

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392749 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.17

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2022.03.31

(54) КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА ПРОТИВ НЕКТИНА-4 И ЭКСАТЕКАНА

(31) 21166441.2; 21170941.5; 21172723.5;
21209332.2

(72) Изобретатель:
Эландс Джэк (BE), Лоспис Флоранс,
Превий Ксавье, Олив Даниель, Лопес
Марк (FR)

(32) 2021.03.31; 2021.04.28; 2021.05.07;
2021.11.19

(33) EP

(74) Представитель:
Фелицына С.Б. (RU)

(86) PCT/EP2022/058629

(87) WO 2022/207825 2022.10.06

(71) Заявитель:

ИМЁРДЖЕНС ТЕРАПЬЮТИКС АГ
(DE); ЮНИВЕРСИТЕ Д'Э-МАРСЕЙ;
ИНСЕРМ (ЭНСТИТИО НАСЪОНАЛЬ
ДЕ ЛЯ САНТЭ Э ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
МЕДИКАЛЬ); ЭНСТИТИО ЖАН
ПАОЛИ Э ИРЕН КАЛЬМЕТ; САНТР
НАСЪОНАЛЬ ДЕ ЛЯ РЕШЕРШ
СЪЕНТИФИК-СНРС (FR)

(57) Настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4 и где лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы I, в частности эксатекан.

A1

202392749

202392749

A1

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА ПРОТИВ НЕКТИНА-4 И ЭКСАТЕКАНА

Настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4 и в котором лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы I, в частности эксатекан или дерукстекан.

Предшествующий уровень техники

Нектины - это молекулы адгезии, которые помогают организовать эпителиальные и эндотелиальные контакты и служат в качестве рецепторов для проникновения вируса простого герпеса, вируса кори и полиовируса.

Нектины принадлежат к суперсемейству иммуноглобулинов и являются гомологами рецептора полиовируса (PVR/CD155), и по этой причине их также называют белками, связанными с рецептором полиовируса (PRR). На сегодняшний день было описано 5 членов: PVR/CD155, нектин-1/PRR1/CD111, нектин-2/PRR2/CD112, нектин-3/PRR3 и нектин-4/PRR4(1,10-13). Их эктодомен состоит из трех иммуноглобулиноподобных (Ig) доменов типа V, C, C, которые имеют от 30 до 55% идентичности в своих аминокислотных последовательностях.

Экспрессия молекул нектина/PRR, как правило, широко распространена в тканях, включая гемопоэтические, нейрональные, эндотелиальные и эпителиальные клетки, за исключением нектина-3 и -4, которые демонстрируют более ограниченные профили экспрессии.

Нектин-4 является особенно интересной мишенью. Он экспрессируется во время внутриутробного развития, но его экспрессия снижается и очень ограничена во взрослых тканях по сравнению с другими представителями семейства нектинов. Нектин-4 является опухоль-ассоциированным антигеном в 83% случаев рака мочевого пузыря, 78% случаев рака молочной железы (в основном трижды негативного и ERBB2+), 71% случаев рака поджелудочной железы, 55% случаев рака легких, 57% случаев рака яичников, 59% случаев рака головы и шеи и 55% случаев рака пищевода.

Экспрессия нектина-4 при этих патологиях связана с плохим прогнозом, вероятно, потому, что нектин-4 может придавать опухолевым клеткам *in vitro* более высокие способности к миграции, пролиферации и метастазированию.

В нормальных тканях нектин-4 обнаруживается только в коже, слюнных железах, мочевом пузыре и пищеводе. Недавнее одобрение органами здравоохранения препарата Энфортумаб ведотин для терапии 2-й линии распространенного уротелиального рака

завершило валидацию нектина-4 в качестве мишени для лечения рака.

Изложение сущности изобретения

Первым аспектом настоящего изобретения является конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в котором моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4 и в котором лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы I, в частности эксатекан или дерукстекан.

Другим аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, включающая активный агент, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4 и где лекарственное средство представляет собой ингибитор топоизомеразы I, в частности, эксатекан, и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

Другим аспектом настоящего изобретения является применение конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, как описано выше, в медицине, в частности в медицине для человека.

Другим аспектом настоящего изобретения является применение конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, как описано выше, в способе профилактики и/или лечения расстройства, связанного с нектином-4, в частности, для профилактики и/или лечения нектин-4-позитивного рака.

