



**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента

**2024.11.15**

**(21)** Номер заявки

**202291165**

**(22)** Дата подачи заявки

**2020.11.04**

**(51)** Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)

**C07K 16/40** (2006.01)

**C07K 16/46** (2006.01)

**(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К СА IX И СПОСОБЫ ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

**(31)** PCT/IB2019/059492

**(32)** 2019.11.05

**(33)** IB

**(43)** 2022.08.15

**(86)** PCT/IB2020/060343

**(87)** WO 2021/090187 2021.05.14

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:

**МАБПРО А.С. (SK)**

**(72)** Изобретатель:

**Затовицова Мирьям, Пасторекова**

**Силвия, Такацова Мартина,**

**Бараттгова Моника, Пасторек Яромир**

**(SK)**

**(74)** Представитель:

**Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,**

**Галухина Д.В., Алексеев В.В. (RU)**

**(56)** M. ZATOVICOVA ET AL.: "Carbonic Anhydrase IX as an Anticancer Therapy Target: Preclinical Evaluation of Internalizing Monoclonal Antibody Directed to Catalytic Domain", CURRENT PHARMACEUTICAL DESIGN, vol. 16, no. 29, 1 October 2010 (2010-10-01), pages 3255-3263, XP055650435, NL, ISSN: 1381-6128, DOI: 10.2174/138161210793429832, cited in the application whole document, especially the Abstract, Figures 2, 8

WO-A2-03100029

ZATOVICOVA MET AL.: "Monoclonal antibodies generated in carbonic anhydrase IX-deficient mice recognize different domains of tumour-associated hypoxia-induced carbonic anhydrase IX", JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. AMSTERDAM, NL, vol. 282, no. 1-2, 1 November 2003 (2003-11-01), pages 117-134, XP004471807, ISSN: 0022-1759, DOI: 10.1016/J.JIM.2003.08.011, cited in the application, the whole document

DE-KUAN CHANG ET AL.: "Human anti-CAIX antibodies mediate immune cell inhibition of renal cell carcinoma in vitro and in a humanized mouse model in vivo", MOLECULAR CANCER, BIOMED CENTRAL, LONDON, GB, vol. 14, no. 119, 11 June 2015 (2015-06-11), pages 1-13, XP021224075, ISSN: 1476-4598, DOI: 10.1186/S12943-015-0384-3, whole document, especially the Abstract, Figures 3, 5

I BLEUMER ET AL.: "A phase II trial of chimeric monoclonal antibody G250 for advanced renal cell carcinoma patients", BRITISH JOURNAL OF CANCER, vol. 90, no. 5, 1 March 2004 (2004-03-01), pages 985-990, XP055712916, GB, ISSN: 0007-0920, DOI: 10.1038/sj.bjc.6601617, cited in the application, the whole document

SAMANTHA AMES ET AL.: "The proteoglycan-like domain of carbonic anhydrase IX mediates non-catalytic facilitation of lactate transport in cancer cells", ONCOTARGET, vol. 9, no. 46, 15 June 2018 (2018-06-15), pages 27940-27957, XP055767659, United States, ISSN: 1949-2553, DOI: 10.18632/oncotarget.25371, whole document, especially the Abstract; Figures 8-9

**(57)** Настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, специфически распознающему протеогликановый домен СА IX человека, и к терапевтическим и диагностическим способам применения этого антитела. В частности, указанные способы относятся к лечению или диагностике раковых заболеваний, выбранных из сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфоblastного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

### Область техники

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам, способным специфически связываться с карбоангидразой IX человека. Более конкретно, настоящее изобретение относится к антителам, направленным на протеогликановый домен СА IX (карбоангидраза IX), содержащим определяющие комплементарность области мышинного происхождения и гуманизированные тяжелые и легкие области.

#### Предшествующий уровень техники

СА IX представляет собой карбоангидразу, связанную с раком, идентифицированную Zavada, Pastorekova, Pastorek (патент США 5387676) с помощью моноклонального антитела M75, впервые описанную Pastorekova et al, *Virology*, 187:620e626, 1992. Это антитело использовалось при клонировании кДНК (комплементарная ДНК) и гена, кодирующего СА IX, при оценке экспрессии СА IX в опухолях и нормальных тканях, при изучении регуляции СА IX и в исследованиях связи СА IX с прогрессированием рака и резистентностью к терапии. Все эти исследования подтвердили допущение, сделанное в первоначальном патенте США 5387676, что СА IX может применяться диагностически и/или прогностически в качестве предракового/неопластического опухолевого маркера и терапевтически в качестве мишени, и показали, что моноклональное антитело M75 является ценным реагентом, специфичным для СА IX, пригодным для различных способов иммунодетекции и имунотаргетных подходов.

СА IX (альтернативное название: белок MN (мембранный антиген)) относится к семейству карбоангидраз металлоферментов цинка, которые катализируют обратимую гидратацию диоксида углерода в бикарбонатные ионы и протоны. Существует 15 изоформ СА (карбоангидразы) человека, три из которых неактивны, а активность остальных двенадцати изменяется от слабой до очень сильной. Большинство изоферментов преимущественно экспрессируются в дифференцированных клетках для выполнения специализированных физиологических ролей в различных тканях и органах (Pastorekova et al, *J Enzyme Inhib Med Chem* 19, 199-229, 2004). СА IX имеет уникальное положение из-за ее сильной связи с раком, связанного с гипоксией профиля экспрессии, рКа-оптимума в кислой области и дополнительного протеогликан-подобного домена (PG), исходящего из глобулярного каталитического домена фермента. Активный сайт фермента СА IX в каталитическом домене (СА) обращен во внеклеточное пространство и способствует регулированию pH через плазматическую мембрану. В настоящее время установлено, что СА IX взаимодействует с разнообразными агентами, осуществляющими выведение кислот, и импортерами бикарбонатов, включая натрий-зависимые транспортеры бикарбонатов NBCel и NBCnl и лактат- и протон-экспортирующие транспортеры монокарбоксилатов MCT1 и MCT4. Участие СА IX в регуляции pH имеет множество последствий, поддерживающих фенотип опухоли. СА IX также ведет себя как молекула адгезии, которая способствует сборке и созреванию контактов фокальной адгезии во время присоединения клеток и распространения на твердой подложке. С другой стороны, СА IX может дестабилизировать контакты межклеточной адгезии за счет отсоединения E-кадгерина от крепления цитоскелета посредством конкурентного связывания с бета-катенином. Накопленные экспериментальные данные подтверждают, что СА IX функционально участвует в различных аспектах развития рака, включая защиту выживаемости раковых клеток в условиях гипоксии и ацидоза, облегчение миграции/инвазии раковых клеток, вклад в метастатическую диссеминацию, хоуминг и рост метастатических поражений.

СА IX является одним из лучших ответчиков на низкую оксигенацию (в диапазоне от аноксии до умеренной гипоксии), главным образом, из-за ее регуляции транскрипции с помощью индуцируемого гипоксией фактора HIF-1, связывающегося с консенсусной последовательностью отвечающего на гипоксию элемента (HRE), локализованной вблизи сайта инициации транскрипции (Wykoff et al, *Cancer Res* 60, 7075-7083, 2000). Инактивация белка-супрессора опухоли pVHL (Гиппеля-Линдау), который вызывает деградацию HIF, приводит к повышению экспрессии СА IX в опухолях почек (Ivanov et al, *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 12596-12601, 1998). Кроме того, гипоксия регулирует сплайсинг мРНК (матричная РНК) СА IX и опосредованное протеинкиназой А (PKA) фосфорилирование цитоплазматического хвоста белка СА IX, в обоих случаях влияющее на его ферментативную активность (Barathova et al, *Br J Cancer* 98, 129-136, 2008; Ditte et al, *Cancer Res* 71, 7558-7567, 2011).

СА IX может интернализироваться с поверхности клетки в цитоплазму клетки посредством эндоцитоза, индуцированного гипоксией и истощением кальция, а также специфическими антителами, связывающимися с его внеклеточной частью (Zatovicova et al, *Curr Pharm Des* 16, 3255-3263, 2010). Эктодомен СА IX может расщепляться металлопротеиназой ADAM17 и высвобождаться в микроокружение в ответ на гипоксию, ацидоз и токсические поражения ингибиторами карбоангидразы или химиотерапевтическими препаратами (Zatovicova et al, *Br J Cancer* 93, 1267-1276, 2005; Vidlickova et al, *BMC Cancer* 16, 239, 2016).

Экспрессия СА IX в нераковых тканях встречается редко и обычно ограничивается эпителием желудка, желчного пузыря, поджелудочной железы и кишечника.

Существует более 1000 исследований клинической ценности СА IX, предполагающих, что он может служить биомаркером и/или терапевтической мишенью при различных типах опухолей и состояниях (Pastorek and Pastorekova, *Seminars in Cancer Biology* 31,52-64,2015).

СА IX экспрессируется в высоком проценте клеток в более 90% случаев светлоклеточного почечно-клеточного рака (скПКР), который несет инактивирующую мутацию/делецию гена супрессора опухоли VHL. Во многих других типах опухолей СА IX экспрессируется на региональном уровне в областях, ко-

торые являются гипоксическими и/или кислотными, и обычно увеличивается с повышением стадии и степени опухоли. Также СА IX может быть обнаружен в телесных жидкостях онкологических пациентов, что может быть использовано в клинических целях для неинвазивного скрининга или мониторинга онкологических пациентов.

Мета-анализ исследований, охватывающих более 24 тысяч пациентов с опухолями, отличными от ПКР (почечно-клеточного рака), выявил значительные связи между экспрессией СА IX, оцененной с помощью иммуногистохимии, и всеми конечными точками: общая выживаемость, выживаемость без признаков заболевания, местно-региональный контроль выживаемости, болезнь-специфическая выживаемость, выживаемость без метастазирования и выживаемость без прогрессирования заболевания (van Kuijk et al, *Front Oncol* 6, 69, 2016). Анализы подгрупп показали сходные связи в большинстве положений и типов опухолей. В заключение, эти результаты показывают, что пациенты, имеющие опухоли с высокой экспрессией СА IX, имеют более высокий риск прогрессирования заболевания и развития метастазов, независимо от типа опухоли или ее положения. Кроме того, существуют многочисленные исследования, демонстрирующие корреляцию между СА IX положительным статусом и устойчивостью к химиотерапии, лучевой терапии и даже иммунотерапиям, направленным на другие связанные с раком молекулярные мишени, такие как HER-2 (рецептор эпидермального фактора роста человека 2), VEGF (фактор роста эндотелия сосудов) и PD-1 (белок запрограммированной клеточной смерти 1). Эти результаты подтверждают пригодность клинических тестов, определяющих прогноз пациента и результат терапии на основании экспрессии СА IX, и предоставляют обоснование для разработки новых стратегий лечения, нацеленных на СА IX.

Стратегия нацеливания на СА IX, основанная на иммунотерапии, использует связанный с опухолью профиль экспрессии СА IX. В этом подходе используются моноклональные антитела (mAb) и, таким образом, обеспечивается высокая специфичность и селективность по отношению к СА IX, что в настоящее время не достижимо химическими соединениями. В случае антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) в качестве основного механизма действия, поражающее действие наступает быстро и не способствует развитию компенсаторных механизмов. Предыдущие клинические испытания с моноклональными антителами, специфическими к СА IX, не соответствовали первичной конечной точке из-за отсутствия стратификации пациентов (индуцирующая ответ ADCC GcG250, Willex) или из-за неприемлемой токсичности (конъюгат антитело-лекарственное средство MMAE-BAU79-4620, Bayer). Таким образом, предпочтительная стратегия иммунотерапии включает ADCC и стратификацию пациентов на основе уровня экспрессии СА IX.

Специфичность является важным фактором при принятии решений о том, может ли конкретное mAb успешно применяться при терапии рака. Это свойство достигается уникальным профилем экспрессии СА IX, связанного с опухолью, и, с другой стороны, только ограниченной экспрессии в нескольких нормальных тканях. Предыдущие клинические данные из исследований скПКР свидетельствуют о том, что иммунотерапия на основе антител, нацеленная на СА IX, безопасна и хорошо переносится (Chamie et al, *JAMA Oncology* 3:913-920, 2017). Кроме того, безопасность лечения связана с данными многочисленных исследований о том, что экспрессия СА IX тесно связана с фенотипом опухоли и ограничивается лишь несколькими нераковыми тканями, причем базальная мембрана не позволяет внутривенно вводимым антителам достигать эпителиальных клеток. Литературные данные по специфическому к СА IX химерному антителу сG250 (имеющему вариабельные области мышинового G250 и константные области, происходящие из IgG человека, также известного как RENCAREX® или GIRENTUXIMAB®) показали отсутствие III и IV степени, а также дозolimитирующей токсичности а, с другой стороны, превосходное накопление при ПКР и увеличение средней/общей выживаемости (Steffens et al, *J Clin Oncol* 15: 1529-1537, 1997; Davis et al, *Cancer Immunity* 7:14-23 2007; Bleumer et al, *Br J Cancer* 90: 985-990, 2004). Более того, комбинированная терапия сG250 с низкой дозой интерферона альфа была безопасной, хорошо переносилась и имела клинические преимущества для пациентов с прогрессирующим метастатическим ПКР (Siebels et al, *World J Urol* 29:121-126, 2011).

В WO2003/100029 раскрываются специфические к СА IX мышинные моноклональные антитела, полученные у мышей с дефицитом СА IX, с направленным нарушением гена Car9. Набор антител, продуцируемых специфическими клетками гибридомы, включает mAb VII/20 и mAb IV/18 (как описано в Zatovicova et al, *J Immunol Methods* 282, 117-134, 2003). mAb высокоселективны к СА IX и не вступают в перекрестные реакции с белками СА I, СА II и СА XII человека, которые экспрессируются в основном в нормальных дифференцированных тканях. Таким образом, ожидается, что оба моноклональных антитела будут обладать строго опухолеспецифическим действием.

Антитело VII/20 связывается с конформационным эпитопом в каталитическом (CA) домене СА IX, индуцирует интернализацию СА IX и демонстрирует мощный противоопухолевый эффект *in vivo* в мышинной модели с подкожными ксенотрансплантатами опухоли (Zatovicova et al, *Curr Pharm Des* 16, 3255-3263, 2010). Антитело IV/18 связывается с линейным эпитопом в протеогликан-подобном (PG) домене СА IX и не индуцирует интернализацию. Способность этих двух mAb различать антигенные области на двух отдельных внеклеточных доменах СА IX предоставляет возможность для эффективного нацеливания. Тот факт, что оба моноклональных антитела VII/20 и IV/18 были получены у мышей с дефицитом

СА IX, которые больше не доступны и поэтому не могут быть получены снова, только подчеркивает их уникальность. Все ранее упомянутые свойства моноклональных антител дают основание для их гуманизации с целью их применения в противораковой иммунотерапии.

В данной области техники существует потребность в безопасных и эффективных антителах, которые нацелены на СА IX, для лечения связанных с СА IX состояний, таких как рак. Настоящее изобретение удовлетворяет эту потребность и предлагает другие преимущества.

#### Сущность изобретения

В настоящем изобретении предложены гуманизированные антитела, специфически распознающие протеогликановый домен СА IX человека, которые проявляют специфическую и эффективную активность связывания, а также неожиданную активность в ингибировании инвазии раковых клеток и фагоцитарную активность. Более того, они безопасны и не вызывают нежелательных побочных эффектов.

В настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, специфически распознающее протеогликановый домен СА IX человека, содержащее:

а) последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

GFTFNTNAMH (SEQ ID NO. 1) и

RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 2) и

VCGSWFAY (SEQ ID NO. 3);

и

б) последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

KSSQSLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO. 4) и

FTSTRQS (SEQ ID NO. 5) и

QQHYSIPLT (SEQ ID NO. 6).

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело по настоящему изобретению содержит последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные последовательностям

GFTFNTNAMH

(SEQ ID NO. 1) и RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 2) и VCGSWFAY (SEQ ID NO.

