89 (наиболее близкий V-ген зародышевой линии мыши)
 DIQMTQSPASLSASVGETVTITCGASENIYGALNHWYQRKQKSPQLLIYGATNLADGMS
 SRFSGSGSGRQYSLKISSLHPDDVATYYCQNVLTSTP

SEQ ID NO: 10 - hIGKV1D-33/KJ2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPS
 RFSGSGSGTDFTFITISLQPEDATYYCQYQDNLPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 11 - vLA h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVP
 SRFSGSGSGTDFTFITIFISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 12 - vLB h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVP
 SRFSGSGSGRDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 13 - vLC h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLATGVP
 SRFSGSGSGRDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 14 - vLD h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVP
 SRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 15 - vLE h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVP
 SRFSGSGSGRDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 16 - vLF h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLATGVP
 SRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 17 - vLG h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLEDGVP
 SRFSGSGSGRDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 18 - vLH h2A2
 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVP
 SRFSGSGSGRDFTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO: 19 - тяжелая цепь HA h2A2

QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNVNWVRQAPGQGLEWMGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVT
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 20 - тяжелая цепь HB h2A2

QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNVNWVRQAPGQGLEWMGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRVTMTRDPTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 21 - тяжелая цепь HC h2A2

QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNVNWVRQAPGQGLEWIGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 22 - тяжелая цепь HD h2A2

QFQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYSFTDYNVNWVRQAPGQGLEWIGVINPKYGT
 TRYNQKFKGRATLTVDKPTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTRGLNAWDYWGQGLTVTV
 SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELL
 GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPP
 SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 23 - легкая цепь LA h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVP
 SRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 24 - легкая цепь LB h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVP
 SRFSGSGSGRDTFTFTISSLPEDIATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 25 - легкая цепь LC h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVP
 SRFSGSGSGRDTFTFTISSLPEDIATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 26 - легкая цепь LD h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVP
 SRFSGSGSGTDYFTFTISSLPEDIATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 27 - легкая цепь LE h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLDGVP
 SRFSGSGSGRDTFTFTISSLPEDIATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 28 - легкая цепь LF h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCQASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLATGVP
 SRFSGSGSGTDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 29 - легкая цепь LG h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLEDGVP
 SRFSGSGSGRDYTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 30 - легкая цепь LH h2A2

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCGASENIYGALNHWYQQKPGKAPKLLIYGATNLADGVP
 SRFSGSGSGRDFTFITISLQPEDATYYCQNVLTTPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS
 DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTL
 TLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 31 - CDR1 HA, HB, HC, HD, KABAT

DYNVN

SEQ ID NO: 32 - CDR2 HA, HB, HC, HD, KABAT

VAPKYGTTRYNQKFKG

SEQ ID NO: 33 - CDR3 HA, HB, HC, HD, KABAT

GLNAWDY

SEQ ID NO: 34 - CDR1HA, HB, HC, HD, IMGT

GYSFTDYN

SEQ ID NO: 35 - CDR2 HA, HB, HC, HD, IMGT

INPKYGTT

SEQ ID NO: 36 - CDR3 HA, HB, HC, HD, IMGT

TRGLNAWDY

SEQ ID NO: 37 - CDR1 LA, LB, LC, LD, LG, LH, KABAT

GASENIYGALN

SEQ ID NO: 38 - CDR2 LA, LB, LD, LE, LH, KABAT

GATNLAD

SEQ ID NO: 39 - CDR3 LA, LB, LC, LD, LE, LF, LG, LH, KABAT

QNVLTTPYT

SEQ ID NO: 40 - CDR1 LE, LF, KABAT

QASENIYGALN

SEQ ID NO: 41 - CDR2 LC, LF, KABAT

GATNLAT

SEQ ID NO: 42 - CDR2 LG, KABAT

GATNLED

SEQ ID NO: 43 - CDR1 LA, LB, LC, LD, LE, LF, LG, LH, IMGT

ENIYGA

SEQ ID NO: 44 - CDR2 LA, LB, LC, LD, LE, LF, LG, LH, IMGT

GAT

SEQ ID NO: 45 - CDR3 LA, LB, LC, LD, LE, LF, LG, LH, IMGT

QNVLTTPYT

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное антитело против альфа-в бета-6 ($\alpha\upsilon\beta 6$) или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 31;
 - (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32; и
 - (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 33; и
- где переменная область легкой цепи содержит:

- (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 37;
- (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 42; и
- (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 39, где CDR определяют по Kabat.

2. Выделенное антитело против $\alpha\upsilon\beta 6$ или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи содержит:

- (i) CDR-H1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 34;