Другим аспектом настоящего изобретения является применение конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, как описано выше, в способе профилактики и/или лечения рака, в частности, для профилактики и/или лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, рака печени, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичников, рака головы и шеи и/или рака пищевода.

Другим аспектом настоящего изобретения является способ профилактики и/или лечения расстройства, ассоциированного с нектином-4, в частности, профилактики и/или лечения нектин-4-позитивного рака, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, описанной выше.

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является способ профилактики

и/или лечения рака, в частности, профилактики и/или лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, рака печени, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичника, рака головы и шеи, и/или рака пищевода, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, терапевтически эффективного количества конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции, как описано выше.

Подробное описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что конъюгаты антител против нектин-4 с ингибиторами топоизомеразы-I, такими как эксатекан, демонстрируют улучшенную противораковую активность по сравнению с коммерческим антителом энфортумабом ведотином, которое представляет собой конъюгат антитела против нектин-4 и монометилауристатина Е (ММАЕ). Соответственно, конъюгаты антител против нектин-4 по изобретению позволяют улучшить лечение расстройств, связанных с нектин-4, таких как нектин-4-позитивный рак.

В конкретных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению включает новое антитело к нектину-4, которое специфически связывается с нектин-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектин-4, экспрессируемым кератиноцитами человека, например, дифференцированными кератиноцитами, экспрессирующими нектин-4 *in vitro*. Предпочтительными примерами являются моноклональные антитела (мАт) 15A7.5, 9A2.7, 3A1.4 и/или 8F06.

В частности, предпочтительным примером является моноклональное антитело (мАт) 15A7.5 или антитело, полученное из него. *In vitro* эта селективность обеспечивает мАт 15A7.5 с более низкой аффинностью связывания, интернализацией и/или цитотоксической активностью по отношению к кератиноцитам по сравнению с опухолевыми клетками и по сравнению с активностью мАт HA22 (Энфортумаб) в тех же анализах.

В частности, конъюгат по настоящему изобретению содержит гуманизированное антитело, которое происходит из моноклонального антитела против нектин-4 15A7,5 мАт.

In vivo эта низкая способность к связыванию с кератиноцитами обеспечивает мАт 15A7.5 с более высоким периодом полужизни из-за более низкой скорости абсорбции в коже.

На мышинной модели ксенотрансплантата лечение развитых опухолей путем

однократного внутривенного введения 4 мг/кг мАт, конъюгированного с эксатеканом, привело к быстрой и длительной регрессии.

Более конкретно, авторы изобретения демонстрируют, что в такой конфигурации конъюгат антитело-эксатекан является более эффективным, чем заменитель энфортумаба ведотина, т.е. продукт энфортумаб ведотин, изготовленный с использованием методов, отличных от GMP, третьей стороной, который неотличим от коммерчески доступного энфортумаба ведотина.

Антитела

Антитела из конъюгатов по изобретению представляют собой моноклональные антитела (мАт) или фрагменты моноклональных антител, характеризующиеся специфической аминокислотной последовательностью. Если не указано иное, термин «моноклональный» относится к одному виду, т.е. к одному аминокислотному составу антител или фрагментов антител.

Представленные в настоящей заявке антитела демонстрируют предпочтительно специфическое связывание с нектином-4 и отсутствие существенной перекрестной реактивности с другими белками семейства нектинов человека, в частности с нектином-1 и/или нектином-4 грызунов, таким как нектин-4 крысы и/или мыши.

Антигенсвязывающий участок антитела по изобретению содержит переменные домены/области тяжелой цепи (VH) и/или переменные домены/области легкой цепи (VL) антитела, или пары VH/VL.

Термин «антигенсвязывающий участок» обозначает область (области) молекулы антитела, с которой лиганд (например, антиген, т.е. нектин-4, или его антигенный фрагмент) фактически связывается, и которая является производной от антитела.

Переменные домены/области обозначают каждую из пар легких и тяжелых цепей, которые непосредственно участвуют в связывании антитела с антигеном. Переменный домен тяжелой цепи сокращенно обозначается как «VH», а переменный домен легкой цепи сокращенно обозначается как «VL».