3)

или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты, и последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую последовательности CDR, идентичные следующим последовательностям или отличающиеся от них на 1 или 2 аминокислоты:

KSSQSLNSSNQKNYLA (SEQ ID NO. 4) и FTSTRQS (SEQ ID NO. 5) и QQHYSIPLT (SEQ ID NO. 6).

В одном аспекте гуманизированное антитело, специфически распознающее СА IX человека, по настоящему изобретению содержит по меньшей мере одну вариабельную область, выбранную из группы, состоящей из

вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность:

X<sup>32</sup>VQLVESGGGX<sup>33</sup>VQPGX<sup>34</sup>SLX<sup>35</sup>LSCAASGFTFNTNAMHWVRQAX<sup>36</sup>GX<sup>37</sup>GLEWVX<sup>38</sup>RI  
RKSNNYTTYADSVKDRFTISRDX<sup>39</sup>SKX<sup>40</sup>TX<sup>41</sup>YLQX<sup>42</sup>NSLX<sup>43</sup>X<sup>44</sup>EDTAVYYCVCGSWF  
AYWGQGT<sup>45</sup>VTVSS (SEQ ID NO. 7),

где

X<sup>32</sup> представляет собой E или Q,

X<sup>33</sup> представляет собой L или V,

X<sup>34</sup> представляет собой G или R,

X<sup>35</sup> представляет собой K или R,

X<sup>36</sup> представляет собой S или P,

X<sup>37</sup> представляет собой K или R,

X<sup>38</sup> представляет собой A или G,

X<sup>39</sup> представляет собой D или N,

X<sup>40</sup> представляет собой N или S,

X<sup>41</sup> представляет собой A или L,

X<sup>42</sup> представляет собой M или V,

X<sup>43</sup> представляет собой K или R,

X<sup>44</sup> представляет собой T или A,

X<sup>45</sup> представляет собой L или T; и

вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательность

DX<sup>46</sup>X<sup>47</sup>MTQSPDSLAVSLGERX<sup>48</sup>TINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWX<sup>49</sup>QQKPGQX<sup>50</sup>PX<sup>51</sup>X<sup>52</sup>X

<sup>53</sup>IYFTSTRQSGVPDRFX<sup>54</sup>GSGSGTDFLTIX<sup>55</sup>SLQAEDVAVYX<sup>56</sup>CQQHYSIPLTFGQGTIX<sup>57</sup>X

<sup>58</sup>EIK (SEQ ID NO. 8),

X<sup>46</sup> представляет собой V или I,

X<sup>47</sup> представляет собой V или Q,

X<sup>48</sup> представляет собой V или A,

X<sup>49</sup> представляет собой Y или F,

X<sup>50</sup> представляет собой S или P,

X<sup>51</sup> представляет собой K или N,

X<sup>52</sup> представляет собой L или V,

X<sup>53</sup> представляет собой L или V,

X<sup>54</sup> представляет собой S или T,

X<sup>55</sup> представляет собой S или N,

X<sup>56</sup> представляет собой Y или F,

X<sup>57</sup> представляет собой K или Q,

X<sup>58</sup> представляет собой L или V.

В одном предпочтительном аспекте изобретения предложено гуманизованное антитело, специфически распознающее СА IX человека, содержащее по меньшей мере одну вариабельную область, выбранную из группы, состоящей из:

а) аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT

TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO. 9),

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT

TYYADSVKDRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO. 10),

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGRGLEWVARIRSKSNNYT

TYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO. 11),

EVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYT

TYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO. 12),

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT

TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLTVTVSS

(SEQ ID NO. 13);

и

б) аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLLNSSNOKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFTSTRO  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO.  
14),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNOKNYLAWFQQKPGQPPNLVIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK (SEQ ID NO.  
15),

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNOKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO. 16),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNOKNYLAWFQQKPGQPPKVLIIYFTSTRQS  
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 17)

и

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNOKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO. 18).

Предпочтительно гуманизированное антитело по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 11 и SEQ ID NO. 12, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15 и SEQ ID NO. 18.

Согласно особо предпочтительному варианту осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность варибельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 12, и аминокислотную последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 18.

Предпочтительно гуманизированное антитело по настоящему изобретению имеет константные области тяжелых цепей IgG человека аллотипа G1m17,1 и константные области легких цепей каппа человека аллотипа Km3.

В настоящем изобретении дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное антитело, как описано выше, которое специфически распознает СА IX человека, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

Также в настоящем изобретении охватывается гуманизированное антитело или фармацевтическая композиция, как описано выше, предназначенное для применения при лечении заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка СА IX. Такие заболевания и расстройства обычно включают клеточное пролиферативное заболевание или расстройство, такое как рак, выбранный из группы, состоящей из: сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

Предпочтительно в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело или фармацевтическая композиция, как описано выше, предназначенное для применения при лечении рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX.

При медицинском применении гуманизированных антител фармацевтических композиций может быть применено более одного гуманизированного антитела. Гуманизированные антитела или фармацевтические композиции, содержащие гуманизированные антитела, могут быть введены одновременно или последовательно. Предпочтительно их вводят последовательно.

В настоящем изобретении дополнительно предложен способ лечения заболевания или расстройства, связанного с экспрессией, активацией или функцией белка СА IX, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизированного антитела или фармацевтической композиции, как описано выше. Такие заболевания и расстройства обычно включают клеточные пролиферативные заболевания или расстройства, такие как рак, выбранный из группы, состоящей из: сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндо-

метрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

Предпочтительно в настоящем изобретении предложен способ лечения рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела или фармацевтической композиции, как описано выше.

Кроме того, в настоящем изобретении предложен способ снижения или ингибирования инвазивности опухоли у субъекта, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества гуманизованного антитела или фармацевтической композиции, как описано выше, тем самым снижая или ингибируя инвазивность опухоли у субъекта.

Соответствующая суточная или недельная доза гуманизованного антитела к СА IX для введения пациенту предпочтительно составляет 0,001-15 мг/кг массы тела.

Гуманизованное антитело к СА IX может вводиться по нескольким возможным схемам. Как правило, следующие схемы могут быть подходящими:

- i) многократные, идентичные или различные дозы гуманизованного антитела,
- ii) многократные возрастающие дозы гуманизованного антитела, или
- iii) введение дозы гуманизованного антитела один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель.

В некоторых вариантах осуществления введение гуманизованного антитела к СА IX или фармацевтической композиции, как описано выше, включает 1-10 циклов введения, причем каждый цикл включает 2-5 инфузий/доз с гуманизованным антителом каждые 1-4 недели с последующим перерывом в 1-8 недель между каждыми двумя циклами.

В настоящем изобретении дополнительно предложена диагностическая композиция, содержащая по меньшей мере одно гуманизованное антитело, как описано выше в настоящем документе, и по меньшей мере один носитель, разбавитель или эксципиент.

Подходящие диагностические анализы, в которых применяется антитело по настоящему изобретению, включают иммунологические анализы, такие как ИФА (ELISA-enzyme-linked immunosorbent assay - твердофазный иммуноферментный анализ), аффинная хроматография, иммуногистохимия и вестерн-блоттинг.

Таким образом, в настоящем изобретении предложен способ диагностики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца, происходящего из или полученного от указанного субъекта, с диагностической композицией, как описано в настоящем документе, при этом образование комплекса, превышающее заранее определенный порог, свидетельствует о наличии рака у указанного субъекта.

В диагностической композиции или в способе диагностики рака у субъекта гуманизованное антитело может быть соединено, связано или конъюгировано с парамагнитным, радиоактивным или флуоресцентным фрагментом, который может быть обнаружен при визуализации.

#### **Краткое описание графических материалов**

Фиг. 1. Влияние мышиногеного моноклонального антитела IV/18 на образование метастазов в легком. (А) Общая эффективность источника излучения отражает количество раковых клеток HT1080-RFP в мышинных легких из либо контрольной группы, либо группы, обработанной mAb IV/18. (В) Репрезентативные изображения *ex vivo* флуоресцентных метастазов в легких контрольных мышей и мышей, получивших mAb IV/18.

Фиг. 2. Реакционная способность вариантов СА9hu-2 с либо СА IX-положительным (C-33a\_CA IX), либо СА IX-отрицательным (C-33a\_neo) антигеном, определенная с помощью ИФА. Образцы, содержащие только разбавитель антитела, обозначены как "без Ab". В качестве эталонных образцов применяли родительское IV/18 (А) (обозначенное как "Ab мыши"), а также химерное HC0LC0 (имеющие мышинные переменные домены и константные домены Ig человека) антитела. Данные на графике выражены в виде кратности изменения и рассчитаны как соотношение между значениями оптической плотности (O.D.) поглощения, измеренными при 492 нм, от СА IX-положительного антигена и значениями O. D. поглощения, измеренными при 492 нм, от СА IX-отрицательного антигена.

Фиг. 3. Скрининг гуманизованных вариантов СА9hu-2 на антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность с применением либо СА IX-положительных (C-33a\_CA IX), либо СА IX-отрицательных (C-33a\_neo) клеток. В качестве эталонных образцов применяли химерные антитела HC0LC0 (имеющие мышинные переменные домены и константные домены Ig человека). Данные на графике выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение.

Фиг. 4. 3D (трехмерная) модель сфероидов BT-20, культивируемых с МКПК (моноклеарные клетки периферической крови) человека, в присутствии гуманизованного варианта антитела СА9hu-2\_HC4LC5. Проекция клеток МКПК в сфероидах BT-20 (и клетки МКПК, и сфероиды предварительно

окрашены с помощью красителя CellBrite™) из срезов по оси Z после 3 дней обработки, полученная по всему объему сфероидов (верхняя часть фигуры). Иммуногистохимический анализ влияния гуманизованного варианта антитела CA9hu-2\_HC4LC5 на морфологию сфероидов. Типичные срезы сфероидов BT-20 совместно культивировали с МКПК и обрабатывали гуманизированным вариантом антитела в течение 11 дней. В мембранах через сфероиды BT-20 наблюдалась характерная картина окрашивания CA IX (нижняя часть фигуры).

Фиг. 5. Способность к инвазии клеток C-33a\_CA IX, предварительно инкубированных в условиях гипоксии в присутствии гуманизованного варианта антитела CA9hu-2\_HC4LC5, оценивали с помощью измерения в реальном времени на приборе xCELLigence device. Клетки, посеянные в верхнюю камеру, покрытую матригелем, стимулировали к инвазии в отношении хемоаттрактанта в нижней камере. Данные на графике показывают зависимость клеточного индекса от времени, выраженную как значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение.

Фиг. 6. Анализ многоклеточной агрегации C-33a\_CA IX с гуманизированным антителом CA9hu-2\_HC4LC5 через 24 ч и 72 ч на чашках, покрытых полигидроксиэтилметакрилатом (ПГЭМА). Клетки C-33a\_CA IX, инкубированные в отсутствие гуманизованных антител, обозначены как "отрицательный контроль".

Фиг. 7. Анализ клеток C-33a\_CA IX с помощью окрашивания йодидом пропидия и проточной цитометрии после 72 ч обработки гуманизированным антителом CA9hu-2\_HC4LC5. Клетки C-33a\_CA IX, инкубированные в отсутствие гуманизованных антител, обозначены как "отрицательный контроль".

#### **Подробное описание изобретения**

Сокращения.

В подробном описании и примерах изобретения будут использоваться следующие сокращения:

|       |   |
|-------|---|
| 3D    | трёхмерный  |
| ADCC  | антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность |
| ADCP  | антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз       |
| скПКР | светлоклеточный почечно-клеточный рак                     |

|                |  |
|----------------|--|
| CA IX          | карбоангидраза IX  |
| CDC            | комплемент-зависимая цитотоксичность                     |
| CDR            | определяющие комплементарность области                   |
| CRA            | анализы высвобождения цитокинов                          |
| DOX            | доксорубицин   |
| ИФА            | твёрдофазный иммуноферментный анализ                     |
| FCS            | фетальная телячья сыворотка                              |
| FR             | каркасная область  |
| HER-2          | рецептор эпидермального фактора роста человека 2-го типа |
| HIF-1          | фактор, индуцируемый гипоксией 1                         |
| HRE            | отвечающий на гипоксию элемент                           |
| HVR            | гипервариабельная область                                |
| IFN $\gamma$   | интерферон $\gamma$                                      |
| IL             | интерлейкин  |
| IMGT           | информационная система по иммуногенетике                 |
| MNH            | международные непатентованные наименования               |
| кДа            | килодальтон  |
| K <sub>D</sub> | константа диссоциации                                    |
| mAb            | моноклональное антитело                                  |
| M              | молярный   |
| MCT            | транспортер монокарбоксилата                             |
| ГКГС           | главный комплекс гистосовместимости                      |
| NFAT           | ядерный фактор активированных Т-клеток                   |
| МКПК           | моноклеарные клетки периферической крови                 |
| PBS            | фосфатно-солевой буфер                                   |
| ПЦР            | полимеразная цепная реакция                              |
| PD-1           | белок программируемой клеточной смерти 1                 |
| PD-L1          | лиганд программируемой клеточной смерти 1                |
| PG             | протеогликан-подобная область                            |
| PKA            | протеинкиназа А  |
| PPA            | анализа протеом Proteome Profiler Array                  |
| RFP            | красный флуоресцентный белок                             |
| SEB            | стафилококковый энтеротоксин В                           |
| ТНPMЖ          | трижды негативный рак молочной железы                    |

|                |  |
|----------------|--|
| TNF $\alpha$   | фактор некроза опухоли $\alpha$                  |
| V <sub>H</sub> | варибельная область тяжелой цепи иммуноглобулина |
| V <sub>L</sub> | варибельная область легкой цепи иммуноглобулина  |
| VEGF           | фактор роста эндотелия сосудов                   |
| VHL            | фон Гиппель-Ландау                               |
| ВОЗ            | Всемирная Организация Здравоохранения            |

## Клеточные линии:

|         |  |
|---------|--|
| 8-MG-BA | раковые клетки глиобластомы человека (Cellosaurus CVCL_1052) |
| BT-20   | раковые клетки молочной железы человека (ATCC HTB-19)        |
| C-33a   | раковые клетки шейки матки человека (ATCC HTB-31)            |
| HT1080  | раковые клетки фибросаркомы человека (ATCC CCL-121)          |

## Определения.

Для лучшего понимания изобретения, ниже приведены конкретные определения некоторых технических и научных терминов. Если в настоящем документе не указано иное, все технические и научные термины, использованные в настоящем документе, имеют значения, обычно понятные специалисту в данной области техники, к которой относится настоящее изобретение.

Термин "CA IX" применяется для обозначения белкового продукта гена CA9 (например, NP\_001207.2).

Термины "анти-CA IX антитело", "антитело, которое распознает CA IX", "антитело против CA IX" и "антитело к CA IX" взаимозаменяемы и используются в контексте настоящего документа для обозначения антитела, которое связывается с белком CA IX (так, что антитело пригодно для применения в качестве диагностического и/или терапевтического агента при нацеливании на CA IX).

Термин "домен PG" применяется для обозначения домена, гомологичного протеогликанам, который локализован в N-концевой части белка CA IX.

Термин "антиген" в контексте настоящего документа относится к молекуле или фрагменту молекулы, способной вызывать образование антитела и быть связанной антителом. Антиген может иметь один или более одного эпитопа. Специфическая реакция призвана указывать, что антиген будет высокоселективно реагировать с соответствующим антителом, а не с множеством других антител, которые могут быть вызваны другими антигенами. Антиген по настоящему изобретению представляет собой белок CA IX или его фрагмент.

Термин "антигенная детерминанта" или "эпитоп" в контексте настоящего документа относится к области молекулы антигена, которая специфически реагирует с конкретным антителом. Пептидные последовательности, происходящие из эпитопа, могут применяться отдельно или в сочетании с фрагментом носителем, применяя способы, известные в данной области техники, для иммунизации животных и получения дополнительных или моноклональных антител. Выделенные пептиды, происходящие из эпитопа, могут применяться в диагностических способах для обнаружения антител и в качестве терапевтических агентов, когда требуется ингибирование указанных антител.