- (ii) CDR-H2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 35; и
 (iii) CDR-H3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 36; и
 где переменная область легкой цепи содержит:
 (i) CDR-L1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 43;
 (ii) CDR-L2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 44; и
 (iii) CDR-L3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 45, где CDR определяют по IMGT.
3. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, где антитело является гуманизованным.
4. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3,
 где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и
 переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 90% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.
5. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4,
 где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и
 переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 95% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.
6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5,
 где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и
 переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, имеющую по меньшей мере 99% идентичности последовательности в отношении аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 17.
7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-6,
 где переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 и
 переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17.
8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.4,
 где H2 занято F, H28 занято S, H48 занято I, H67 занято A, H69 занято L, H71 занято V, H73 занято K, H78 занято A, H93 занято T, L69 занято R и L71 занято Y и
 нумерацию осуществляют по системе нумерации Kabat.
9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-8,
 где тяжелая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 21, и
 легкая цепь имеет аминокислотную последовательность, содержащую SEQ ID NO: 29.
10. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-9, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент является антигенсвязывающим фрагментом и антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из Fab, Fab', F(ab')₂, Fab'-SH, Fv, диатела, линейного антитела и одноцепочечного фрагмента антитела.
11. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-10,
 где переменная область тяжелой цепи антитела слита с константной областью тяжелой цепи и
 переменная область легкой цепи слита с константной областью легкой цепи.
12. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п.11, где константная область тяжелой цепи принадлежит изотипу IgG1.
13. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12, конъюгированное с цитотоксическим или цитостатическим средством.
14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.13, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим средством через линкер.
15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13, 14, где цитотоксическое или цитостатическое средство является монометилауристатином.
16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-15, где монометилауристин является монометилауристатином (ММАЕ).
17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с ММАЕ через ферментативно расщепляемую линкерную единицу.
18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.17, где ферментативно расщепляемая линкерная единица содержит линкер Val-Cit.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.18, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с ММАЕ через линкерную единицу, имеющую формулу



где -А- является единицей-вставкой, а является 0 или 1;

-W- является аминокислотной единицей, w является целым числом в диапазоне от 0 до 12 и

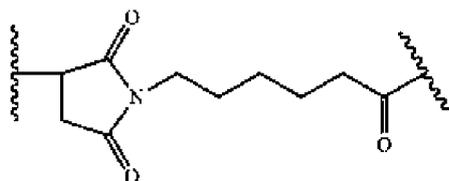
-Y- является спейсерной единицей, у составляет 0, 1 или 2.

20. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.19,

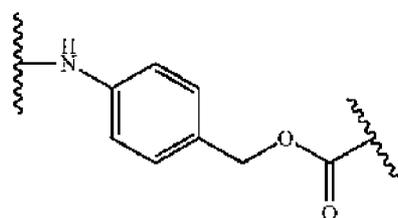
где единица-вставка имеет структуру формулы I ниже,

аминокислотная единица является Val-Cit и

спейсерная единица является группой p-аминобензилового спирта (РАВ), имеющей структуру формулы II ниже

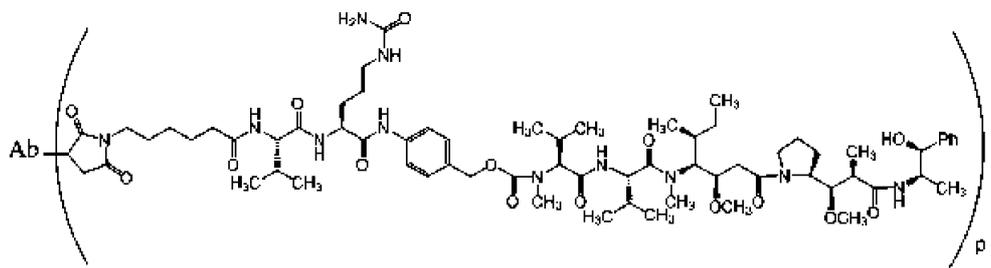


Формула I;



Формула II.

21. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.14-20, где линкер соединен с мономилауристатином E с образованием конъюгата антитело-лекарственное средство, имеющего структуру



где Ab является антителом и p означает число от 1 до 16.

22. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.21, где среднее значение p в популяции конъюгатов антитело-лекарственное средство составляет приблизительно 4.

23. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи по любому из пп.1-12.

24. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи по любому из пп.1-12.

25. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельную область легкой цепи по любому из пп.1-12.

26. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по любому из пп.23-25.

27. Вектор по п.26, где вектор является вектором экспрессии.

28. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п.23 или нуклеиновые кислоты по п.24 и 25.

29. Клетка-хозяин по п.28, где клетка-хозяин является клеткой яичника китайского хомяка (СНО).

30. Способ получения антитела против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п.28 или 29 в условиях, подходящих для получения антитела против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ или его антигенсвязывающего фрагмента.

31. Способ по п.30, дополнительно включающий выделение антитела против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ или его антигенсвязывающего фрагмента, продуцируемого клеткой-хозяином.

32. Способ получения конъюгата антитело против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ -лекарственное средство, включающий культивирование клетки-хозяина по п.28 или 29 в условиях, подходящих для получения антитела против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$;

выделение антитела против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$, продуцируемого клеткой-хозяином; и

конъюгацию антитела против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ с цитотоксическим или цитостатическим средством.

33. Способ по п.32, где антитело против $\alpha\text{v}\beta\text{6}$ конъюгировано с цитотоксическим или цитостатическим средством через линкер.

34. Способ по п.33, где линкер является линкером Val-Cit.

35. Способ по любому из пп.32-34, где цитотоксическое или цитостатическое средство является монометилауристатином (ММАЕ).

36. Способ лечения злокачественного новообразования у индивидуума, включающий введение индивидууму антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-12 или конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-22.

37. Способ по п.36, где злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из немелкоклеточного рака легких (NSCLC), рака головы и шеи, рака пищевода, рака молочной железы, рака яичников, рака мочевого пузыря, рака кожи (SCC), рака яичника, рака шейки матки, рака желудка и рака поджелудочной железы.

38. Способ по п.36, где злокачественное новообразование является немелкоклеточным раком легких.

39. Способ по п.36, где злокачественное новообразование является раком головы и шеи.

40. Способ по п.36, где злокачественное новообразование представляет собой рак пищевода.