Антигенсвязывающий участок антитела по изобретению может содержать шесть гиперпеременных областей (CDR), которые в различной степени способствуют аффинности участка связывания к антигену. Существует три CDR переменного домена тяжелой цепи (CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3) и три CDR переменного домена легкой цепи (CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3). Также в объем изобретения включены функциональные участки связывания антигена, состоящие из меньшего количества CDR (т.е. там, где специфичность связывания определяется тремя, четырьмя или пятью CDR). Например, для связывания может быть достаточно менее полного набора из 6 CDR. В

некоторых случаях будет достаточно домена VH или VL.

Согласно настоящему изобретению, область VH или ее CDR сами по себе могут представлять собой полный антигенсвязывающий участок. В определенных вариантах осуществления антитело содержит область VH или ее CDR, как определено здесь отдельно. В других вариантах осуществления антитело содержит область VH или ее CDR, как определено здесь, вместе с областью VL или ее CDR, в частности, с областью VL или ее CDR, как определено здесь.

Положение CDR в области VH или VL может быть определено в соответствии с системой нумерации Kabat, et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) или системой нумерации IMGT, обе из которых известны специалистам в данной области техники. Нумерация IMGT была определена для сравнения переменных доменов независимо от рецептора антигена, типа цепи или вида (Lefranc M.-P., «Unique database numbering system for immunogenetic analysis» *Immunology Today*, 18, 509 (1997); Lefranc M.-P., «The IMGT unique numbering for Immunoglobulins, T cell receptors and Ig-like domains» *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999)). Если не указано иное, в настоящей заявке используется система Kabat.

Используемые в настоящей заявке термины «связывание» и «специфическое связывание» относятся к связыванию антитела по изобретению или его фрагмента с эпитопом антигена нектин-4. Мера силы связывания антитела называется аффинностью. Способы определения такого связывания и/или аффинности с использованием анализов *in vitro* известны специалисту в данной области техники. В соответствии с настоящим изобретением в настоящей заявке описаны и, в частности, являются предпочтительными детекция с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции.

Аффинность связывания антитела с антигеном определяется терминами K_a (константа скорости ассоциации антитела из комплекса антитело/антиген), K_D (константа диссоциации) и K_{dis} (kD/ka).

В некоторых вариантах осуществления антитело из конъюгата по изобретению может представлять собой химерное антитело, мультиспецифическое антитело, в частности биспецифическое антитело, человеческое антитело, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Согласно настоящему изобретению, «химерное» антитело относится к антителу, в котором часть тяжелой и/или легкой цепи получена из определенного источника или вида, в то время как остальная часть тяжелой и/или легкой цепи получена из другого источника или вида.

«Мультиспецифические антитела» связывают два или более различных эпитопа. Эпитопы могут быть на одних и тех же или разных антигенах. Предпочтительным примером мультиспецифического антитела является «биспецифическое антитело», которое связывает два разных эпитопа.

В предпочтительных вариантах осуществления антитело по изобретению представляет собой гуманизованное антитело.

Термин «гуманизованное антитело» или «гуманизованная версия антитела» относится к антителам, для которых как тяжелые, так и легкие цепи гуманизованы в результате инженерии антител. Гуманизованная цепь обычно представляет собой цепь, в которой аминокислотная последовательность V-области была изменена таким образом, что при анализе в целом она ближе по гомологии к последовательности зародышевой линии человека, чем к последовательности зародышевой линии вида, из которого она происходит. Например, мышиная CDR может быть привита в каркасную область человеческого антитела для получения «гуманизованного антитела». См., например, Riechmann, L., et al., *Nature* 332 (1988) 323-327; and Neuberger, M. S., et al., *Nature* 314 (1985) 268-270. Другими формами гуманизованных антител, охватываемыми настоящим изобретением, являются те, в которых константная область была дополнительно модифицирована или изменена по сравнению с таковой у исходного антитела для получения свойств в соответствии с изобретением. Оценка гуманизации основана на полученной аминокислотной последовательности, а не на методологии как таковой.

Другой предпочтительный вариант осуществления относится к конъюгатам, включающим человеческие антитела.

Используемый в настоящей заявке термин «человеческое антитело» предназначен для включения антител, имеющих переменные и константные области, полученные из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Антитела человека хорошо известны на современном уровне техники (van Dijk, M. A., and van de Winkel, J. G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001) 368-374). Человеческие антитела также могут быть получены у трансгенных животных (например, мышей), которые после иммунизации способны продуцировать полный набор или избранную часть человеческих антител при отсутствии выработки эндогенного иммуноглобулина.