Термин "антитело" или "иммуноглобулин" в контексте настоящего документа относится к композиции из двух тяжелых цепей, соединенных между собой дисульфидными связями, и двух легких цепей, каждая из которых соединена с соответствующей тяжелой цепью дисульфидными связями в форме "Y". Протеолитическое расщепление антитела дает Fv (варибельный фрагмент) и Fc (кристаллический фрагмент) домены. Антигенсвязывающие домены, Fab, включают области, в которых изменяется полипептидная последовательность. Термин F(ab')<sub>2</sub> представляет собой два плеча Fab', соединенных между собой дисульфидными связями. Центральная ось антитела называется Fc-фрагментом. Каждая тяжелая цепь имеет на одном конце варибельный домен (V<sub>H</sub>), за которым следует ряд константных доменов (C<sub>H</sub>). Каждая легкая цепь имеет на одном конце варибельный домен (V<sub>L</sub>) и на другом ее конце константный домен (C<sub>L</sub>), при этом варибельный домен легкой цепи выровнен с варибельным доменом тяжелой цепи, а константный домен легкой цепи выровнен с первым константным доменом тяжелой цепи. Варибельные домены каждой пары легких и тяжелых цепей образуют антигенсвязывающий сайт. Домены легкой и тяжелой цепей имеют одинаковую общую структуру, и каждый домен содержит четыре каркасные области, последовательности которых относительно консервативны, к которым присоединяются три гиперварибельных домена, известных как определяющие комплементарность области (CDR 1-3). Эти домены способствуют специфичности и аффинности антигенсвязывающего сайта. Изотип тяжелой цепи (гамма, альфа, дельта, эpsilon или мю) определяет класс иммуноглобулина (IgG, IgA, IgD, IgE или IgM, соответственно). Легкая цепь представляет собой один из двух изотипов (каппа,  $\kappa$ , или лямбда,  $\lambda$ ), встречающихся во всех классах антител.

"Выделенное" антитело представляет собой антитело, которое было отделено от компонента его природного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищается до более 95% или 99% чистоты, определяемой, например, с помощью электрофореза или хроматографии.

Термин "моноклональное антитело" в контексте настоящего документа относится к антителу, полученному из популяции по существу однородных антител, т.е. отдельные антитела в составе популяции являются идентичными, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в небольших количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, поскольку они направлены против единственного антигена. Кроме того, в отличие от препаратов поликлональных антител, которые обычно содержат разные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против единственной детерминанты антигена.

Термин "химерное антитело" в контексте настоящего документа относится к антителу, в котором фрагмент тяжелой и/или легкой цепи происходит из конкретного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи происходит из другого источника.

Термин "гуманизированное антитело" в контексте настоящего документа относится к антителу, содержащему аминокислотные остатки нечеловеческих HVR и аминокислотные остатки человеческих FR. В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело будет содержать по существу все по меньшей мере один, а обычно два вариабельных домена, в которых все или практически все HVR (например, CDR) соответствуют таковым участкам нечеловеческого антитела, и все или практически все FR соответствуют таковым антитела человека. Гуманизированное антитело необязательно может содержать по меньшей мере фрагмент константной области антитела, происходящий из антитела человека. "Гуманизированная форма" антитела, например, нечеловеческого антитела, относится к антителу, которое подверглось гуманизации.

Термин "акцепторный каркас человека" для целей настоящего документа относится к каркасу, содержащему аминокислотную последовательность каркаса вариабельного домена тяжелой цепи ( $V_H$ ) или каркасу вариабельного домена легкой цепи ( $V_L$ ), происходящему из каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, как определено ниже. Акцепторный каркас человека, "происходящий из" каркаса иммуноглобулина человека или консенсусного каркаса человека, может содержать совпадающую с ними аминокислотную последовательность или может содержать изменения в аминокислотной последовательности. В некоторых вариантах осуществления количество аминокислотных изменений составляет 10 или менее, 9 или менее, 8 или менее, 7 или менее, 6 или менее, 5 или менее, 4 или менее, 3 или менее или 2 или менее. В некоторых вариантах осуществления последовательность акцепторного каркаса  $V_L$  человека идентична последовательности каркаса иммуноглобулина  $V_L$  человека или последовательности консенсусного каркаса человека.

Термин "гипервариабельная область" или "HVR" в контексте настоящего документа относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, которая является гипервариабельной по последовательности и/или образует структурно определенные петли ("гипервариабельные петли"). Как правило, нативные четырехцепочечные антитела содержат шесть HVR, три в  $V_H$  и три в  $V_L$ . HVR обычно содержат аминокислотные остатки гипервариабельных петель и/или "областей, определяющих комплементарность" (CDR), причем последние характеризуются самой высокой вариабельностью последовательности и/или участвуют в распознавании антигена.

В контексте настоящего документа термин "аффинность" относится к силе суммарных нековалентных взаимодействий между единственным сайтом связывания молекулы (например, антитела) и ее партнером по связыванию (например, антигеном). Если не указано иное, в контексте настоящего документа "аффинность связывания" относится к собственной аффинности связывания, которая отражает взаимодействие 1:1 между членами пары связывания (например, антителом и антигеном). Аффинность молекулы X к ее партнеру Y в целом может быть выражена константой диссоциации ( $K_D$ ). Аффинность может быть измерена обычными способами, известными в данной области техники, включая те, что описаны в настоящем документе.

Термин "эффекторная функция" в контексте настоящего документа относится к тем биологическим действиям, относящимся к Fc-области антитела, которые изменяются с классом антитела. Примеры эффекторных функций антитела включают: комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC) и антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC).

В контексте настоящего документа термин "Fc-область" относится к C-концевой области тяжелой цепи иммуноглобулина, которая содержит по меньшей мере фрагмент константной области.

В контексте настоящего документа термин "эффективное количество" агента, например фармацевтического состава, относится к количеству, эффективному в дозах и в течение периодов времени, необходимых для достижения желаемого терапевтического или профилактического результата.

В контексте настоящего документа термин "фармацевтический состав" относится к препарату, который находится в такой форме, чтобы обеспечить эффективную биологическую активность активного ингредиента, содержащегося в нем, и не содержит дополнительных компонентов, которые неприемлемо токсичны для субъекта, которому должен вводиться состав.

В контексте настоящего документа термин "лечение" относится к клиническому вмешательству в

попытке изменить естественное течение состояния индивидуума, подлежащего лечению, и может осуществляться либо для профилактики, либо в течение клинической патологии. Желательные эффекты лечения включают, но не ограничиваются ими, предотвращение возникновения или возобновления заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, предотвращение метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение болезненного состояния, а также ремиссию или улучшение прогноза. В некоторых вариантах осуществления антитела по изобретению применяют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания.

В контексте настоящего документа термин "субъект" или "индивидуум" относится к млекопитающему. Млекопитающие включают, но не ограничиваются ими, одомашненных животных (например, коровы, овцы, кошки, собаки и лошади), приматов (например, люди и нечеловекообразные приматы, например, обезьяны), кроликов и грызунов (например, мыши и крысы). В некоторых вариантах осуществления субъект или индивидуум представляет собой человека.

В контексте настоящего документа термин "рак" и "раковый" относится к или описывает физиологическое состояние млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. Примеры рака включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз. Более конкретные примеры таких раковых заболеваний включают сквамозно-клеточную карциному, милому, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, глиому, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, острый миелоидный лейкоз, множественную миелому, рак желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточный рак, рак яичников, рак печени, лимфобластный лейкоз, лимфоцитарный лейкоз, колоректальный рак, рак эндометрия, рак почки, рак предстательной железы, рак щитовидной железы, меланому, хондросаркому, нейробластому, рак поджелудочной железы, мультиформную глиобластому, рак шейки матки, рак головного мозга, рак желудка, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, мезотелиому и рак головы и шеи. Особенно предпочтительные раковые заболевания, которые можно лечить по настоящему изобретению, включают те заболевания, которые характеризуются повышенной экспрессией СА IX в тестируемых образцах тканей.

В контексте настоящего документа термин "противоопухолевая композиция" относится к композиции, пригодной для лечения рака, содержащей по меньшей мере один активный терапевтический агент, способный ингибировать или предотвращать рост или функцию опухоли и/или вызывать уничтожение опухолевых клеток. Терапевтические агенты, подходящие для противоопухолевой композиции для лечения рака, включают, но не ограничиваются ими, химиотерапевтические агенты, радиоактивные изотопы, токсины, цитокины, такие как интерфероны, и антагонистические агенты, нацеленные на цитокины, цитокиновые рецепторы или антигены, связанные с опухолевыми клетками.

В контексте настоящего документа термин "диагностика" относится к определению наличия или отсутствия патологии, классификации патологии или симптома, определению тяжести патологии, мониторингу прогрессирования патологии, прогнозированию исхода патологии и/или перспектив выздоровления.

Применение терминов, относящихся к единственному числу, и подобных ссылок в контексте описания изобретения (особенно в контексте последующей формулы изобретения) должно толковаться как охватывающее и единственное, и множественное число, если в данном документе не указано иное, или если это явно противоречит контексту. Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "состоящий" следует толковать как неограничивающие термины (т.е. означающие "включая, но не ограничиваясь перечисленным"), если не указано иное. Перечисление диапазонов значений в настоящем документе предназначено исключительно для применения в качестве сокращенного способа ссылки по отдельности на каждое отдельное значение, входящее в диапазон, если не указано иное, и каждое отдельное значение включено в описание, как если бы оно было отдельно указано в данном документе.

Все описанные в настоящем документе способы могут быть осуществлены в любом подходящем порядке, если в настоящем документе не указано иное, или это явно не противоречит контексту. Использование любых и всех примеров или иллюстративной формы (например, "такой как") в настоящем документе предназначено исключительно для лучшего разъяснения изобретения и не накладывает ограничений на объем изобретения, если не заявлено иное. Никакую формулировку в описании не следует понимать как указывающую на какой-либо отсутствующий в формуле изобретения элемент, как на элемент, существенный для применения изобретения.

#### Фармацевтические составы

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению содержит носитель антитела, желателно фармацевтически приемлемый носитель. Фармацевтически приемлемый носитель может представлять собой любой подходящий фармацевтически приемлемый носитель. В контексте настоящего документа термин "фармацевтически приемлемый носитель" означает один или более совместимых твердых или жидких наполнителей, разбавителей, других эксципиентов или инкапсулирующих веществ, которые подходят для введения человеку или пациенту-животному (например, физиологически приемлемый носитель или фармакологически приемлемый носитель). Термин "носитель" обозначает органический или неорганический ингредиент, природный или синтетический, с которым комбинируется активный ингредиент для облегчения применения. Фармацевтически приемлемый носитель может совместно

смешиваться с одним или более активными компонентами, например гибридной молекулой, и друг с другом, когда в композиции присутствует более одного фармацевтически приемлемого носителя, таким образом, чтобы существенно не ухудшить желательную фармацевтическую эффективность. "Фармацевтически приемлемые" материалы, как правило, могут быть введены пациенту без возникновения значительных нежелательных физиологических эффектов, таких как тошнота, головокружение, сыпь или расстройство желудка. Например, желательно, чтобы композиция, содержащая фармацевтически приемлемый носитель, не была иммуногенной при введении пациенту-человеку в терапевтических целях.

Фармацевтическая композиция может содержать подходящие буферные агенты, например уксусную кислоту или ее соль, лимонную кислоту или ее соль, борную кислоту или ее соль и фосфорную кислоту или ее соль. Фармацевтические композиции также необязательно могут содержать подходящие консерванты, такие как хлорид бензалкония, хлорбутанол, парабены и тимеросал.

В настоящем документе состав также может содержать более одного активного соединения, необходимого для лечения конкретного показания, предпочтительно соединения с взаимодополняющими действиями, которые не оказывают негативного влияния друг на друга. Такие молекулы соответственно присутствуют в комбинации в количествах, которые эффективны для предусмотренной цели.

Композиция, подходящая для парентерального введения, для удобства включает стерильный водный препарат композиции по изобретению, который предпочтительно изотоничен крови реципиента. Этот водный препарат может быть составлен в соответствии с известными способами, в которых применяют подходящие диспергирующие или смачивающие агенты и суспендирующие агенты. Стерильный инъекционный препарат также может представлять собой стерильный инъекционный раствор или суспензию в нетоксичном парентерально приемлемом разбавителе или растворителе, например, в виде раствора в 1,3-бутандиоле. В числе приемлемых носителей и растворителей, подходящих для применения, находятся вода, раствор Рингера и изотонический раствор хлорида натрия. Кроме того, обычно в качестве растворителя или суспендирующей среды применяют стерильные нелетучие масла. Для этой цели можно применять любое мягкое нелетучее масло, такое как синтетические моно- или диглицериды. Кроме того, для приготовления инъекций могут применяться жирные кислоты, такие как олеиновая кислота. Составы носителей, подходящие для перорального, подкожного, внутривенного, внутримышечного и т. д. введений, могут быть найдены в Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA, 22nd edition, 2013.

Составы для введения *in vivo* должны быть стерильными. Стерильности легко достичь путем фильтрации через мембраны для стерильной фильтрации.

#### Диагностические применения антител к СА IX

В настоящем изобретении предложена диагностическая композиция, содержащая по меньшей мере одно гуманизованное антитело, которое специфически распознает СА IX человека, как описано выше.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен способ диагностики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца, происходящего из или полученного у указанного субъекта, с диагностической композицией, описанной выше, при этом образование комплекса, превышающее заранее определенный порог, свидетельствует о наличии рака у указанного субъекта.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен способ определения экспрессии СА IX, включающий приведение в контакт биологического образца с его антителами, описанными выше, и измерение уровня образования иммунного комплекса.

В другом аспекте настоящего изобретения дополнительно предложен способ диагностики заболевания или расстройства, связанного с экспрессией белка СА IX, включающий стадии инкубирования биологического образца с гуманизованным антителом, как описано выше, детектирования связанного белка СА IX с помощью детектируемого зонда, сравнения количества связанного белка СА IX со стандартной кривой, полученной из эталонных образцов, вычисления количества белка СА IX в биологическом образце по стандартной кривой и необязательно назначения пациенту соответствующего лечения.

В аспекте настоящего изобретения дополнительно предложено применение гуманизованных антител, как описано выше, для получения диагностической композиции для диагностики связанного с раком заболевания или расстройства.

В аспекте настоящего изобретения дополнительно предложена конъюгация антител по настоящему изобретению с синтетической молекулой. Синтетическая молекула может быть меткой. Метки могут быть пригодны для диагностических применений и могут включать, например, контрастные вещества. Контрастное вещество может представлять собой радиоизотопную метку, такую как йод ( $^{131}\text{I}$  или  $^{125}\text{I}$ ), индий ( $^{111}\text{In}$ ), технеций ( $^{99}\text{Tc}$ ), фосфор ( $^{32}\text{P}$ ), углерод ( $^{14}\text{C}$ ), тритий ( $^3\text{H}$ ), другой радиоизотоп (например, радиоактивный ион) или терапевтический радиоизотоп, указанный выше. Кроме того, контрастные вещества могут включать рентгеноконтрастные материалы, агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ) и агенты для ультразвуковой томографии, а также любые другие контрастные вещества, подходящие для обнаружения устройством, которое получает изображение тела. Синтетическая молекула также может представлять собой флуоресцентную метку, биологически активную ферментную метку, люминесцентную метку или хромофорную метку.

### Терапевтические применения антител к СА IX

Любое из антител к СА IX, предложенных в настоящем документе, может быть применено в терапевтических способах.

В одном аспекте предложено антитело к СА IX для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах осуществления предложено антитело к СА IX для применения в способе лечения.

В дополнительном аспекте изобретения предложено применение антитела к СА IX при производстве или получении лекарственного средства.

В дополнительном аспекте изобретения предложен фармацевтический состав, содержащий любое из антител к СА IX, предложенных в настоящем документе. В одном варианте осуществления фармацевтический состав содержит любое из антител к СА IX, предложенных в настоящем документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

Антитела по изобретению могут применяться при терапии либо по отдельности, либо в комбинации с другими агентами. Например, антитело по изобретению может быть введено совместно с по меньшей мере одним дополнительным терапевтическим агентом.