41. Способ по любому из пп.36-40, где антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство находится в фармацевтической композиции, содержащей антитело, или антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемый носитель.

42. Способ по любому из пп.36-41, где индивидуум является человеком.

43. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-12 или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.13-22 и одно или более средств, выбранных из группы, состоящей из физиологически приемлемого носителя, дилуента, эксципиента и вспомогательного средства.

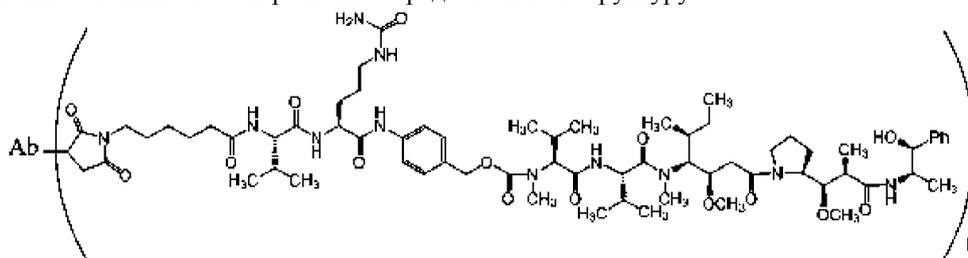
44. Фармацевтическая композиция по п.43, где композицию вводят в комбинации с лучевой терапией или химиотерапевтическим средством.

45. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий выделенное антитело против $\alpha\text{v}\beta_6$, конъюгированное с vcMMAE ,

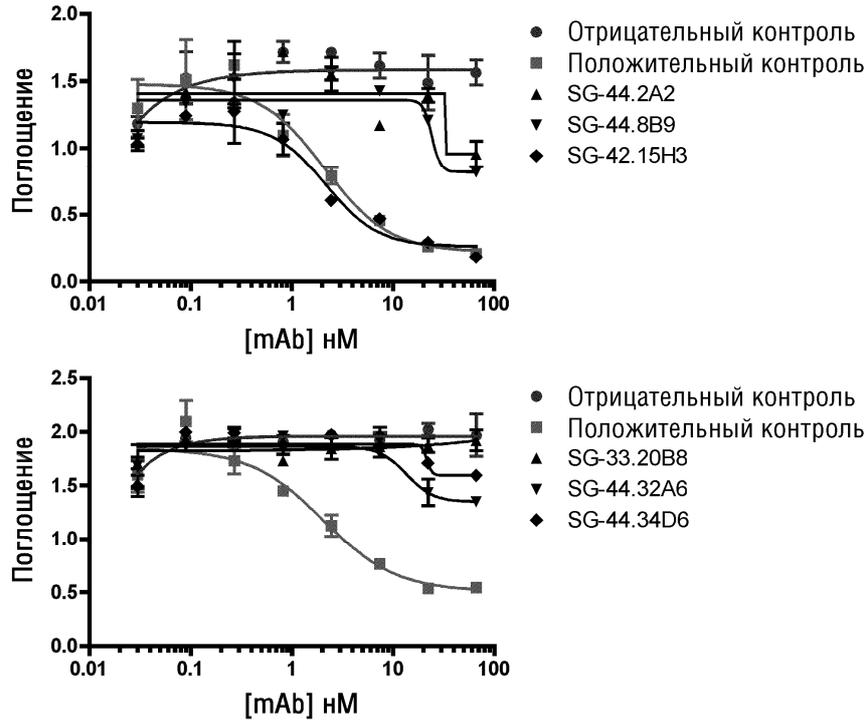
где антитело имеет вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6, и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, и

где конъюгат антитело-лекарственное средство имеет структуру

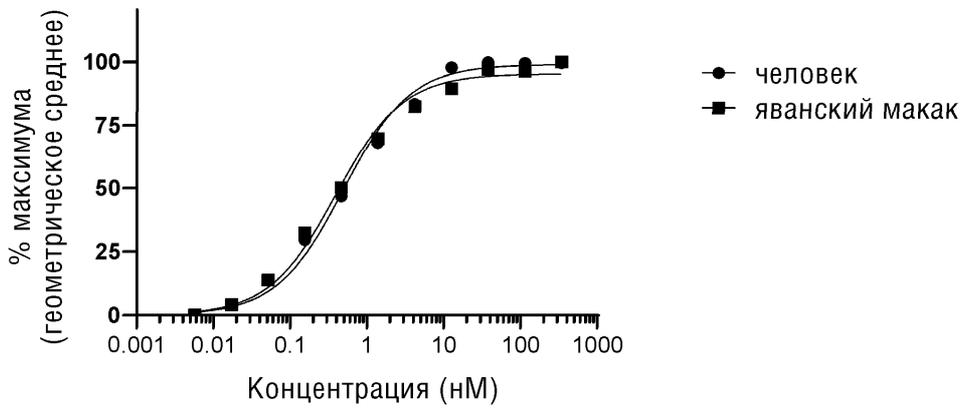


где Ab является антителом и p означает число от 1 до 16.