Антитело из конъюгата по настоящему изобретению может принадлежать к любому подходящему классу. Термин «класс» относится к типу константного домена или константной области, которой обладает его тяжелая цепь. Как используется здесь, «константный домен» или «константная область» обозначает сумму доменов антитела,

отличных от вариабельной области. Константная область непосредственно не участвует в связывании антигена, но проявляет различные эффекторные функции. Антитело может относиться к любому из пяти основных классов антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, или к любому их подклассу (изотипу), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам иммуноглобулинов, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Согласно настоящему изобретению, особенно подходящим является антитело класса IgG, IgA или IgM, или его фрагмент.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело из конъюгата по изобретению выбрано из класса IgG, например, подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, класса IgM, класса IgA или их антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит константный домен, в частности константный домен тяжелой цепи, более конкретно константный домен тяжелой цепи класса IgG, в частности класса IgG человека, например, подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, класса IgM, класса IgA, который имеет сниженную эффекторную функцию по сравнению с последовательностью дикого типа того же подкласса, например, который имеет сниженное связывание с Fc-рецептором. Примеры константных доменов тяжелой цепи со сниженными эффекторными функциями могут содержать по меньшей мере одну из мутаций D265C, L234A, L235A, P331S, L234Q и L235F человеческого IgG, например, последовательности IgG1 или IgG4.

«Антигенсвязывающий фрагмент» антитела относится к молекуле, содержащей часть интактного антитела, которая связывает антиген, с которым связывается интактное антитело. Примеры фрагментов антител включают, без ограничения указанными, Fv, Fab, Fab-SH, F(ab')₂; диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител (например, scFv); и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител. Термин также охватывает гибридный белок, например, белок, гибридный с неиммуноглобулиновым пептидом или полипептидом, и конъюгат с небелковой структурой, например, меткой или токсином. Термины «антигенсвязывающий фрагмент антитела», «его антигенсвязывающий фрагмент», «фрагмент антитела» или «его фрагмент» могут использоваться в настоящей заявке взаимозаменяемо.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть моно- или поливалентными, т.е. они могут содержать один антигенсвязывающий участок или множество антигенсвязывающих участков. Например, фрагменты Fab имеют один участок связывания с антигеном, антитела класса IgG или фрагменты Fv или scFv имеют два участка связывания с антигеном, а антитела класса IgM имеют 5 участков связывания с

антигеном. Термин «антитело» также охватывает гетероспецифические антитела, например, гетеро-биспецифические антитела, которые имеют разные участки связывания с антигеном, в частности антитела, которые направлены к двум разным эпитопам антигена. Используемый в настоящей заявке термин «эпитоп» означает область антигена, которая связана с антителом. Термин «эпитоп» включает любую полипептидную детерминанту, способную специфически связываться с антителом.

Опухоль-селективные антитела против нектин-4

В конкретном варианте осуществления антитело из конъюгата представляет собой опухоль-селективное антитело к нектину-4, которое специфически связывается с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым кератиноцитами человека, например, дифференцированными кератиноцитами, экспрессирующими нектин-4 *in vitro*, например, моноклональное антитело, полученное из моноклонального антитела (mAb) 15A7.5, 9A2.7, 3A1.4 и/или 8F06. Особенно предпочтительным является mAb 15A7.5.

Для сравнения, аффинность связывания может быть обнаружена с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции. Такое специфическое связывание обеспечивает, среди прочего, меньшие побочные эффекты во время лечения на основе антител по изобретению.

Соответственно, конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело 15A7.5, 9A2.7, 3A1.4 и/или 8F06 и, в частности, гуманизированный вариант, полученный из него, представляет собой новый способ улучшения терапевтического индекса лечения нектин-4-позитивного рака за счет снижения ассоциированной токсичности для кожи и более высокой противоопухолевой селективности и эффективности.

Опухоль-селективные антитела против нектин-4 и их антигенсвязывающие фрагменты предпочтительно демонстрируют константу диссоциации K_D , равную по меньшей мере 40, предпочтительно по меньшей мере 45, более предпочтительно по меньшей мере 50 и наиболее предпочтительно по меньшей мере 55 (нМ).

Помимо более низкой аффинности связывания, представленные здесь опухоль-селективные антитела и фрагменты также демонстрируют предпочтительно более низкую интернализацию и/или цитотоксическую активность по отношению к кератиноцитам по сравнению с опухолевыми клетками.