Такие вышеуказанные комбинированные терапии включают совместное введение (где два или более терапевтических агентов содержатся в одном и том же или отдельных составах) и раздельное введение, и в этом случае введение антитела по изобретению может происходить до, одновременно и/или после введения дополнительного терапевтического агента и/или адьюванта. Антитела по изобретению также можно применять в комбинации с лучевой терапией.

В изобретении также предложен способ лечения субъекта, имеющего расстройство, связанное с повышенными уровнями СА IX. Как правило, указанный способ включает введение субъекту терапевтически эффективного количества выделенного гуманизированного антитела по изобретению. Антитело может представлять собой любое антитело к СА IX по изобретению, как описано выше. Антитело может быть введено в комбинации с другими агентами, например цитотоксическим, цитостатическим, антиангиогенным, блокирующим иммунные контрольные точки агентом или терапевтическим радиоизотопом.

Антитело по изобретению (и любой дополнительный терапевтический агент) может быть введено любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутривенное и интраназальное, и, при необходимости местного лечения, внутриочаговое введение. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриаартериальное, внутривнутрибрюшинное или подкожное введение. Дозирование может быть осуществлено любым пригодным способом, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. В настоящем документе предложены различные схемы дозирования, включая, но не ограничиваясь ими, единственное или многократное введения в различные моменты времени, болюсное введение и импульсную инфузию.

Антитела по настоящему изобретению могут быть составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное расстройство, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину расстройства, место доставки агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачам-практикам. Антитело необязательно должно быть, но может быть составлено с одним или более агентами, применяемыми в настоящее время для предупреждения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, описанных выше. Они, как правило, применяются в той же дозировке и посредством тех же путей введения, как описано в настоящем документе, или в любой дозировке и посредством любого пути введения, которые эмпирически/клинически определены как подходящие.

Для лечения заболевания подходящая дозировка антитела по изобретению (при применении по отдельности или в комбинации с одним или более другими дополнительными терапевтическими агентами) будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли антитело в превентивных или терапевтических целях, предыдущей терапии, истории болезни пациента и его ответа на антитело и усмотрения лечащего врача. Антитело подходящим образом вводят пациенту однократно или в ходе курсов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания первоначальная предполагаемая доза для введения пациенту, будь то, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии, может составлять от около 0,001 мг/кг до 15 мг/кг антитела. При повторном введении в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение обычно следует продолжать до желательного подавления симптомов заболевания. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели. Может быть введена начальная повышенная нагрузочная доза, за которой следует одна или более пониженные дозы. Ход такой терапии можно легко контролировать с помощью обычных способов и анализов.

### Примеры

Следующие примеры, включая проведенные эксперименты и полученные результаты, приведены только для иллюстративных целей и не должны рассматриваться как ограничивающие настоящее изобретение.

Коммерчески доступные реагенты, указанные в примерах, применялись в соответствии с инструкциями производителя, если не указано иное.

Пример 1. Гуманизированные антитела, происходящие из родительского mAb IV/18.

Этот пример демонстрирует конструирование и характеристику гуманизированных вариантов антитела CA9hu-2, направленных на протеогликановый домен CA IX.

В процессе гуманизации применяли комбинацию стандартных технологий прививки CDR в сочетании с последними исследованиями структуры антител и современной базой данных последовательностей зрелого IgG человека. Во-первых, были секвенированы переменные домены мышинного антитела VII/20. Определяющие комплементарность области (CDR) идентифицировали с помощью Информационной системы по иммуногенетике® (IMGT®) или системы нумерации по Кабату (Lefranc et al, Nucleic Acid Res 27:209-212, 1999; Lefranc et al, Dev Comp Immunol 27:55-77, 2003; Kabat et al, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edition, 1991). Для оптимального сохранения конформации CDR-петля применяли обе системы нумерации для идентификации CDR в мышинных переменных тяжелых ( $V_H$ ), а также переменных легких ( $V_L$ ) доменах. Впоследствии был идентифицирован ряд каркасных последовательностей человека, которые применяли в качестве "акцепторных" каркасов (ниже в тексте) для последовательностей CDR. Каждый из доменов  $V_H$  синтезировали на каркасе с последовательностью константного домена изотипа IgG человека (аллотип G1m17,1). Кроме того, каждый из доменов  $V_L$  был синтезирован на каркасе с последовательностью константного домена изотипа IgK человека (аллотип Km3). Вся последовательность тяжелой и легкой цепи представляла собой кодон-оптимизированную последовательность, и была проверена последовательность ДНК.

Комбинация пяти  $V_H$  и пяти  $V_L$  цепей привела к образованию двадцати пяти гуманизированных вариантов, имеющих гуманизированные переменные домены [обозначенные в последующем тексте как тяжелые (HC) и легкие (LC) цепи] и константные домены Ig человека. Для того чтобы охарактеризовать двадцать пять гуманизированных вариантов антител, все последовательности были подвергнуты скринингу на наличие связывающих эпитопов II-го класса ГКГС, мотивов гликозилирования Fv и мотивов дезамидирования.

Мышиное моноклональное антитело IV/18 (изотип IgG2a), направленное на протеогликан-подобный (PG) домен CA IX, получили у мышей с дефицитом CA IX (WO 2003/100029; Zatovicova et al, J Immunol Methods 282, 117-134, 2003). Предварительная инкубация гипоксических опухолевых клеток с mAb IV/18 уменьшила количество метастазов в легких в мышинной модели колонизации легких (фиг. 1A). Метастатические колонии флуоресцентно-меченных HT1080-красным флуоресцентным белком (RFP) клеток в перфузированных PBS мышинных легких визуализировали *ex vivo* через 12 дней с помощью системы визуализации IVIS Caliper (Фиг. 1B). Общая эффективность источника излучения отражает количество раковых клеток в мышинных легких. Предварительная инкубация клеток HT1080-RFP с mAb IV/18 и последующее введение трех доз антитела (50 мкг/мышь) в течение 12 дней после первичной инъекции в хвостовую вену (1500000 клеток/мышь, 10 мышей в группе) привели к заметному снижению колонизации легких этими клетками, что определили по сигналу флуоресценции с помощью IVIS. Метастатические колонии оценивали вскоре после инокуляции хвостовой вены, что означает, что снижение экстравазации было основным фактором, обуславливающим снижение образования метастазов. Эти данные указывают на возможную пользу терапии, направленной на CA IX, в ослаблении экстравазации опухолевых клеток и образовании метастазов.

#### Тяжелая цепь

Мышинный домен  $V_H$  имел последовательность, представленную ниже, которая не включает мышинную сигнальную пептидную последовательность:

EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYT  
 TYYADSVKDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSA  
 (SEQ ID NO. 19)

Остатки CDR (подчеркнуто) идентифицировали с помощью системы нумерации IMGT или системы нумерации по Кабату.

CDR1 VH IV/18 (SEQ ID NO. 1)

GFTFNTNAMH

CDR2 VH IV/18 (SEQ ID NO. 2)

RIRSKSNNYTTYADSVKD

CDR3 VH IV/18 (SEQ ID NO. 3)

VCGSWFAY

Онлайн базы данных последовательностей IgG человека проверяли для сравнения с мышинным до-

меном  $V_H$  с применением алгоритмов поиска BLAST, и из 200 лучших результатов BLAST были выбраны потенциальные переменные домены человека. Они были сокращены до пяти кандидатов (на основе комбинации каркасной гомологии, сохраняя ключевые каркасные остатки и каноническую петлевую структуру), и CDR были привиты.

Пять акцепторных каркасов представляют собой:

AGP01286 (SEQ ID NO. 20)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYA  
TAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRLVGAIPFDYWGQGLVTVS  
 S

AEX29087 (SEQ ID NO. 21)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFNFGPAIHWVRQASGKGLEWVGRIRSKAKNFAT  
AYAASVKGRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTTTSSSINDYWGQGLVTVSS

ACS95862 (SEQ ID NO. 22)

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFASFSSYGMHWVRQAPGRGLEWVAFIRSDGSNTY  
YSDSVKGRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCAFGGDYFYGWYWGQGLVTVSS

BAC01516 (SEQ ID NO. 23)

EVQLVESGGGVVQGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKY  
YADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGRGTGDYWGQGLVTVSS

IGHV3-73 (SEQ ID NO. 24)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSGSAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKANSYA  
TAYAASVKGRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCTRYYGMDVWGQGTTVTVSS

Акцепторные каркасы, привитые CDR мышинных  $V_H$ , становятся гуманизированными вариантами:

HC1 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 9)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC2 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 10)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC3 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 11)

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCLAASGFTFNTNAMHWVRQAPGRGLEWVARIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC4 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 12)

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCLAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

HC5 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 13)

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNNYT  
TYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLVTVSS

Табл. 1. Гомология гуманизированных вариантов по отношению к мышинной  $V_H$  mAb IV/18. В порядке гомологии гуманизированные варианты расположены в ряду HC2> HC1>HC5>HC4>HC3.

Таблица 1

|     | Идентичные<br>аминокислоты | Консенсусные<br>аминокислоты |
|-----|----------------------------|------------------------------|
| HC1 | 90,6%                      | 94,0%                        |
| HC2 | 91,5%                      | 94,9%                        |
| HC3 | 86,3%                      | 93,2%                        |
| HC4 | 88,0%                      | 93,2%                        |
| HC5 | 89,7 %                     | 93,2%                        |

Легкая цепь.

Мышиный домен  $V_L$  имел последовательность, представленную ниже, которая не включает мышиную сигнальную пептидную последовательность:

DIVMTQSPSSLAMSLGQKVTMSCKSSQSLNSSNQKNYLAWFQQKPGQSPKLLVYFTSTR

QSGVPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLADYFCQHQHYSIPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO.

25).

Остатки CDR (подчеркнуто) идентифицировали с помощью системы нумерации IMGT или системы нумерации по Кабату.

CDR1 VL IV/18 (SEQ ID NO. 4)

KSSQSLLNSSNQKNYLA

CDR2 VL IV/18 (SEQ ID NO. 5)

FTSTRQS

CDR3 VL IV/18 (SEQ ID NO. 6)

QQHYSIPLT

Онлайн базы данных последовательностей Ig kappa человека проверяли для сравнения с мышинным доменом V<sub>L</sub> с применением алгоритмов поиска BLAST, и из 200 лучших результатов BLAST были выбраны потенциальные переменные домены человека. Они были сокращены до пяти кандидатов (на основе комбинации каркасной гомологии, сохраняя ключевые каркасные остатки и каноническую петлевую структуру), и CDR были привиты.

Пять акцепторных каркасов представляют собой:

AAW69164 (SEQ ID NO. 26)

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSVLN<sup>T</sup>SN<sup>N</sup>KNYL<sup>V</sup>WYQQKPGQSPKLLIY<sup>L</sup>ASTRE  
FGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYHSSPHTFGQGTKLEIK

CAI99839 (SEQ ID NO. 27)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYNS<sup>N</sup>KNYL<sup>A</sup>WFQQKPGQPPNLVIY<sup>W</sup>ASTRE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCLQYYSTPLTFGQGTQVEIK

AMK70392 (SEQ ID NO. 28)

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKASQSVLYSS<sup>K</sup>KNYL<sup>A</sup>WYQQKPGQP<sup>K</sup>LLIY<sup>R</sup>ASTRDS  
GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQYYSTPQTFGQGTKVEIK

ALV87854 (SEQ ID NO. 29)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYRS<sup>K</sup>KNYL<sup>A</sup>WFQQKPGQPPK<sup>V</sup>LIY<sup>S</sup>TSTRA  
SGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYYYCLQYYITPYTFGQGTKLEIK

IGKV4-1 (SEQ ID NO. 30)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSS<sup>N</sup>KNYL<sup>A</sup>WYQQKPGQPPKLLIY<sup>W</sup>ASTRE  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYYSTPYTFGQGTKLEIK

Акцепторные каркасы, привитые CDR мышинных V<sub>L</sub>, становятся гуманизированными вариантами:

LC1 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 14)

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFTSTRQ  
SGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK

LC2 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 15)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPNLVIYFTSTRQS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK

LC3 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 16)

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTKVEIK

LC4 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 17)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPKVLIIYFTSTRQS  
 GVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK

LC5 CA9hu-2 (SEQ ID NO. 18)

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTRQS  
 GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK

Табл. 2. Гомология гуманизированных вариантов по отношению к мышинной V<sub>L</sub> mAb IV/18. В порядке гомологии гуманизированные варианты расположены в ряду LC1>LC4=LC5>LC3>LC2.

|     | Идентичные<br>аминокислоты | Консенсусные<br>аминокислоты |
|-----|----------------------------|------------------------------|
| LC1 | 85,8%                      | 94,7%                        |
| LC2 | 82,3%                      | 90,3%                        |
| LC3 | 84,1%                      | 92,0%                        |
| LC4 | 85,0%                      | 92,9%                        |
| LC5 | 85,0%                      | 92,9%                        |

Проверка гуманизации.

Были проверены гуманизированные варианты, чтобы определить, были ли они гуманизированы в соответствии с определением гуманизированных антител Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ): Вариабельный домен гуманизированной цепи имеет аминокислотную последовательность V области, которая, анализируемая в целом, ближе к человеку, чем к другим видам (оценивается с помощью инструмента IMGT® DomainGapAlign) (Ehrenmann et al, Nucleic Acids Res 38, D301-307, 2010).

Табл. 3. Международные непатентованные наименования (МНН) антител, присвоенные ВОЗ, для мышинных и гуманизированных вариантов. VH0/VL0 представляет собой мышиную последовательность IV/18, а HC1-5/LC1-5 представляет собой гуманизированные варианты.

Таблица 3

| Название последовательности | Виды         | Гены и Аллели | Метка домен | % Идентичности | Перекрытие | Обозначение МНН по ВОЗ |
|-----------------------------|--------------|---------------|-------------|----------------|------------|------------------------|
| VH0                         | Mus musculus | IGHV10S3*01   | VH          | 98,0           | 99         | Мышиное                |
| HC1                         | Homo sapiens | IGHV3-73*01   | VH          | 90,8           | 98         | Гуманизированное       |
| HC2                         | Homo sapiens | IGHV3-73*01   | VH          | 89,8           | 98         | Гуманизированное       |
| HC3                         | Homo sapiens | IGHV3-30*02   | VH          | 84,7           | 98         | Гуманизированное       |
| HC4                         | Homo sapiens | IGHV3-30*01   | VH          | 85,7           | 98         | Гуманизированное       |
| HC5                         | Homo sapiens | IGHV3-73*01   | VH          | 90,8           | 98         | Гуманизированное       |
| VL0                         | Mus musculus | IGKV8-24*01   | V-          | 95,0           | 101        | Мышиное                |
| Каппа                       |              |               |             |                |            |                        |
| LC1                         | Homo sapiens | IGKV4-1*01    | V-<br>Каппа | 89,1           | 101        | Гуманизированное       |
| LC2                         | Homo sapiens | IGKV4-1*01    | V-<br>Каппа | 87,1           | 101        | Гуманизированное       |
| LC3                         | Homo sapiens | IGKV4-1*01    | V-<br>Каппа | 90,1           | 101        | Гуманизированное       |
| LC4                         | Homo sapiens | IGKV4-1*01    | V-<br>Каппа | 89,1           | 101        | Гуманизированное       |
| LC5                         | Homo sapiens | IGKV4-1*01    | V-<br>Каппа | 92,1           | 101        | Гуманизированное       |

#### Скрининг Т-клеточного эпитопа.

Презентация пептидных последовательностей в желобе молекул главного комплекса гистосовместимости (ГКГС) II класса приводит к активации CD4<sup>+</sup> Т-клеток и иммуногенному ответу. Для того чтобы уменьшить этот ответ, терапевтические белки могут быть сконструированы таким образом, чтобы избежать включения "Т-клеточных эпитопов", которые могут активировать Т-клетки путем снижения аффинности связывания с молекулами ГКГС II класса.