Фиг. 1

Насыщение связывания m2A2-aVB6



mAb	EC50 для aVB6 человека (нМ)	EC50 для aVB6 яванского макака (нМ)
m2A2-AF647	0.5	0.4

Фиг. 2

Выравнивание вариантов тяжелой цепи h2A2 с акцепторной последовательностью человека, IGHV1-46/HJ4

```

          10      20      30      40      50
m2A2 vH      EF..Q...P.LV.....I.....S..D.NVN..K.SN.KS...I.V...KY.T.R.
hIGHV1-46/HJ4 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSYMHVWRQAPGGLEWMIINPSGGSTSY
h2A2 vHA      .F.....S..D.NVN.....V...KY.T.R.
h2A2 vHB      .F.....S..D.NVN.....V...KY.T.R.
h2A2 vHC      .F.....S..D.NVN.....I.V...KY.T.R.
h2A2 vHD      .F.....S..D.NVN.....I.V...KY.T.R.
CDR по Kabat      *****
CDR по IMGТ      ++++++++
          60      70      80      90      101     110
m2A2 vH      |.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....
hIGHV1-46/HJ4 AQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCAR---YFDYWGQGLTVTVSS
h2A2 vHA      N...K.KA.L.V.KPS..A..Q.N..T...S.....T.GLNAW.....AS.....
h2A2 vHB      N...K.....P.....T.GLNAW.....
h2A2 vHC      N...K..A.L.V.K...A.....T.GLNAW.....
h2A2 vHD      N...K..A.L.V.KP..A.....T.GLNAW.....
CDR по Kabat      *****
CDR по IMGТ      ++++++++
    
```

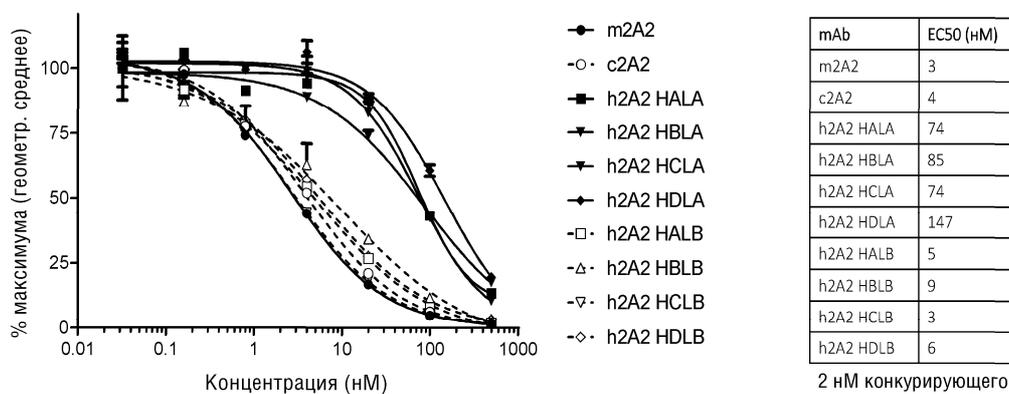
Фиг. 3

Выравнивание вариантов легкой цепи h2A2 с акцепторной последовательностью человека, IGKV1-33/KJ2

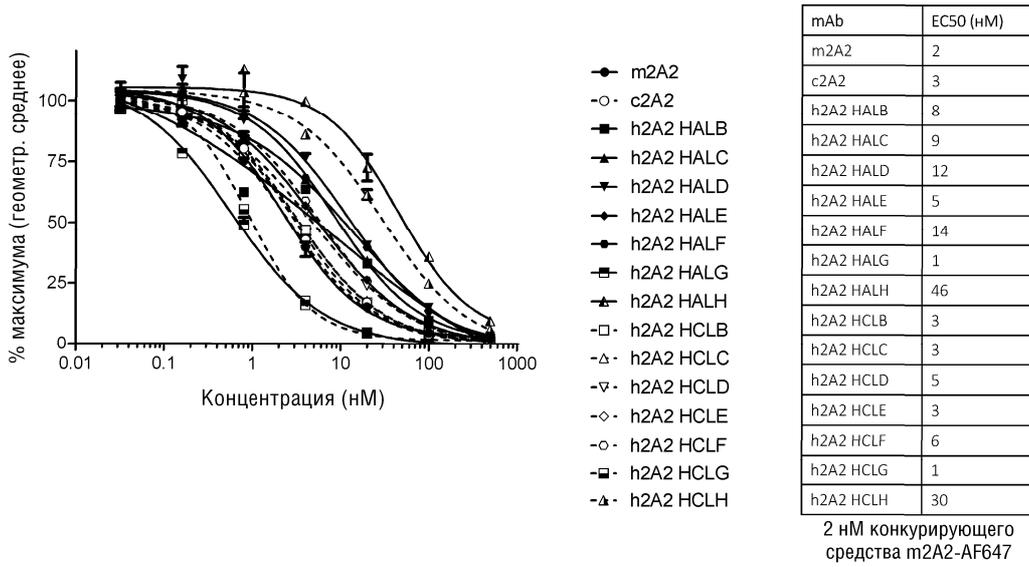
```

          10      20      30      40      50      60
m2A2 vL      .....A.....ET.....G..EN.YGA.....R.Q..S.Q...G.T..AD.MS.
hIGKV1D-33/KJ2 DIQMTQSPSSLASVGDRTITTCQASQDISNYLNWYQQKPKAPKLLIYDASNLETGVP
h2A2 vLA      .....G..EN.YGA.....G.T..AD...
h2A2 vLB      .....G..EN.YGA.....G.T..AD...
h2A2 vLC      .....G..EN.YGA.....G.T..A...
h2A2 vLD      .....G..EN.YGA.....G.T..AD...
h2A2 vLE      .....EN.YGA.....G.T..AD...
h2A2 vLF      .....EN.YGA.....G.T..A...
h2A2 vLG      .....G..EN.YGA.....G.T..D...
h2A2 vLH      .....G..EN.YGA.....G.T..AD...
CDR по Kabat      *****
CDR по IMGТ      ++++++++
          70      80      90      100
m2A2 vL      .....RQYS.K...H.D.V.....NVLTT.....G.....
hIGKV1D-33/KJ2 RFGSGSGTDFTFITISLQPEDIATYYCQQYDNLPLYTFGQGTKLEIK
h2A2 vLA      .....NVLTT.....
h2A2 vLB      .....R.Y.....NVLTT.....
h2A2 vLC      .....R.Y.....NVLTT.....
h2A2 vLD      .....Y.....NVLTT.....
h2A2 vLE      .....R.Y.....NVLTT.....
h2A2 vLF      .....Y.....NVLTT.....
h2A2 vLG      .....R.Y.....NVLTT.....
h2A2 vLH      .....R.....NVLTT.....
CDR по Kabat      *****
CDR по IMGТ      ++++++++
    
```