Согласно особо предпочтительному варианту осуществления, опухоль-селективные антитела и фрагменты проявляют более низкую аффинность связывания, более низкую интернализацию и более низкую цитотоксическую активность по отношению к кератиноцитам по сравнению с опухолевыми клетками.

Конечно, предпочтительным является специфическое связывание с нектином-4, экспрессируемым опухолями.

Согласно дополнительному аспекту, настоящее изобретение также относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, содержащему моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, характеризующийся связыванием с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым кератиноцитами человека. Для сравнения, аффинность связывания может быть определена с помощью проточной цитометрии, иммуногистохимии и/или флуоресценции.

В некоторых вариантах осуществления опухоль-селективное моноклональное антитело к нектину-4 или его антигенсвязывающий фрагмент включает

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую гиперпеременные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 1, 7, 88, 96 или 104,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 2, 8, 89, 97 или 105,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 3, 9, 90, 98 или 106,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(b) переменную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гиперпеременные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4, 10, 92, 100 или 108,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной

аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5, 11, 93, 101 или 109,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 6, 12, 94, 102 или 110,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот.

SEQ ID NO: 1-6 определяют шесть последовательностей CDR родительского антитела по изобретению 15A7.5 в соответствии с системой нумерации IMGT. SEQ ID NO: 7-12 определяют шесть последовательностей CDR родительского антитела по изобретению в соответствии с Kabat.

Конкретные аминокислотные последовательности для SEQ ID NO:, используемые в настоящей заявке, приведены в прилагаемом списке последовательностей.

SEQ ID NO: 88-95 характеризуют мАт 9A2.7.

SEQ ID NO: 96-103 характеризуют мАт 3A1.4.

SEQ ID NO: 104-111 характеризуют мАт 8F06.

Согласно настоящему изобретению, возможна замена или вставка по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот в этих последовательностях CDR. В конкретных вариантах осуществления предпочтительной является консервативная аминокислотная замена, т.е. замена аминокислоты другой аминокислотой с аналогичными биохимическими свойствами, т.е. замена алифатической аминокислоты, например, Gly, Ala, Val, Leu или Ile, на другую алифатическую аминокислоту, основной аминокислоты, например, His, Lys или Arg, на другую основную аминокислоту, кислой аминокислоты или ее амида, например, Asp, Glu, Asn или Gln, на другую кислую аминокислоту или ее амид, ароматической аминокислоты, например, Phe, Tyr или Trp, на другую ароматическую аминокислоту, или гидроксид- или серосодержащей аминокислоты, например, Ser, Thr, Met или Cys, на другую гидроксид- или серосодержащую аминокислоту. В других конкретных вариантах осуществления по меньшей мере одна аминокислота, например, 1 или 2 остатка гистидина, вставлена в одну или несколько последовательностей CDR, например, CDR1, CDR2 или CDR3 тяжелой цепи или легкой цепи. Это может привести к предпочтительному связыванию при низком pH, например,

pH между 5,5 и 6,5 по сравнению с нейтральным pH, например, pH от 7,0 до 7,5.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает в соответствии с системой нумерации IMGT

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO:1, CDR-H2 из SEQ ID NO:2 и CDR-H3 из SEQ ID NO:3, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO:4, CDR-L2 из SEQ ID NO:5 и CDR-L3 из SEQ ID NO:6.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает согласно Kabat

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO:7, CDR-H2 из SEQ ID NO:8 и CDR-H3 из SEQ ID NO:9, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO:10, CDR-L2 из SEQ ID NO:11 и CDR-L3 из SEQ ID NO:12.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO:88, CDR-H2 из SEQ ID NO:89 и CDR-H3 из SEQ ID NO:90, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO:92, CDR-L2 из SEQ ID NO:93 и CDR-L3 из SEQ ID NO:94.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO:96, CDR-H2 из SEQ ID NO:97 и CDR-H3 из SEQ ID NO:98, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 100, CDR-L2 из SEQ ID NO:101 и CDR-L3 из SEQ ID NO:102.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент включает

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 104, CDR-H2 из SEQ ID NO: 105 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 106, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO:108, CDR-L2 из SEQ ID NO: 109 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 110.

Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, 91, 99 или 107, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95%

или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14, 95, 103 или 111, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% более по всей длине последовательности.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:14, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать:

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 91 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 95 или аминокислотной последовательности, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать:

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 99 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 103 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей

мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать:

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 107 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 111, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности.

«Процент (%) идентичности аминокислотной последовательности» в отношении пептидной или полипептидной последовательности определяется как процент аминокислотных остатков в последовательности-кандидате, которые идентичны аминокислотным остаткам в конкретной пептидной или полипептидной последовательности, после выравнивания последовательностей и введения гэпов, при необходимости, для достижения максимальной процентной идентичности последовательностей. Выравнивание для целей определения процентной идентичности аминокислотных последовательностей может быть достигнуто различными способами, которые находятся в пределах компетенции рядового специалиста в данной области техники, например, с использованием общедоступного компьютерного программного обеспечения, такого как BLAST.

В конкретных вариантах осуществления гуманизированные или человеческие антитела по изобретению определяются комбинацией по меньшей мере 3, предпочтительно 6 гипервариабельных областей (CDR), т.е. относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21, 35, 49 или 63,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22, 36, 50 или 64,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23, 37, 51 или 65,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 38, 52 или 66,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, 39, 53 или 67,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26, 40, 54 или 68,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

Специфические гуманизированные или человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут включать

(a) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(b) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(c) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(d) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(e) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(f) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(g) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(h) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(j) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(k) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(l) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(m) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(n) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(o) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(p) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(q) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54.

В частности, предпочтительными являются гуманизированные антитела (a), (b), (c), (d), (j), (k), (n) и (q), как определено выше.

В конкретных вариантах осуществления гуманизированные или человеческие антитела по изобретению определяются комбинацией по меньшей мере 3, предпочтительно 6 гипервариабельных областей (CDR), т.е. относятся к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, включающим

(a) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 21, 35, 49 или 63,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22, 36, 50 или 64,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23, 37, 51 или 65,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот, и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 24, 38, 52 или 66,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, 39, 53 или 67,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26, 40, 54 или 68,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот.

Специфические гуманизированные или человеческие антитела согласно настоящему изобретению могут включать

(a) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(b) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(c) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(d) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(e) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(f) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(g) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 21, CDR-H2 из SEQ ID NO: 22 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 23,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(h) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(j) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54, или

(k) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 35, CDR-H2 из SEQ ID NO: 36, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 37,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(l) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(m) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(n) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 49, CDR-H2 из SEQ ID NO: 50 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 51,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 66, CDR-L2 из SEQ ID NO: 67 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 68, или

(o) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 24, CDR-L2 из SEQ ID NO: 25 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 26, или

(p) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 38, CDR-L2 из SEQ ID NO: 39 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 40, или

(q) (i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 63, CDR-H2 из SEQ ID NO: 64, и CDR-H3 из SEQ ID NO: 65,

и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO: 52, CDR-L2 из SEQ ID NO: 53 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 54.

В частности, предпочтительными являются гуманизированные антитела (a), (b), (c), (d), (j), (k), (n) и (q), как определено выше.

Конечно, гуманизированные или человеческие антитела по изобретению также могут быть определены по их областям VH и/или VL.

Такие антитела могут включать

(i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 27, 41, 55 или 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 42, 56, 70 или 71, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

Специфические гуманизированные или человеческие антитела по изобретению

могут быть определены по их областям VH и/или VL, причем такие антитела включают

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(b) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(c) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(d) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 71, или аминокислотную

последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(e) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с ИЗ SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(f) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(g) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 27, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 71, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(h) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную

последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(j) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(k) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 41, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 71, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(l) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(m) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(n) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 55, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 70 или 71, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

(o) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 28, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(p) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 42, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%, или

(q) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 69, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 56, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

В частности, предпочтительными являются гуманизированные антитела (a), (b), (c), (d), (j), (k), (n) и (q), как определено выше.

Дополнительные антитела против нектин-4

В дополнительном варианте осуществления антителом из конъюгата по изобретению является антитело 5A12.2 или его антигенсвязывающий фрагмент.

SEQ ID NO: 80-87 характеризуют мАт 5A12.2.

Согласно предпочтительному варианту осуществления, антитело 5A12.2 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

(i) область VH, содержащую CDR-H1 из SEQ ID NO: 80, CDR-H2 из SEQ ID NO: 81 и CDR-H3 из SEQ ID NO: 82, и при необходимости

(ii) область VL, содержащую CDR-L1 из SEQ ID NO:84, CDR-L2 из SEQ ID NO: 85 и CDR-L3 из SEQ ID NO: 86.