Исходные мышинные V<sub>H</sub> и V<sub>L</sub> антитела и последовательности гуманизированного варианта подвергали скринингу на связывающие пептиды ГКГС II класса, чтобы определить, что в процессе гуманизации с помощью алгоритмов *in silico* были удалены пептидные последовательности с высокой аффинностью. Следующие 8 аллелей представляют более 99% мирового населения и являются стандартным набором аллелей, применяемым для прогнозирования эпитопов ГКГС II класса: DRB1\*01:01; DRB1\*03:01; DRB1\*04:01; DRB1\*07:01; DRB1\*08:02; DRB1\*11:01; DRB1\*13:02; DRB1\*15:01 (Nielsen et al, BMC Bioinformatics 8:238, 2007; Wang et al, BMC Bioinformatics 11:568, 2010; Gonzalez-Galarza et al, Nucleic Acid Research 39, D913-D919, 2011; Greenbaum et al, Immunogenetics 63(6): 325-35, 2011).

Для домена V<sub>H</sub> все гуманизированные варианты показали хорошие результаты с точки зрения скрининга Т-клеточного эпитопа, при этом HC3, согласно прогнозам, имеет наименьший Т-клеточный эпитоп зародышевой линии. С помощью анализа только по гомологии оценили HC2 и HC1 как наиболее близкие к мышинной родительской последовательности.

Для домена V<sub>L</sub> все гуманизированные варианты в ходе скрининга Т-клеточного эпитопа были оценены одинаково. Только по гомологии LC1 и LC4 были оценены как самые высокие.

#### Скрининг посттрансляционных модификаций.

##### Гликозилирование Fv.

Мотив N-гликозилирования представляет собой NXS/T, где X представляет собой любую аминокислоту, кроме пролина. Этот мотив NYT присутствует в мышинном варианте V<sub>H</sub> CDR2 и, поскольку CDR были привиты в полном объеме, был перенесен во все гуманизированные варианты.

Мотив NSS присутствует в мышинной CDR1 легкой цепи. Этот мотив также был перенесен во все гуманизированные варианты.

##### Деаμίдирование.

Аминокислотные мотивы SNG, ENN, LNG и LNN могут быть склонны к деаμίдированию аспарагинов в аспарагиновую кислоту (Chelius et al, Anal Chem 77(18): 6004-11, 2005). Аспарагин в других мотивах менее склонен к деаμίдированию. Ни один из этих четырех мотивов не присутствует в мышинных или гуманизированных вариантах V<sub>H</sub> или V<sub>L</sub> mAb IV/18.

Вышеприведенные данные демонстрируют получение двадцати пяти гуманизированных вариантов (обозначенных в последующем тексте как CA9hu-2\_HCxLCx), имеющих гуманизированные вариабельные домены и константные домены Ig человека.

Пример 2. Характеристика связывающей способности гуманизированных антител.

Этот пример демонстрирует желательные свойства связывания двадцати пяти гуманизированных вариантов CA9hu-2 для карбоангидразы IX.

Для оценки антигенсвязывающей специфичности все двадцать пять гуманизированных вариантов CA9hu-2 подвергли твердофазному иммуноферментному анализу (ИФА) с применением либо CA IX-положительного, либо CA IX-отрицательного антигена. Антигены получали из стабильно трансфицированной клеточной линии C-33a, экспрессирующей CA IX (C-33a\_CA IX), и родительских ложно-трансфицированных клеток C-33a без экспрессии CA IX (C-33a\_neo).

Белки экстрагировали из клеточного монослоя лизирующим буфером RIPA (0,1% дезоксихолат, 1% Тритон X-100 и коктейль ингибиторов протеазы в PBS). Концентрация белка определяли с помощью анализа бичинхоиноновой кислоты (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, США) в соответствии с инструкциями производителя. Белковые экстракты разбавляли до конечной концентрации 0,2 мг/мл в PBS. Концентрация белка в образцах антигена, применяемых при скрининге специфического взаимодействия антиген-антитело, протестированного с помощью ИФА, соответствует требованиям к низкому содержанию детергента, которое в противном случае могло бы помешать анализу. 50 мкл либо CA IX-положительного, либо CA IX-отрицательного антигена наносили на поверхность лунок планшета в течение ночи при 37°C. После промывки PBS-T 0,05% Tween-20 в PBS при pH 7,2, добавляли 50 мкл всех гуманизированных вариантов CA9hu-2 (разбавленных до концентрации 5 мкг/мл в 10% FCS в PBS-T) и инкубировали в течение 2 ч при комнатной температуре. В качестве детектора применяли меченное пероксидазой антитело свиньи к IgG человека (разбавленное 1:5000 в 10% FCS в PBS-T; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, США). В качестве эталонных образцов применяли родительское антитело IV/18 (обозначенное как "Ab мыши"), а также химерное антитело HC0LC0 (имеющие мышьиные вариабельные домены и константные домены Ig человека). Данные на графике выражены как кратность изменения и рассчитаны как соотношение между значениями оптической плотности (O.D.) поглощения, измеренными при 492 нм, от CA IX-положительного антигена и значениями O.D. поглощения, измеренными при 492 нм, от CA IX-отрицательного антигена.

На фиг. 2 продемонстрировано специфическое и эффективное связывание двадцати пяти гуманизированных вариантов антител к CA IX. Большинство вариантов антитела CA9hu-2 показали даже более высокую специфичность, чем химерный вариант.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированные варианты антитела CA9hu-2 сохраняют желательную специфичность к их антигену и могут быть применены для специфического разделения опухолевых клеток, экспрессирующих CA IX.

Пример 3: Влияния ADCC (антителозависимая клеточно-опосредованная цитотоксичность) и CDC (комплемент-зависимая цитотоксичность) гуманизированных антител

Этот пример демонстрирует желательное участие гуманизированных вариантов антител к CA IX в антителозависимой клеточно-опосредованной цитотоксичности (ADCC) и комплемент-зависимой цитотоксичности (CDC).

ADCC.

Для оценки способности гуманизированных вариантов антител опосредовать цитотоксический эффект применяли ADCC Reporter Bioassay System (Promega, Madison WI, USA). ADCC Reporter Bioassay System представляет собой биолюминесцентный репортерный анализ для количественной оценки биологической активности по активации путей терапевтическими лекарственными средствами антител в механизме действия ADCC (Chung et al., *Monoclonal Antibodies* 4:326-40, 2012). В нем применяются сконструированные клетки Jurkat, стабильно экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, высокоаффинный вариант V158 и отвечающий элемент NFAT (ядерный фактор активированных T-клеток), управляющий экспрессией люциферазы светлячков в качестве эффекторных клеток. Таким образом, механизм действия ADCC количественно определяется посредством получения люциферазы в результате активации NFAT.

Репортерный анализ ADCC проводили в соответствии с инструкциями производителя с применением C-33a\_CA IX, а также C-33a\_neo клеток. Оба типа клеток (12500 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37°C. Гуманизированный вариант антитела CA9hu-2 разбавляли до 1 мкг/мл в PBS и применяли 75000 эффекторных клеток (в соответствии с рекомендуемым соотношением эффектор:мишень, равным 6:1) на лунку. После 6 ч инкубации проводили детектирование люциферазы светлячков с помощью реагента для анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega). Смесь образца с буфером для анализа ADCC и эффекторными клетками без добавления гуманизированного антитела обозначали как "без Ab". Смесь образца без антитела и эффекторных клеток обозначали как "без Ab, без EC" и она служит в качестве "фона планшета". Результаты выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и рассчитаны как кратность изменения (соотношение между RLU, индуцированная вариантом гуманизированного антите-

ла и RLU без Ab).

Как показано на фиг. 3, варианты CA9hu-2 демонстрировали высокий сигнал люминесценции и, таким образом, высокую цитотоксичность против клеточной линии С-33а, экспрессирующей CA IX. В связи с тем, что RLU образцов были в 100 раз выше, чем RLU фона планшета (обозначенные как "без Ab, без клеток ЕС"), не было необходимости вычитать фон планшета из RLU образца.

Оценка эффекторных функций гуманизированных вариантов антител по изобретению (через репортерный анализ ADCC), а также их антигенсвязывание и специфичности (с помощью ИФА) привела к выбору следующих вариантов антител в качестве потенциальных кандидатов: HC3LC1, HC3LC2, HC4LC1, HC4LC2 и HC4LC5.

Чтобы доказать антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность на раковой клетке, естественным образом экспрессирующей CA IX, авторы настоящего изобретения проанализировали клеточную линию трижды негативного рака молочной железы (ТНРМЖ) BT-20, а также клеточную линию глиобластомы 8-MG-BA. За день до анализа линии раковых клеток предварительно инкубировали в условиях гипоксии для обеспечения самой высокой экспрессии CA IX. После предварительной инкубации в условиях гипоксии 12500 клеток/лунку высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37°C. Аналогично, как и в случае скрининга ADCC, репортерный анализ ADCC проводили в соответствии с инструкциями производителя. Гуманизированный вариант антитела CA9hu-2\_HC4LC5 разбавляли до 1 мкг/мл в PBS и применяли 75000 эффекторных клеток (в соответствии с рекомендуемым соотношением эффектор:мишень, равным 6:1) на лунку. После 6 ч инкубации проводили детектирование люциферазы светлячков с помощью реагента для анализа люциферазы Bio-Glo™.

Табл. 4. Активность ADCC гуманизированного варианта антитела CA9hu-2HC4LC5, проанализированная с помощью клеточных линий рака, происходящих либо из глиобластомы (8-MG-BA), либо из рака молочной железы (BT-20). Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированного антитела, обозначены как "без Ab". Данные в таблице выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и представляют собой значения среднее ± среднееквадратическое отклонение (CO).

Таблица 4

|         | без Ab        |        | CA9hu-2_HC4LC5   |        |
|---------|---------------|--------|------------------|--------|
|         | Среднее       | CO     | Среднее          | CO     |
| 8-MG-BA | 6504,8 (100%) | 3061,6 | 27920,3 (429,2%) | 2722,4 |
| BT-20   | 1628,0 (100%) | 171,0  | 3296,3 (202,5%)  | 780,9  |

Репортерный анализ ADCC позволил проанализировать более раннюю точку пути ADCC через NFAT-опосредованную активацию транскрипции генов в эффекторных клетках. В табл. 4 четко показано, что гуманизированный вариант антитела CA9hu-2\_HC4LC5 сохраняет способность активировать путь ADCC и опосредовать цитотоксическое действие на клетки-мишени, экспрессирующие CA IX. По сравнению с отсутствием обработки Ab, репортерная активность ADCC повышалась после инкубации обеих линий раковых клеток с CA9hu-2\_HC4LC5. Наибольшая кратность (выше 4-кратной) наблюдалась в клетках глиобластомы 8-MG-BA.

#### CDC.

Для оценки способности гуманизированных вариантов антител участвовать в CDC применяли набор для анализа жизнеспособности Cell Titer Blue (Promega). Анализ жизнеспособности Cell Titer Blue обеспечивает гомогенный флуориметрический способ оценки количества жизнеспособных клеток с помощью индикаторного красителя резазурина и, таким образом, измерение метаболической способности клеток в качестве индикатора их жизнеспособности. В жизнеспособной клетке резазурин восстанавливается до высокофлуоресцентного резорурфина, генерирующего флуоресцентный сигнал, который может быть измерен ( $530_{Ex}/590_{Em}$ ). Таким образом, флуоресцентный сигнал от реагента Cell Titer Blue пропорционален количеству жизнеспособных клеток.

Анализ Cell Titer Blue проводили в соответствии с инструкциями производителя с применением С-33а\_CA IX, а также С-33а\_нео клеток. Оба типа клеток (200000 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37°C. Гуманизированный вариант антитела CA9hu-2\_HC4LC5, разбавленный до 5 мкг/мл, добавляли к обеим клеточным линиям. В каждую лунку добавляли сыворотку комплемента кролика (10% от общего объема, BAG Health Care, Lich, Германия), перемешивали и инкубировали. Жизнеспособность клеток количественно определяли и анализировали через 24 ч. Результаты выражены в виде флуоресценции, измеренной при  $530_{Ex}/590_{Em}$ .

Табл. 5. Влияние гуманизированного антитела CA9hu-2\_HC4LC5 на жизнеспособность анализи-

руемых клеток  $\pm$ , экспрессирующих СА IX (C-33a\_CA IX по сравнению с C-33a\_neo), в присутствии комплемента, определенное с помощью анализа жизнеспособности Cell Titer Blue. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как "без Ab". Данные в таблице выражены в виде флуоресценции и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднеквадратическое отклонение (CO).

Таблица 5

|                | C-33a_CA IX   |       | C-33a_neo     |       |
|----------------|---------------|-------|---------------|-------|
|                | Среднее       | CO    | Среднее       | CO    |
| без Ab         | 3393,5 (100%) | 389,6 | 3096,5 (100%) | 289,2 |
| CA9hu-2_HC4LC5 | 2159 (63,6%)  | 240,4 | 2807 (90,7%)  | 193,7 |

В табл. 5 иллюстрируется способность гуманизированного варианта антитела CA9hu-2\_HC4LC5 влиять на жизнеспособность СА IX-экспрессирующих клеток в присутствии комплемента. После 24-часовой инкубации с CA9hu-2\_HC4LC5 в присутствии комплемента, клетки C-33a\_CA IX показали только 64% жизнеспособности. На жизнеспособность клеток C-33a\_neo почти не оказывалось влияния.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированные варианты антитела CA9hu-2 могут быть применены для специфического разделения и, следовательно, опосредования цитотоксического ответа посредством ADCC или CDC на опухолевые клетки, экспрессирующие СА IX.

Пример 4. Влияния ADCC гуманизированных антител, опосредованных мононуклеарными клетками периферической крови, в трехмерных сфероиде.

Этот пример демонстрирует желательное свойство гуманизированного варианта антитела опосредовать активность ADCC в трехмерных культурах.

Трехмерные (3D) культуры, такие как многоклеточные сфериды, все чаще применяются в фундаментальных исследованиях для изучения клеточной биологии и физиологии в более реалистичных условиях. Для подтверждения эффективности гуманизированных антител в опосредовании цитотоксического эффекта на раковые клетки в 3D системе авторы настоящего изобретения осуществили совместную культивацию клеток ТНРМЖ ВТ-20 и мононуклеарных клеток периферической крови (МКПК). МКПК выделяли из периферической крови человека (здорового донора) центрифугированием в градиенте плотности с помощью Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare). Для визуализации МКПК в сфероиде выделенные клетки окрашивали Оранжевым красителем для мечения цитоплазматической мембраны CellBrite™ (Biotium, Hayward CA, США). Сначала клетки ВТ-20 окрашивали Зеленым красителем для мечения цитоплазматической мембраны CellBrite™, а затем предварительно формировали сфериды ВТ-20 из 10000 клеток на 25 мкл культуральной среды в каплях, подвешенных на крышке чашки для культивирования тканей в течение 7 дней при 37°C. Через 10 дней культивирования предварительно окрашенные МКПК/Оранжевый клетки (2000000) добавляли вместе с сорока сфероидами ВТ-20 в чашки Петри и смешивали с гуманизированным антителом или CA9hu-2\_HC4LC5 (25 мкг/мл). Сфериды, культивируемые без гуманизированных антител, обрабатывали PBS (отрицательный контроль). Распределение предварительно окрашенных клеток МКПК в сфероиде анализировали после 3 дней обработки с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Zeiss LSM510 Meta.

Для проверки эффекта длительного (11 дней) совместного культивирования с клетками МКПК, сфериды ВТ-20 собирали и фиксировали в фиксирующем растворе Карнуа в течение 2 ч и заливали в парафин в соответствии со стандартными гистологическими процедурами. Блоки сфероидов разрезали на 4 мкм тонкие срезы и подвергали иммуногистохимическому окрашиванию с помощью DAKO Cytomation EnVision+ System-HRP (DAB; DAKO, Glostrup, Дания) в соответствии с рекомендацией производителя. Первичное антитело, специфичное к мышинному моноклональному М75 к СА IX, разбавляли (1 мкг/мл) и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Окрашивание визуализировали раствором DAB. В конце, срезы контрастировали гематоксилином Майера. Окрашенные срезы исследовали с помощью микроскопа LeicaDM4500B и фотографировали с помощью камеры Leica DFC480.