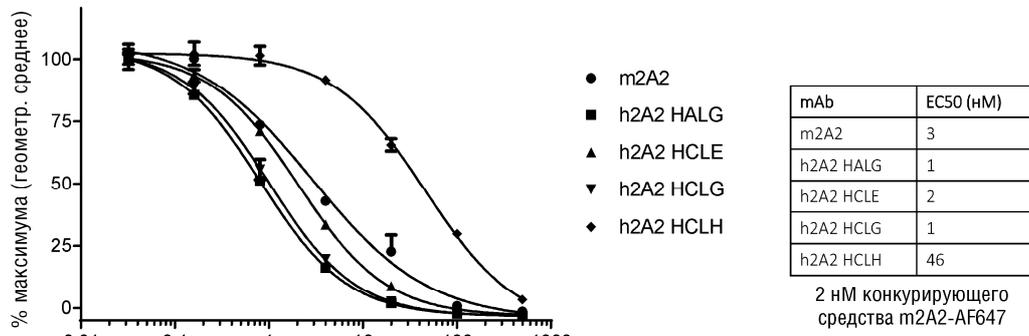
Фиг. 4



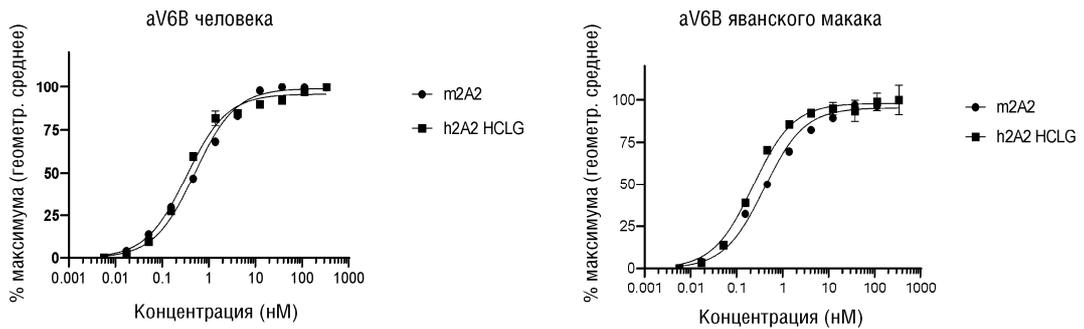
Фиг. 5



Фиг. 6

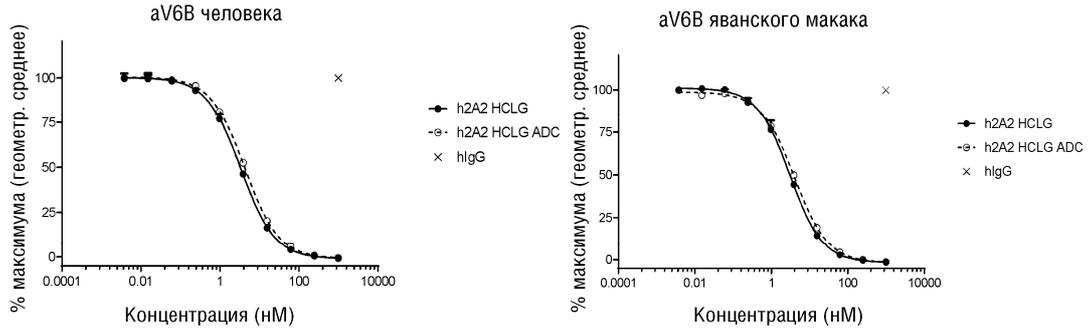


Фиг. 7



mAb	EC50 для aV6B человека (нМ)	EC50 для aV6B яванского макака (нМ)
m2A2-AF647	0.5	0.4
h2A2 HCLG-AF647	0.3	0.2