На фиг. 4 четко показано включение предварительно окрашенных МКПК в сфериды ВТ-20. Визуализация с помощью конфокальной микроскопии выявила более интенсивное включение МКПК после обработки гуманизированным антителом CA9hu-2\_HC4LC5. Процент положительного сигнала от МКПК оценивали для всего сфероида ВТ-20 с помощью программного обеспечения ImageJ 1.38x (Rasband, W.S., ImageJ, NTH, Bethesda MD, США). Доля пикселей, окрашенных МКПК, во всем сфероиде составила 6,624% после обработки CA9hu-2\_HC4LC5. В случае необработанных сфероидов было выявлено только 2,781% МКПК-положительных пикселей. Эффект длительной обработки сфероидов ВТ-20 МКПК и гуманизированным антителом исследовали через 11 дней. Как показано на фиг. 4, значительные морфологические изменения наблюдались после совместного культивирования сфероидов ВТ-20 с МКПК человека и обработки гуманизированным вариантом CA9hu-2\_HC4LC5. Иммуногистохимический анализ применяли для визуализации экспрессии СА IX в сфероиде ВТ-20.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированное антитело CA9hu-2\_HC4LC5

по изобретению способствует ответу ADCC в 3D культурах сфероидов. Это первая демонстрация вышеупомянутого влияния, описанного с применением PG-специфических гуманизированных антител.

Пример 5. Влияния ADCP (антителозависимый клеточно-опосредованный фагоцитоз) гуманизированных антител.

Этот пример демонстрирует желательное участие гуманизированного антитела в антителозависимом клеточно-опосредованном фагоцитозе (ADCP).

Для оценки способности гуманизированного варианта антитела опосредовать фагоцитоз применяли ADCP Reporter Bioassay System (Promega, Madison WI, USA). FcγRIIIa-H ADCP Reporter Bioassay System представляет собой биолюминесцентный анализ на основе клеток для измерения активности и стабильности антител и других биологических препаратов с Fc-доменами, которые специфически связывают и активируют FcγRIIIa. В нем применяются сконструированные Т-клетки Jurkat, экспрессирующие рецептор FcγRIIIa, высокоаффинный вариант H131 и отвечающий элемент NFAT, управляющий экспрессией люциферазы светлячков в качестве эффекторных клеток. Таким образом, механизм действия ADCP количественно определяется посредством получения люциферазы в результате активации NFAT.

Репортерный анализ ADCP проводили в соответствии с инструкциями производителя с применением BT-20, C-33a\_CA IX, а также C-33a\_нео клеток. Клетки BT-20 предварительно инкубировали в условиях гипоксии в течение 48 ч для обеспечения наивысшей экспрессии CA IX. За день до анализа все три клеточные линии (12500 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37°C. Гуманизированный вариант антитела CA9hu-2 разбавляли до 2 мкг/мл в PBS и применяли 75000 эффекторных клеток (в соответствии с рекомендуемым соотношением эффектор:мишень, равным 6:1) на лунку. В качестве эталонного образца применяли химерное антитело HC0LC0 (имеющее мышинные переменные домены и константные домены Ig), разбавленное до 2 мг/мл. После 6 ч инкубации проводили детектирование люциферазы светлячков с помощью реагента для анализа люциферазы Bio-Glo™ (Promega). Смесь образца с буфером для анализа ADCP и эффекторными клетками без добавления гуманизированного антитела обозначали как "без Ab". Смесь образца без антитела и эффекторных клеток обозначали как "без Ab, без EC" и она служит в качестве "фона планшета". Результаты выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU). В связи с тем, что RLU образцов были в 100 раз выше, чем RLU фона планшета (обозначенные как "без Ab, без клеток EC"), не было необходимости вычитать фон планшета из RLU образца.

Табл. 6. Фагоцитарная активность гуманизированного варианта антитела CA9hu-2HC4LC5, проанализированная на экспрессирующих CA IX (C-33a\_CA IX и предварительно инкубированные в условиях гипоксии BT-20) клетках в сравнении с CA IX-отрицательными (C-33a\_нео) клетками. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие антител, обозначены как "без Ab". Данные в таблице выражены в виде люминесценции в относительных единицах люминесценции (RLU) и представляют собой значения среднее ± среднеквадратическое отклонение (CO).

Таблица 6

|                | C-33a_нео      |      | C-33a_CA IX    |      | BT-20          |      |
|----------------|----------------|------|----------------|------|----------------|------|
|                | Среднее        | CO   | Среднее        | CO   | Среднее        | CO   |
| без Ab         | 376,7 (100%)   | 20,4 | 435,3 (100%)   | 52,5 | 594,3 (100%)   | 19,2 |
| CA9hu-2_HC4LC5 | 410,3 (108,9%) | 36,1 | 808,7 (185,8%) | 42,8 | 1029 (173,1%)  | 85,2 |
| HC0LC0         | 379 (100,6%)   | 9,8  | 682,7 (156,8%) | 78,9 | 940,3 (158,2%) | 51,2 |

Как показано в табл. 6, почти никакой фагоцитарной активности не наблюдалось при применении CA IX-отрицательных C-33a\_нео клеток в качестве клеток-мишеней. Эти результаты не зависят от того, инкубировали ли клетки C-33a в присутствии или в отсутствии специфического к CA IX антитела. Наивысшая фагоцитарная активность была достигнута после инкубации экспрессирующих CA IX раковых клеток в присутствии гуманизированного варианта антитела CA9hu-2\_HC4LC5. По сравнению с отсутствием обработки Ab, самый высокий сигнал люминесценции наблюдался в клетках C-33a\_CA IX, а также предварительно инкубированных в условиях гипоксии клетках BT-20. Репортерный анализ ADCP также показал, что фагоцитарная активность гуманизированного антитела была даже выше, чем химерного антитела HC0LC0.

Вышеприведенные результаты демонстрируют, что гуманизированный вариант антитела CA9hu-2\_HC4LC5 может применяться для специфического распознавания и, следовательно, опосредования фагоцитоза раковых клеток, экспрессирующих CA IX. Учитывая тот факт, что ADCP является важным механизмом действия терапевтических антител, фагоцитарная активность гуманизированного антитела по изобретению представляет собой исключительно полезное свойство. Это первая демонстрация вышеупомянутого влияния, описанного с применением PG-специфических гуманизированных антител.

Пример 6. Влияние гуманизированных антител на инвазию раковых клеток.

Этот пример демонстрирует исключительное свойство гуманизированного антитела ингибировать инвазию раковых клеток.

Метастатический каскад может быть разделен на три основных процесса: инвазия, интравазия и экстравазия. Мышиная модель колонизации легких позволила выявить возможное преимущество терапии, направленной на СА IX, состоящее в ослаблении экстравазации раковых клеток и образовании метастазов (Фиг. 1). Уменьшение количества метастазов в легкие, которое наблюдалось с опухолевыми клетками, предварительно инкубированными в условиях гипоксии с родительским mAb IV/18 *in vivo*, побудило к исследованию влияния гуманизированных антител на инвазию раковых клеток *in vitro*. С этой целью осуществляли измерения импеданса клеточного индекса xCELLigence с помощью CIM-Plate16 и станции RTCA DP в соответствии с инструкциями поставщика (Roche, Basel, Switzerland). Клетки C-33a\_CA IX ресуспендировали при плотности 40000 клеток/мл в бессывороточной среде в присутствии или в отсутствии гуманизированного варианта антитела CA9hu-2\_HC4LC5, разбавленного до 25 мкг/мл. После добавления в покрытую матрицелом верхнюю камеру планшета CIM-Plate клеткам C-33a\_CA IX давали возможность мигрировать в нижнюю камеру, содержащей среду с 10% FCS в качестве хемоаттрактанта. Планшет CIM-Plate помещали в станцию RTCA DP и контролировали инвазию в условиях гипоксии каждые 15 мин в течение 60 ч.

На фиг. 5 продемонстрирована способность гуманизированного антитела ингибировать инвазию раковых клеток по сравнению с отсутствием обработки антителом (без Ab). Способность к инвазии клеток C-33a, экспрессирующих СА IX, значительно снижалась после обработки гуманизированным вариантом антитела CA9hu-2\_HC4LC5.

Вышеприведенные результаты демонстрируют способность гуманизированного варианта антитела CA9hu-2\_HC4LC5 по изобретению ингибировать инвазию экспрессирующих СА IX клеток C-33a. Учитывая тот факт, что ингибирование инвазии раковых клеток может привести к ограниченному прогрессированию опухоли и, следовательно, к снижению смертности онкологических пациентов, этот механизм действия представляет собой чрезвычайно полезное свойство. Дополнительно, это первая демонстрация вышеупомянутого влияния, описанного с применением РG-специфических гуманизированных антител.

Пример 7. Влияние гуманизированных антител на жизнеспособность клеток.

Этот пример демонстрирует желательное свойство гуманизированного варианта антитела не влиять на жизнеспособность клеток.

Для оценки влияния гуманизированных антител на жизнеспособность клеток анализ жизнеспособности Cell Titer Blue проводили аналогично анализу в Примере 3 (в отсутствие комплемента) и в соответствии с инструкциями производителя с применением C-33a\_CA IX, а также C-33a\_neo клеток. Оба типа клеток (200000 клеток/лунку) высевали на стерильный 96-луночный планшет и инкубировали в культуральной среде в течение ночи при 37°C. К обеим клеточным линиям добавляли гуманизированный вариант антитела CA9hu-2\_HC4LC5, разбавленный до 5 мкг/мл. Жизнеспособность клеток измеряли через 24 ч.

Флуоресцентный сигнал от реагента Cell Titer Blue пропорционален количеству жизнеспособных клеток.

Табл. 7. Влияние гуманизированного антитела CA9hu-2\_HC4LC5 на жизнеспособность анализируемых клеток +/-, экспрессирующих СА IX (C-33a\_CA IX по сравнению с C-33a\_neo), определенное с помощью анализа жизнеспособности Cell Titer Blue. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как "без Ab". Данные в таблице выражены в виде флуоресценции и представляют собой значения среднее  $\pm$  среднееквадратическое отклонение (CO).

Таблица 7

|                | C-33a_CA IX |       | C-33a_neo     |       |
|----------------|-------------|-------|---------------|-------|
|                | Среднее     | CO    | Среднее       | CO    |
| без Ab         | 7398 (100%) | 192,3 | 7594,5 (100%) | 34,6  |
| CA9hu-2_HC4LC5 | 7842 (106%) | 291,3 | 8263 (108,8%) | 718,4 |

Как показано в табл. 7, анализ жизнеспособности Cell Titer Blue показал, что жизнеспособность обработанных клеток C-33a, ни СА IX-положительных, ни СА IX-отрицательных, не изменилась через 24 ч.

Вышеприведенные данные демонстрируют, что гуманизированный вариант антитела по изобретению, CA9hu-2\_HC4LC5, не оказывает токсического влияния на обработанные раковые клетки.

Пример 8. Прогнозирование безопасности гуманизированных антител с помощью анализа высвобождения цитокинов ("цитокинный шторм").

Этот пример демонстрирует желательное свойство выбранного гуманизированного варианта антитела в анализе высвобождения цитокинов *in vitro*.

Анализ высвобождения цитокинов (CRA) лучше всего применять для идентификации опасности, но не для количественной оценки риска, и они могут помочь понять потенциальный риск и проинформи-

ровать о стратегиях снижения риска (Vidal et al, Cytokine 51:213-215, 2010). CRA могут быть использованы для классификации терапий посредством прогнозируемой безопасности и могут предоставить дополнительные данные о потенциальных механизмах высвобождения цитокинов у человека. Лекарственные средства, нацеленные на мембранно-связанные антигены или рецепторы, несут больший риск индуцирования высвобождения цитокинов, чем лекарственные средства, нацеленные на растворимые молекулы. Измерение высвобождения цитокинов проводят в сравнении с лекарственными соединениями, которые, как известно, вызывают высокие и низкие ответы, в качестве контроля. Результаты анализа могут применяться для идентификации опасностей и оценки относительного риска. Для полного профиля цитокинового ответа измеряли следующие цитокины: интерлейкин (IL)-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10, интерферон  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) и фактор некроза опухоли  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Suntharalingam et al, N Engl J Med 355(10): 1018-1028, 2006).

Для оценки высвобождения цитокинов, связанных с гуманизированными антителами по изобретению, проводили CRA (ProImmune Ltd., Oxford, Великобритания) и анализировали свежие образцы цельной крови 20 здоровых доноров. Неразбавленные образцы цельной крови инкубировали в присутствии тестируемых антител в различных концентрациях (100, 10, 1 и 0,1 мкг/мл) при 37°C в течение 24 ч. Измерение высвобождения цитокинов проводили с помощью микроматричного анализа ProArray Ultra®. Все цитокины количественно определяли по стандартной кривой известных концентраций. Два контрольных антитела (Erbitux®/цетуксимаб в качестве контроля с низким ответом и Campath®/алемтузумаб в качестве контроля с высоким ответом) также были включены в CRA. PBS применяли в качестве отрицательного контроля анализа. Положительный контроль анализа стафилококкового энтеротоксина В (SEB) применили для того, чтобы вызвать повышенное высвобождение цитокинов у всех доноров и, таким образом, для подтверждения, что анализ выполнен в соответствии с ожиданиями.

В табл. 8 представлены результаты анализа высвобождения цитокинов с медианными значениями (пг/мл) для каждой комбинации лекарственное средство/доза. Медианный ответ на SEB для всех цитокинов был выше нуля, демонстрируя, что донорские клетки обладают функциональной способностью продуцировать цитокины. В то время как Erbitux® вызывал в целом низкие уровни высвобождения цитокинов, применение Campath® приводило к повышенным уровням высвобождения IL-6, IL-8 и IFN $\gamma$  у большинства доноров (клинически это лекарственное средство связано с синдромом высвобождения цитокинов). Аналогично, как и в случае с Erbitux, гуманизированный вариант антитела CA9hu-2\_HC4LC5 не оказывал влияния на высвобождение тестируемых цитокинов, что указывает на полезное свойство данного конкретного гуманизованного варианта.

Табл. 8. Реакционная способность CA9hu-2\_HC4LC5 в анализе высвобождения цитокинов. Также были включены и проанализированы два контрольных антитела (Erbitux® в качестве контроля с низким ответом и Campath® в качестве контроля с высоким ответом). PBS применяли в качестве отрицательного контроля анализа, а стафилококковый энтеротоксин В (SEB) - в качестве положительного контроля. Результаты выражены в виде медианных уровней цитокинов (пг/мл) для каждой комбинации лекарственное средство/доза.

Таблица 8

|                            |     | IL-2    | IL-4    | IL-6    | IL-8    | IL-10   | IFN $\gamma$ | TNF $\alpha$ |
|----------------------------|-----|---------|---------|---------|---------|---------|--------------|--------------|
|                            |     | (пг/мл) | (пг/мл) | (пг/мл) | (пг/мл) | (пг/мл) | (пг/мл)      | (пг/мл)      |
| PBS                        |     | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0            | 0            |
| SEB                        |     | 38106,5 | 59,7    | 26016,9 | 4632,5  | 442,0   | 37354,4      | 3609,9       |
| CA9hu-2_HC4LC5<br>(мкг/мл) | 100 | 0       | 0       | 4594,3  | 51,5    | 4,8     | 0            | 0            |
|                            | 10  | 0       | 0       | 508,6   | 0       | 0       | 0            | 0            |
|                            | 1   | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0            | 0            |
|                            | 0,1 | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0            | 0            |
| Erbitux®<br>(мкг/мл)       | 100 | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0            | 0            |
|                            | 10  | 0       | 0       | 4,6     | 2,9     | 0       | 0            | 0            |
|                            | 1   | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0            | 0            |
|                            | 0,1 | 0       | 0       | 0       | 0       | 0       | 0            | 0            |
| Campath®<br>(мкг/мл)       | 100 | 0       | 0       | 3307,4  | 93,1    | 0       | 753,3        | 0            |
|                            | 10  | 0       | 0       | 1728,9  | 38,8    | 0       | 1642,9       | 0            |
|                            | 1   | 0       | 0       | 1733,5  | 82,3    | 0       | 2806,9       | 36,8         |
|                            | 0,1 | 0       | 0       | 851,1   | 37,4    | 0       | 1800,1       | 0            |

Вышеприведенные результаты демонстрируют желательное свойство гуманизованного варианта антитела CA9hu-2\_НC4LC5 не индуцировать цитокиновый ответ.

Пример 9. Влияния гуманизованных антител на многоклеточную агрегацию.

Этот пример демонстрирует исключительное свойство гуманизованного варианта антитела ингибировать многоклеточную агрегацию в условиях отсоединения.

Для подтверждения влияния гуманизованного антитела по изобретению на способность обрабатываемых клеток образовывать многоклеточные агрегаты, был осуществлен многоклеточный анализ агрегации. Неионную кислоту поли(2-гидроксиэтилметакрилат) (ПГЭМА; Sigma-Aldrich), которая ингибирует осаждение матрицы и присоединение клеток, растворяли в 99% этаноле при концентрации 10 мг/мл. 6-луночные планшеты для тканевых культур покрывали 0,5 мл раствора ПГЭМА, оставляли высыхать, промывали PBS и хранили при 4°C. Клетки C-33a\_CA IX (400000 клеток/лунку) добавляли в лунки, покрытые ПГЭМА, и культивировали в присутствии или в отсутствие гуманизованного варианта антитела CA9hu-2\_НC4LC5 (30 мкг/мл) в течение 24 и 72 ч. Для оценки способности клеток C-33a\_CA IX образовывать многоклеточные агрегаты получали изображения обработанных и необработанных клеток и измеряли накопленную плотность пикселей с помощью программного обеспечения ImageJ. В конце более длительной обработки (72 ч) клетки C-33a\_CA IX выделяли, центрифугировали и затем анализировали с помощью проточной цитометрии с применением йодида пропидия для окрашивания мертвых клеток.

Многоклеточная агрегация раковых клеток во время отсоединения внеклеточного матрикса (ECM) представляет собой эффективный механизм ингибирования апоптоза. На фиг. 6 четко продемонстрировано, что гуманизованный вариант антитела по изобретению ингибирует способность клеток C-33a\_CA IX образовывать многоклеточные агрегаты в условиях отсоединения на покрытых ПГЭМА чашках.

Для подтверждения повышенной чувствительности клеток C-33a\_CA IX к апоптозу после обработки гуманизованным антителом, проводили проточную цитометрию и окрашивание йодидом пропидия.

На фиг. 7 показано, что гуманизованный вариант антитела CA9hu-2\_НC4LC5, влияет на жизнеспособность обработанных клеток C-33a\_CA IX через 72 ч в условиях отсоединения. Процент мертвых клеток, обработанных CA9hu-2\_НC4LC5, составил 35,1%. Только 15,7% мертвых клеток наблюдались в случае клеток C-33a\_CA IX без обработки антителами ("отрицательный контроль").

Вышеприведенные данные демонстрируют способность гуманизованного антитела по изобретению ингибировать многоклеточную агрегацию экспрессирующих CA IX раковых клеток C-33a (в условиях отсоединения) и впоследствии повышать их чувствительность к апоптозу. Этот механизм действий представляет собой исключительно полезное свойство. Кроме того, CA9hu-2\_НC4LC5 снижал жизнеспособность обработанных клеток, а процент мертвых клеток, культивируемых в присутствии гуманизованного антитела, был выше по сравнению с контрольными клетками.

Пример 10. Влияние гуманизованного антитела на протеом/секретом, а также транскриптом пораженных клеток.

Этот пример демонстрирует неожиданные свойства гуманизованного антитела влиять на цитокиновый профиль, а также экспрессию белков, ответственных за уклонение от противоопухолевого иммунитета.

Влияние гуманизованных вариантов антител на цитокиновый профиль *in vitro* анализировали с помощью цитокинового анализа Proteome Profiler Array (PPA; R&D Systems, Inc.). PPA является быстрым, чувствительным и экономическим инструментом для одновременного обнаружения различий в цитокинах между образцами на нитроцеллюлозных мембранах. Цитокиновый анализ PPA проводили с применением клеточной линии ТНРМЖ ВТ-20, инкубированной в условиях гипоксии в течение 72 ч в соответствии с инструкциями производителя. Клетки ВТ-20 высевали на 12-луночный планшет (200000 клеток/лунку) и инкубировали в присутствии или в отсутствие гуманизованного антитела CA9hu-2\_НC4LC5 (50 мкг/мл). Затем получали и анализировали клеточные лизаты (ВТ-20\_протеом), а также супернатанты клеточной культуры (ВТ-20\_секретом). Разбавленные образцы инкубировали с мембранами PPA в течение ночи, промывали (для удаления несвязанного материала) и инкубировали с коктейлем биотинилированных детектирующих антител. Затем применяли и разрабатывали стрептавидин-HRP (стрептавидин, конъюгированный с пероксидазой) и хемилюминесцентные детектирующие реагенты. Сигнал получали в каждой фиксированной области, соответствующей количеству связанного белка. Плотности пикселей на разработанных рентгеновских пленках собирали и анализировали с помощью программного обеспечения ImageJ 1.38x. Определяли средний сигнал (плотность пикселей) пары повторяющихся областей, представляющих каждый образец, и затем из каждой области вычитали усредненный фоновый сигнал. Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом (Табл. 9).

Табл. 9. Цитокиновый анализ Proteome Profiler VEGF и IL-8 в клеточных лизатах клеток ВТ-20 (ВТ-20\_протеом), а также культуральной среде клеток ВТ-20 (ВТ-20\_секретом) после обработки гуманизованным антителом CA9hu-2\_НC4LC5 в течение 72 ч в гипоксических условиях. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизованных антител, обозначены как "без Ab". Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом.

Таблица 9

|                 | BT-20_протеом |      | BT-20_секретом |      |
|-----------------|---------------|------|----------------|------|
|                 | VEGF          | IL-8 | VEGF           | IL-8 |
| без Ab          | 1             | 1    | 1              | 1    |
| CA9hu-2_ HC4LC5 | 0,83          | 0,59 | 0,86           | 0,68 |

Как и ожидалось, цитокиновый анализ Proteome Profiler выявил несколько по-разному затронутых цитокинов (с повышающей или понижающей регуляцией), либо экспрессируемых (BT-20\_протеом), либо высвобождаемых (BT-20\_секретом). Экспрессия IL-8 и VEGF последовательно подавлялась в случае секретома, а также протеома, после инкубации клеток BT-20 в присутствии гуманизированного варианта антитела CA9hu-2\_ HC4LC5 (табл. 9).

Для подтверждения влияния гуманизированного антитела по изобретению на транскрипционный профиль обработанных клеток применяли количественную ПЦР в реальном времени с (кПЦР-РВ). Количественно определяли и анализировали экспрессию генов, кодирующих белки, ответственные за уклонение от противоопухолевого иммунитета, с помощью клеточной линии ТНРМЖ BT-20. Клетки BT-20, предварительно сформированные в сфероиды, сначала подвергали воздействию химиотерапевтического лекарственного средства, доксорубина (DOX; Sigma-Aldrich) в концентрации 1 мкМ в течение 4 дней с последующей 3-х дневной культивацией без DOX. Обработку гуманизированным вариантом антитела CA9hu-2\_ HC4LC5 (25 мкг/мл) проводили в течение всего периода времени (7 дней). При этом клетки BT-20 без предварительной обработки DOX подвергали воздействию гуманизированного антитела в течение 7 дней. Тотальную РНК экстрагировали с помощью TRIzol (ThermoFisher Scientific), а затем транскрибировали с помощью набора для обратной транскрипции кДНК с высокой емкостью (Applied Biosystems, Foster City CA, США). Количественную ПЦР проводили на системе ПЦР в реальном времени StepOne (Applied Biosystems) с применением Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и генспецифичных праймеров для CD47 и лиганда программируемой клеточной смерти 1 (PD-L1), а также праймеров для  $\beta$ -актина, которые служили в качестве внутреннего контроля.

Праймеры были следующие:

смысловой CD47: 5'-AGAAGGTGAAACGATCATCGAGC-3' (SEQ ID NO. 31) и антисмысловой CD47: 5'-CTCATCCATACCACCGGATCT-3' (SEQ ID NO. 32); смысловой PD-L1: 5'-TGGCATTGCTGAACGCATTT-3' (SEQ ID NO. 33) и антисмысловой PD-L1: 5'-AGTGCAGCCAGGTCTAATTGT-3' (SEQ ID NO. 34); смысловой  $\beta$ -актина: 5'-CCAACCGCGAGAAGATGACC-3' (SEQ ID NO. 35) и антисмысловой  $\beta$ -актина: 5'-GATCTTCATGAGTAGTCAGT-3' (SEQ ID NO. 36).

Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом (табл. 10).

Табл. 10. Анализ кПЦР-РВ уровней экспрессии CD47 и PD-L1 после обработки гуманизированным антителом CA9hu-2\_ HC4LC5 в течение 7 дней. Доксорубин в качестве химиотерапевтического лекарственного средства либо добавляли (DOX+), либо не добавляли (DOX-) в течение первых четырех дней лечения. Раковые клетки, инкубированные в отсутствие гуманизированных антител, обозначены как "без Ab". Результаты выражены как кратность изменения после обработки антителом.

Таблица 10

|                      | CD47          |       | PD-L1         |       |
|----------------------|---------------|-------|---------------|-------|
|                      | Среднее       | CO    | Среднее       | CO    |
| DOX-/без Ab          | 1 (100%)      | 0,426 | 1 (100%)      | 0,179 |
| DOX-/CA9hu-2_ HC4LC5 | 1,042(104,2%) | 0,037 | 0,891 (89,1%) | 0,042 |
| DOX+/без Ab          | 2,249 (100%)  | 0,033 | 4,940 (100%)  | 0,071 |
| DOX+/CA9hu-2_ HC4LC5 | 1,533 (68,2%) | 0,237 | 3,011 (60,9%) | 0,026 |

Как показано в табл. 10, анализ кПЦР-РВ тотальной РНК, выделенной из клеток BT-20, обработанных гуманизированным вариантом антитела CA9hu-2\_ HC4LC5 в течение 7 дней, выявил снижение экспрессии CD47, а также PD-L1. Понижающая регуляция обеих мРНК была более очевидной в клетках BT-20, подвергшихся воздействию доксорубина (DOX+), и приводила к снижению экспрессии PD-L1 и CD47 почти на 40% и более чем на 30% после обработки гуманизированным антителом CA9hu-2\_ HC4LC5, соответственно.

Вышеприведенные данные демонстрируют способность гуманизированного антитела CA9hu-2\_ HC4LC5 влиять на цитокиновый профиль раковых клеток. VEGF и IL-8 являются двумя мощными

ангиогенными факторами, секретируемыми клетками рака молочной железы, которые способствуют созданию и расширению неоваскуляризации опухоли. Ангиогенез имеет решающее значение для прогрессирования опухоли, и проангиогенные молекулы, такие как VEGF и IL-8, были исследованы в качестве потенциальных мишеней для терапии рака. Учитывая тот факт, что лечение клеток ТНPMЖ гуманизированным антителом по изобретению обладает способностью индуцировать некоторые косвенные эффекты, например, подавление экспрессии VEGF и IL-8, авторы изобретения предполагают, что терапия, нацеленная на СА IX, может принести дополнительную терапевтическую пользу для пациентов.

Способность раковых клеток уклоняться от иммунной системы (как врожденные, так и адаптивные ответы) играет решающую роль в рецидиве и метастазировании рака. CD47 представляет собой белок клеточной поверхности, который взаимодействует с сигнальным регуляторным белком а на макрофагах для блокирования фагоцитоза. Его экспрессия представляет собой основной механизм, опосредующий уклонение раковых клеток от врожденного иммунитета. PD-L1, также известный как CD274, представляет собой трансмембранный белок, обычно экспрессируемый на поверхности антигенпрезентирующих клеток и опухолевых клеток. PD-L1 специфически связывается со своим рецептором PD-1, который экспрессируется на поверхности иммуннородственных лимфоцитов. Прекращения взаимодействия PD-L1/PD-1 приводит к активации, пролиферации, образованию цитокинов и элиминации раковых клеток. Следовательно, подавление экспрессии опухолевого PD-L1 и CD47 в подвергающихся химиотерапии раковых клетках, обработанных гуманизированным антителом по изобретению, может приводить к ингибированию роста раковых клеток и, более того, представлять собой неожиданное свойство гуманизированных антител по изобретению. Кроме того, координатное ингибирование экспрессии PD-L1 и CD47 в ответ на обработку гуманизированными антителами клеток BT-20, подвергшихся воздействию доксорубина, обеспечивает обоснование для объединения химиотерапии и антител к СА IX по изобретению для улучшения исхода у онкологических пациентов.

В заключение, было продемонстрировано, что гуманизированные антитела по изобретению сохраняют антигенсвязывающую специфичность и обладают эффекторными функциями (ADCC, CDC, ADCP). Кроме того, желательную безопасность применения гуманизированных антител определяли с помощью анализа высвобождения цитокинов с применением свежих образцов цельной крови от 20 доноров. Было доказано исключительное полезное свойство, например, ингибирование инвазии раковых клеток, которое представляет собой важный механизм действия для терапии онкологических пациентов. Что более важно, в анализе многоклеточной агрегации в условиях отсоединения и в анализе протеома, секретома и транскриптома обработанных раковых клеток с применением анализа Proteome Profiler и кПЦР-РВ были выявлены неожиданные и исключительные свойства гуманизированных антител. В заключении, это первое описание и демонстрация неожиданных полезных влияний гуманизированных антител, направленных против домена PG СА IX, и, таким образом, гуманизированные антитела по изобретению являются новыми и обладают изобретательским уровнем в свете предшествующего уровня техники.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, специфически распознающее протеогликановый домен СА IX человека, содержащее последовательность варибельной области тяжелой цепи, содержащую последовательности

CDR GFTFNTNAMH (SEQ ID NO. 1), и  
RIRSKSNNYTTYADSVKD (SEQ ID NO. 2), и  
VCGSWFAY (SEQ ID NO. 3), и

последовательность варибельной области легкой цепи, содержащую последовательности  
CDR KSSQSLNNSNQKNYLA (SEQ ID NO. 4) и FTSTRQS (SEQ ID NO. 5) и QQHYSIPLT  
(SEQ ID NO. 6).

2. Гуманизированное антитело по п.1, содержащее по меньшей мере одну варибельную область, выбранную из группы, состоящей из

варибельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательность  
 $X^{32}VQLVESGGGX^{33}VQPGX^{34}SLX^{35}LSCAASGFTFNTNAMHWVRQAX^{36}GX^{37}GLEWVX^{38}$   
RIRSKSNNYTTYADSVKDRFTISRDX<sup>39</sup>SKX<sup>40</sup>TX<sup>41</sup>YLQX<sup>42</sup>NSLX<sup>43</sup>X<sup>44</sup>EDTAVYYCVC  
WFAYWGQGT<sup>45</sup>VTVSS (SEQ ID NO. 7),

где

$X^{32}$  представляет собой E или Q,

$X^{33}$  представляет собой L или V,

$X^{34}$  представляет собой G или R,

$X^{35}$  представляет собой K или R,

$X^{36}$  представляет собой S или P,

X<sup>37</sup> представляет собой К или R,  
 X<sup>38</sup> представляет собой А или G,  
 X<sup>39</sup> представляет собой D или N,  
 X<sup>40</sup> представляет собой N или S,  
 X<sup>41</sup> представляет собой А или L,  
 X<sup>42</sup> представляет собой M или V,  
 X<sup>43</sup> представляет собой К или R,  
 X<sup>44</sup> представляет собой Т или А,  
 X<sup>45</sup> представляет собой L или Т; и

вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательность

DX<sup>46</sup>X<sup>47</sup>MTQSPDSLAVSLGERX<sup>48</sup>TINCKSSQSLNSSNQKNYLAWX<sup>49</sup>QQKPGQX<sup>50</sup>PX<sup>51</sup>X<sup>52</sup>X<sup>53</sup>IYFTSTRQSGVPDRFX<sup>54</sup>GSGSGTDFTLTX<sup>55</sup>SLQAEDVAVYX<sup>56</sup>CQQHYSIPLTFGQG

TX<sup>57</sup>X<sup>58</sup>EIK (SEQ ID NO. 8)

X<sup>46</sup> представляет собой V или I,  
 X<sup>47</sup> представляет собой V или Q,  
 X<sup>48</sup> представляет собой V или A,  
 X<sup>49</sup> представляет собой Y или F,  
 X<sup>50</sup> представляет собой S или P,  
 X<sup>51</sup> представляет собой К или N,  
 X<sup>52</sup> представляет собой L или V,  
 X<sup>53</sup> представляет собой L или V,  
 X<sup>54</sup> представляет собой S или Т,  
 X<sup>55</sup> представляет собой S или N,  
 X<sup>56</sup> представляет собой Y или F,  
 X<sup>57</sup> представляет собой К или Q,  
 X<sup>58</sup> представляет собой L или V.