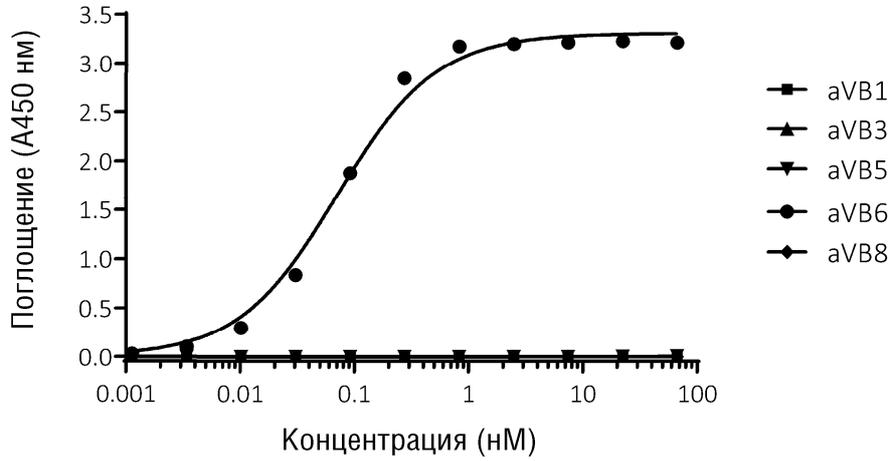
Фиг. 8



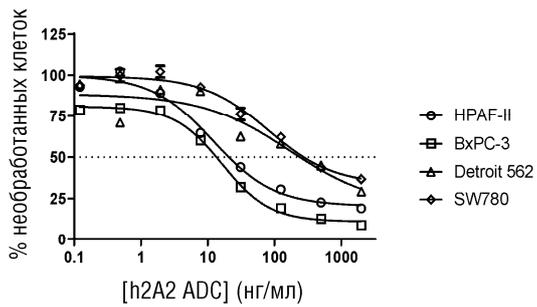
mAb	EC50 для aVB6 человека (нМ)	EC50 для aVB6 яванского макака (нМ)
h2A2 HCLG	3	3
h2A2 HCLG ADC	4	4

Фиг. 9

h2A2 HCLG



Фиг. 10

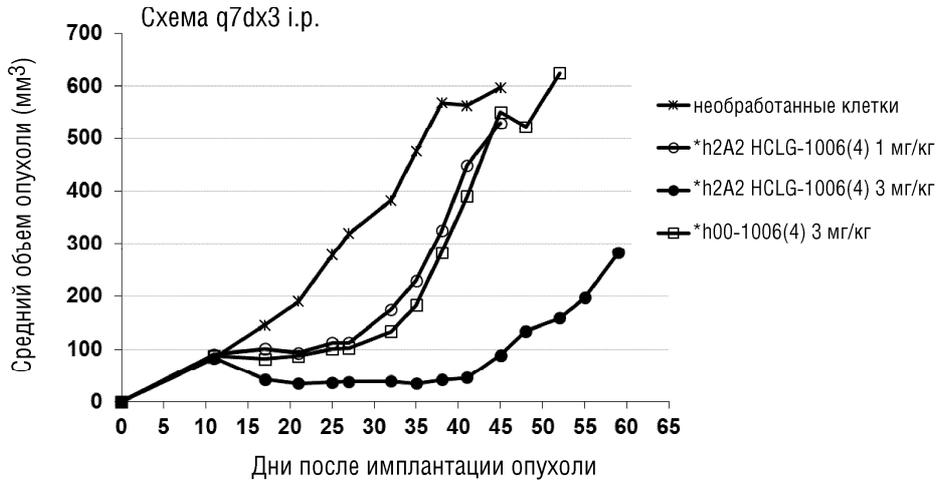


Линия клеток	Тип злокачественного новообразования	Количество копий по результатам QFACS
HPAFII	Рак поджелудочной железы	22K
VxPC-3	Рак поджелудочной железы	37K
Detroit 562	Рак головы и шеи	43K
SW780	Рак мочевого пузыря	80K

Фиг. 11

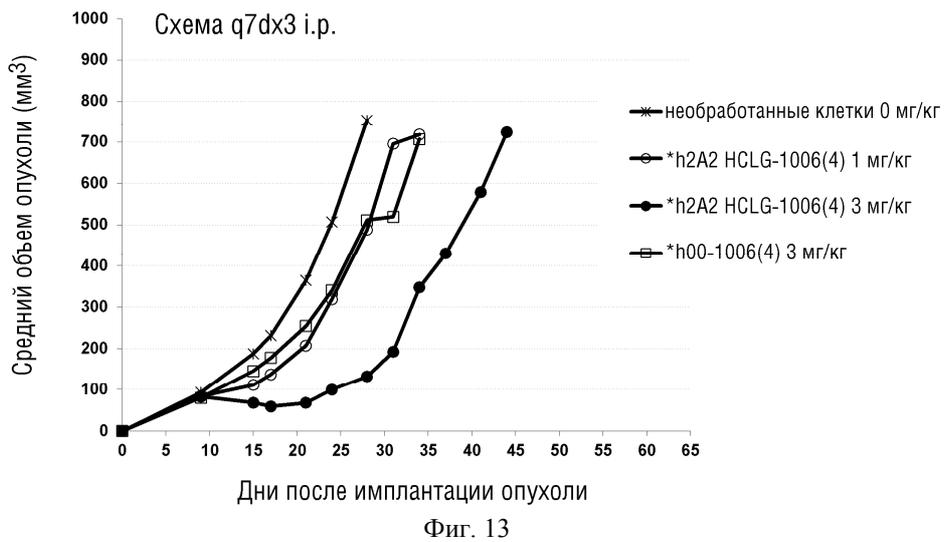
Модель Detroit 562

Оценка активности h2A2-1006(4) in vivo



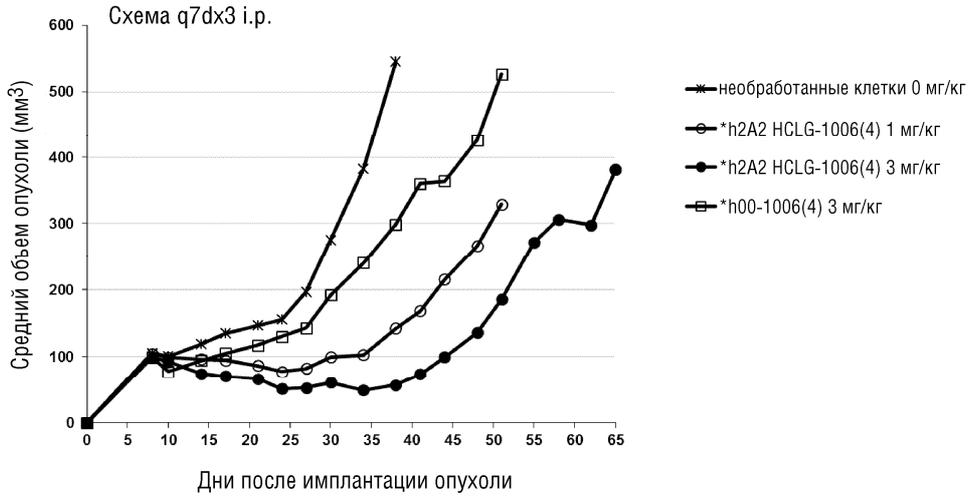
Модель HPAF-II

Оценка активности h2A2-1006(4) in vivo



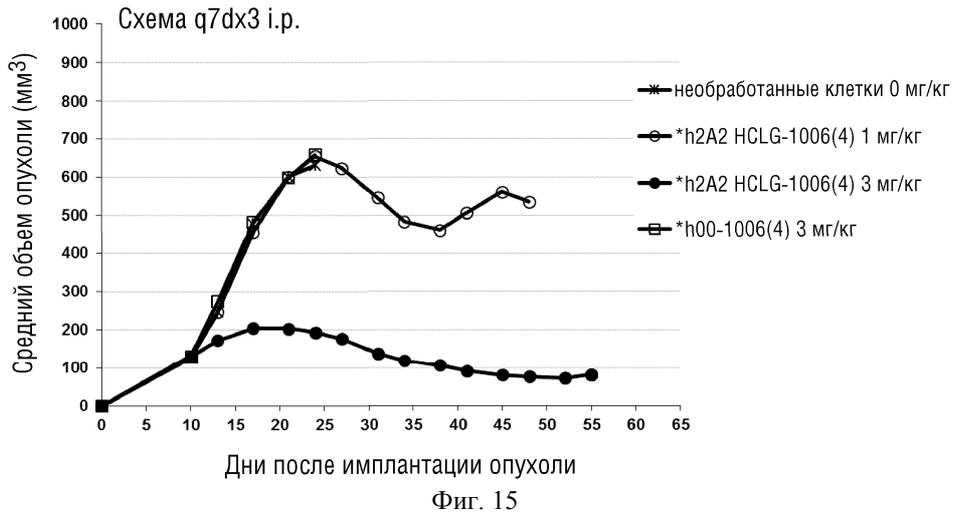
Модель ВхРС3

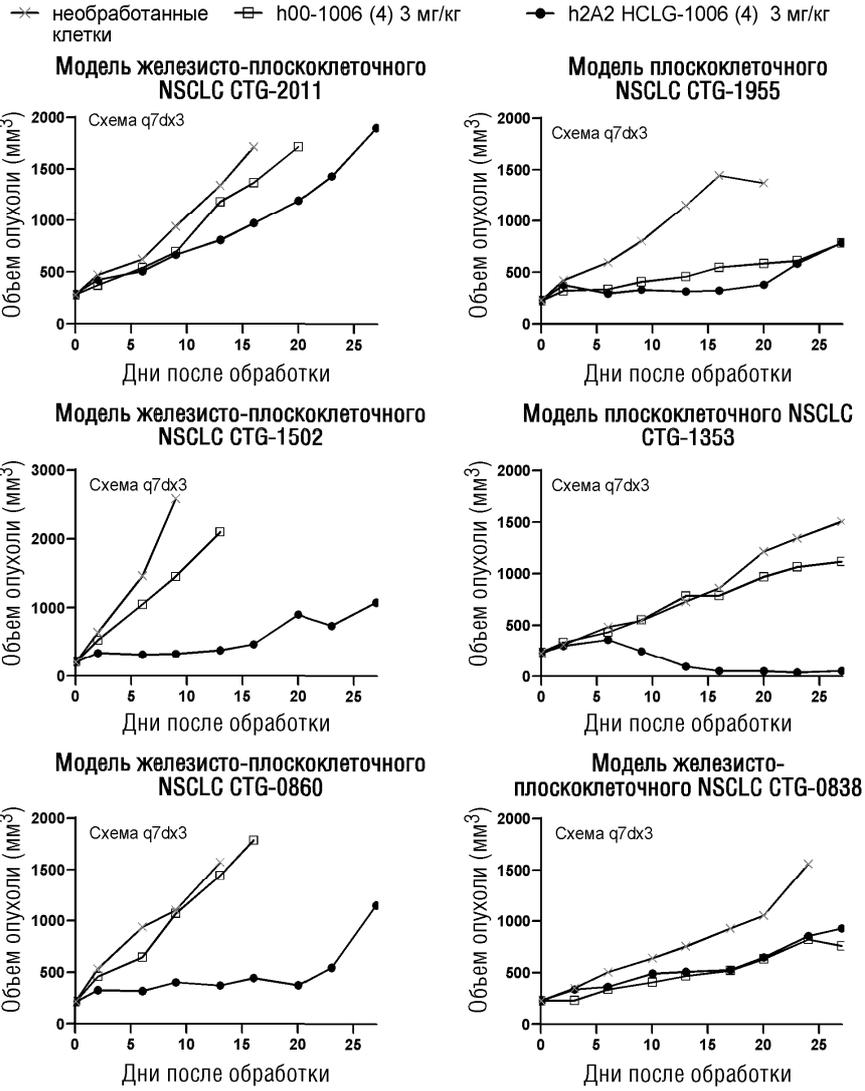