3. Гуманизированное антитело по п.2, содержащее по меньшей мере одну вариабельную область, выбранную из группы, состоящей из

а) аминокислотной последовательности вариабельной области тяжелой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLT  
 VSS (SEQ ID NO. 9),

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDDSKSTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLT  
 VSS (SEQ ID NO. 10),

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGRGLEWVARIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQVNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLT  
 VSS (SEQ ID NO. 11),

EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFNTNAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVCGSWFAYWGQGLT  
 VSS (SEQ ID NO. 12) и

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTNAMHWVRQASGKGLEWVGRIRSKSNN  
YTTYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVCGSWFAYWGQTTVT  
 VSS (SEQ ID NO. 13)

и

б) аминокислотной последовательности вариабельной области легкой цепи, содержащей или имеющей последовательности, выбранные из группы, состоящей из

DVVMTQSPDSLAVSLGERVTINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFTSTR  
 RQSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID  
 NO. 14),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPNLVIYFTSTR  
 QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK (SEQ ID  
 NO. 15),

DIQMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTR  
 QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYFCQQHYSIPLTFGQGTQVEIK (SEQ ID  
 NO. 16),

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWFQQKPGQPPKLLIYFTSTR  
 QSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID  
 NO. 17) и

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYFTSTR  
 QSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSIPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID  
 NO. 18).

4. Гуманизированное антитело по п.3, где указанное гуманизированное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 11 и SEQ ID NO. 12, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO. 14, SEQ ID NO. 15 и SEQ ID NO. 18.

5. Гуманизированное антитело по п.4, где указанное гуманизированное антитело содержит аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 12, и аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи, содержащую или имеющую последовательность SEQ ID NO. 18.

6. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-5, которое имеет константные области тяжелых цепей IgG человека аллотипа G1m17,1 и константные области легких цепей каппа человека аллотипа Km3.

7. Фармацевтическая композиция, содержащая терапевтически эффективное количество гуманизированного антитела по любому из пп.1-6, которое специфически распознает СА IX человека, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.

8. Композиция по п.7, предназначенная для лечения заболевания или расстройства, выбранного из клеточного пролиферативного заболевания или расстройства, при этом предпочтительно указанное заболевание или расстройство представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из сквамозно-клеточной карциномы, миеломы, мелкоклеточного рака легкого, немелкоклеточного рака легкого, глиомы, лимфомы Ходжкина, неходжкинской лимфомы, острого миелоидного лейкоза, множественной миеломы, рака желудочно-кишечного тракта, почечно-клеточного рака, рака яичников, рака печени, лимфобластного лейкоза, лимфоцитарного лейкоза, колоректального рака, рака эндометрия, рака почки, рака предстательной железы, рака щитовидной железы, меланомы, хондросаркомы, нейробластомы, рака поджелудочной железы, мультиформной глиобластомы, рака шейки матки, рака головного мозга, рака желудка, рака мочевого пузыря, гепатомы, рака молочной железы, рака толстой кишки, мезотелиомы и рака головы и шеи.

9. Композиция по п.8, предназначенная для лечения рака молочной железы, мезотелиомы или глиобластомы, экспрессирующих СА IX.

10. Способ лечения клеточного пролиферативного заболевания или расстройства, включающий введение гуманизированного антитела по любому из пп.1-6 или фармацевтической композиции по п.8 или 9, где еженедельная доза гуманизированного антитела к СА IX составляет 0,001-15 мг/кг массы тела.

11. Способ по п.10, в котором режим дозирования включает

i) многократные, идентичные или различные дозы гуманизированного антитела,  
 ii) многократные возрастающие дозы гуманизированного антитела или  
 iii) дозу гуманизированного антитела один раз в неделю, один раз в 2 недели, один раз в 3 недели, один раз в 4 недели или один раз в 5 недель.

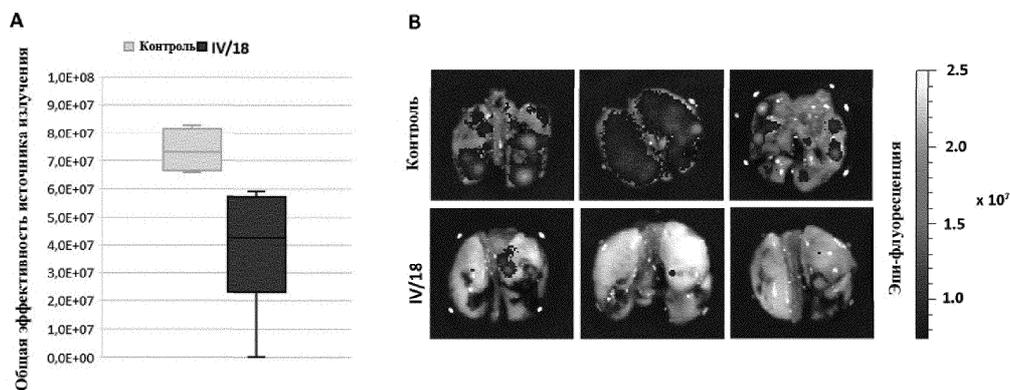
12. Способ по п.11, в котором режим дозирования содержит 1-10 циклов введения, причем каждый цикл включает 2-5 инфузий/доз с гуманизированным антителом каждые 1-4 недели с последующим перерывом в 1-8 недель между каждыми двумя циклами.

13. Диагностическая композиция для диагностики заболевания или расстройства, связанного с экс-

прессией белка CA IX, содержащая по меньшей мере одно гуманизованное антитело по любому из пп.1-6 и по меньшей мере один носитель, разбавитель или эксципиент.

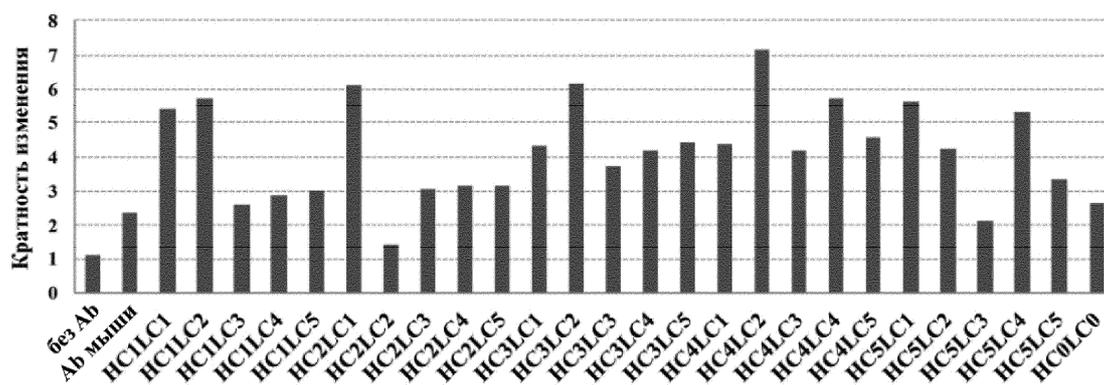
14. Способ диагностики рака у субъекта, нуждающегося в этом, включающий приведение в контакт биологического образца, происходящего из или полученного от указанного субъекта, с диагностической композицией по п.13, при этом образование комплекса свидетельствует о наличии рака у указанного субъекта.

15. Способ диагностики рака у субъекта по п.14, в котором гуманизованное антитело по любому из пп.1-6 соединено, связано или конъюгировано с парамагнитным, радиоактивным или флуорогенным фрагментом, который может быть обнаружен при визуализации.

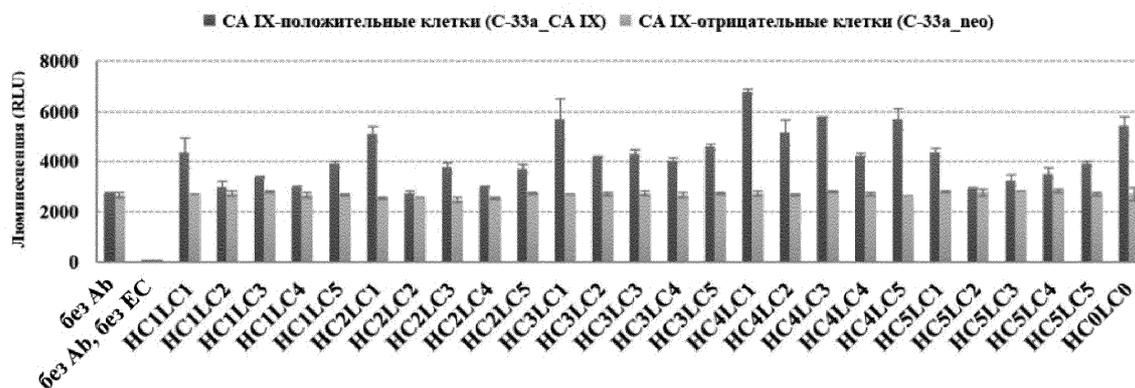


Фиг. 1

## CA9hu-2

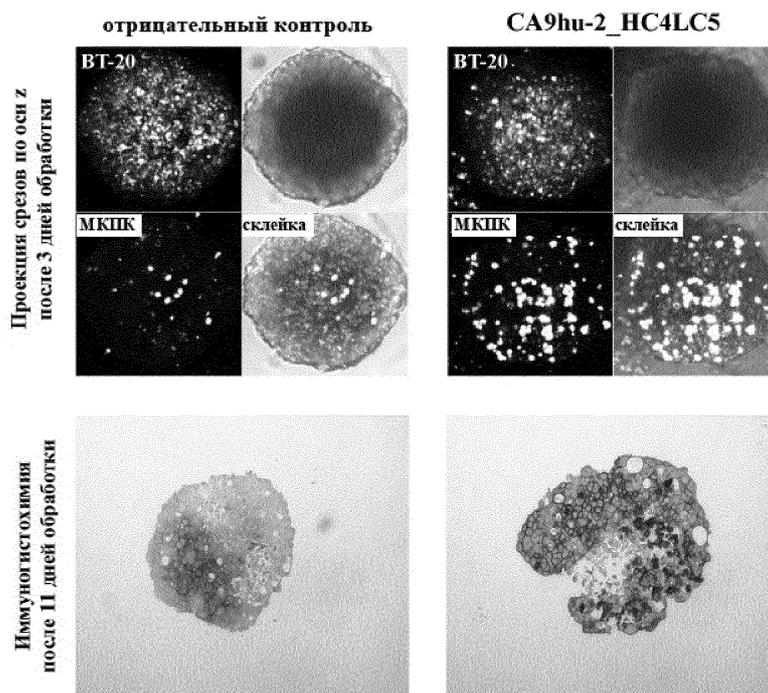


Фиг. 2

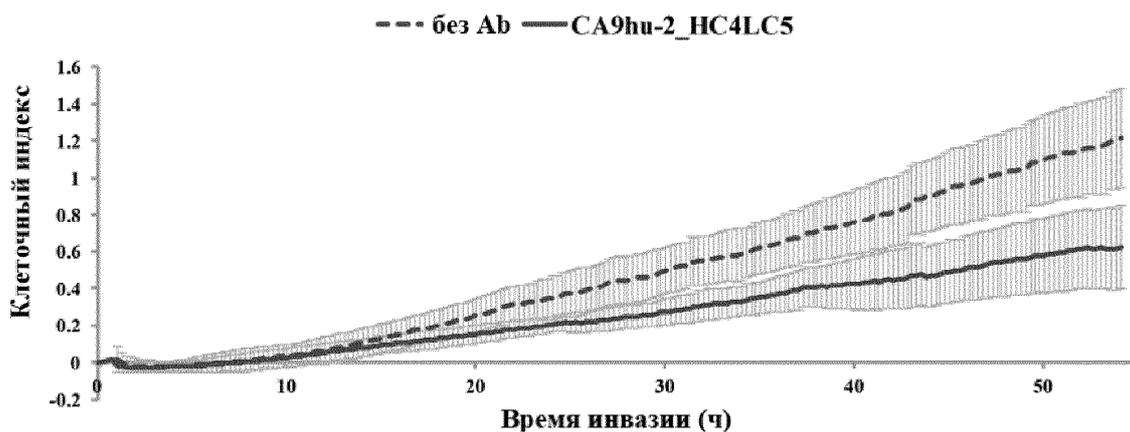


## CA9hu-2

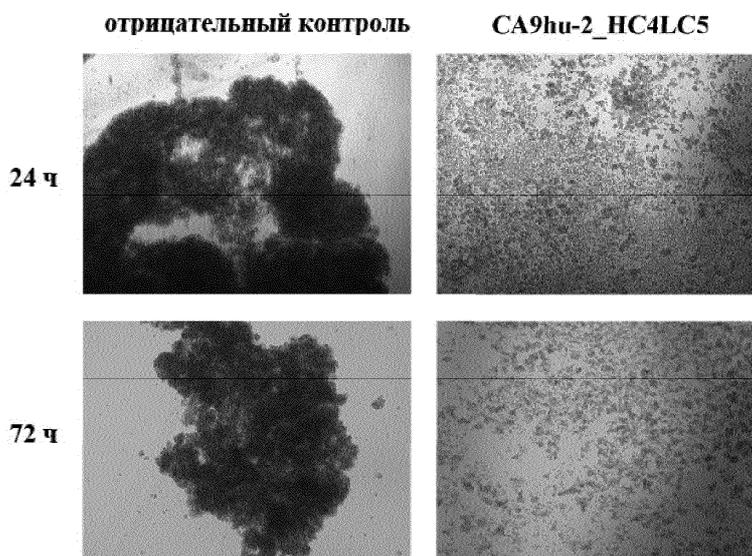
Фиг. 3



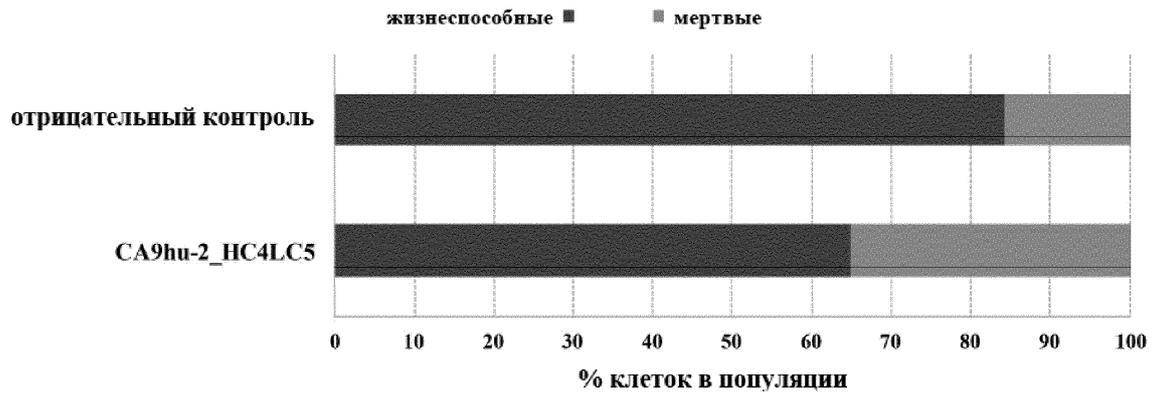
Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6



Фиг. 7