Оценка активности h2A2-vcMMAE in vivo



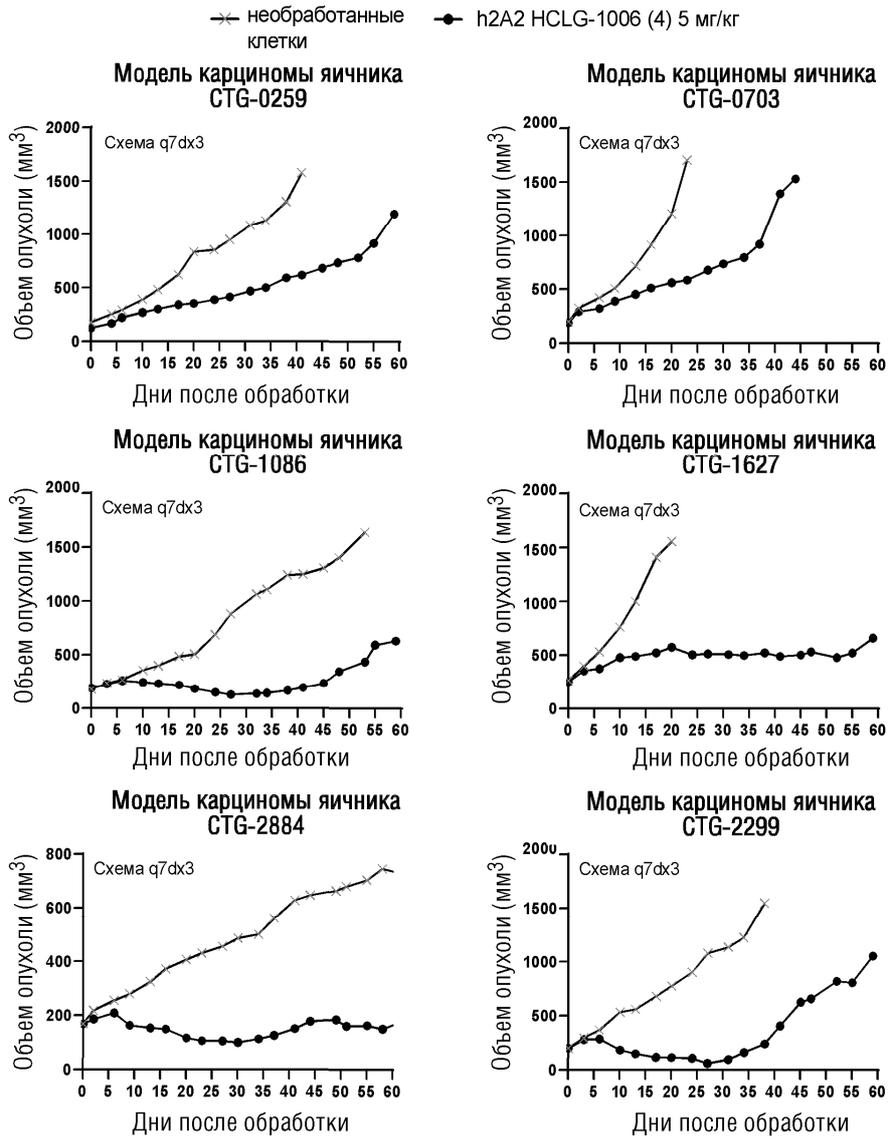
Модель SW780

Оценка активности h2A2-1006(4) in vivo

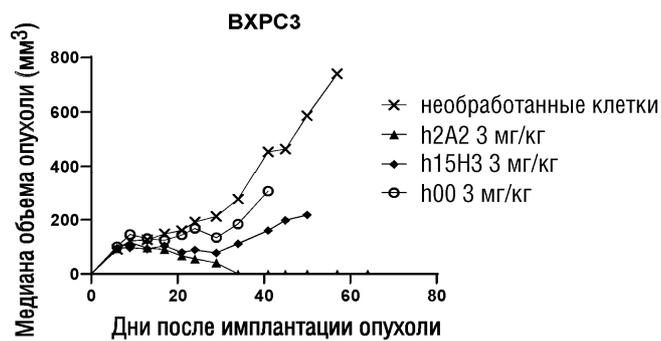
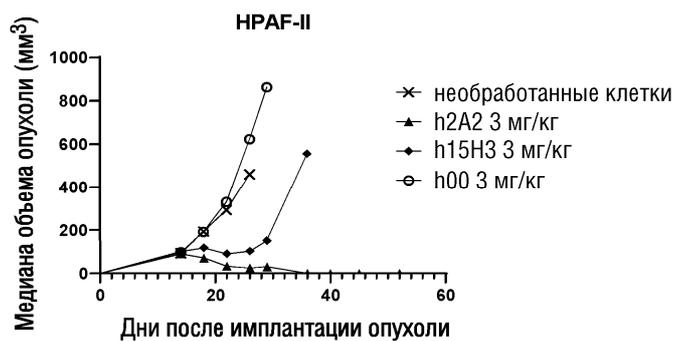




Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18