Согласно другому предпочтительному варианту осуществления, антитело 5A12.2 или его антигенсвязывающий фрагмент могут включать

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:83 или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности, и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:87, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99% по всей длине последовательности.

В дополнительном варианте осуществления антителом из конъюгата по изобретению является антитело HA22, которое является антителом из коммерческого конъюгата антитело-лекарственное средство Энфортумаб ведотин, или антителом, полученным из HA22.

HA22 представляет собой человеческое моноклональное антитело к нектину-4, описанное в WO2012/047724, содержание которого приведено здесь в качестве ссылки. Антитело HA22 или антитело, полученное из HA22, в частности, относится к антителу

IgG1, содержащему гаплотипическую последовательность тяжелой цепи G1m17 или G1m3, при необходимости с константной областью, имеющей пониженную эффекторную функцию, как описано выше, например, мутацию TM: P331S, L234Q и L235F, или мутацию LALA: L234A и L235A, и последовательность легкой цепи каппа. В частности, последовательность VH HA22 и ее константная область человеческого IgG1 показаны на фиг. 3А, а последовательность VL HA22 и ее константная область каппа человека показаны на фиг. 3В из WO 2012/047724.

В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело к нектину-4, полученное из HA22, или его антигенсвязывающий фрагмент определяются по его CDR-последовательностям и включают

(а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, в которой

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:72,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:73,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:74,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:75,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:76,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:77,

или аминокислотную последовательность, содержащую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот.

SEQ ID NO: 72-77 определяет шесть CDR-последовательностей родительского антитела HA22 в соответствии с системой нумерации IMGT.

В конкретных вариантах осуществления антитело, полученное из HA22, может быть определено по его областям VH и/или VL, причем такое антитело включает

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:78, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:79, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

В еще более конкретных вариантах осуществления антитело, полученное из HA22, включает

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:78, и

(ii) область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:79.

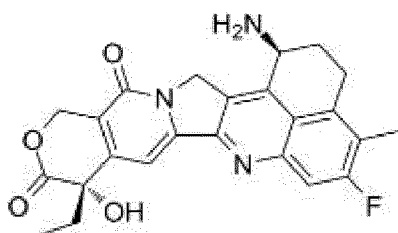
Ингибиторы топоизомеразы I

Лекарственным средством из конъюгата антител по изобретению является ингибитор топоизомеразы I. Ингибитор топоизомеразы I представляет собой соединение, которое способно формировать тройной комплекс с топоизомеразой I и ДНК, тем самым предотвращая повторное лигирование ДНК и вводя разрывы цепей ДНК в клеточный геном. Ингибитор топоизомеразы I может быть выбран, например, из камптотецина или

его аналогов, инденоизохинолинов и индолокарбазолов.

В конкретном варианте осуществления ингибитором топоизомеразы-I является камптотедин или его аналог, т.е. соединение, содержащее пентациклическую основную структуру камптотецина и модифицированные заместители, при необходимости приводящие к наличию дополнительного кольца. Конкретными примерами являются камптотекан, топотекан, иринотекан, SN-38, белотекан, эксатекан, включая их производные, такие как дерукстекан, люртотекан или атиратекан.

В конкретном варианте осуществления ингибитором топоизомеразы I является эксатекан:



Эксатекан обычно конъюгируют с антителом через его NH₂-группу.

Конъюгация

Ингибитор топоизомеразы-I, в частности эксатекан, ковалентно конъюгирован с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

В принципе, ингибитор топоизомеразы-I, например эксатекан, может быть конъюгирован с любым подходящим положением моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, в частности, с любым положением, которое не отменяет связывание антитела с нектином-4. Например, ингибитор топоизомеразы-I, например, эксатекан, может быть конъюгирован с реакционноспособным аминокислотным остатком на антителе, например, аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь, содержащую амино-, гидроксильную или тиольную группу, или реакционноспособную группу в структуре гликанов антитела. В конкретных вариантах осуществления ингибитор топоизомеразы-I, например, эксатекан, конъюгирован с реакционноспособной тиоловой группой в боковой цепи доступного остатка цистеина на антителе.

В определенных вариантах осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство имеет молярное соотношение лекарственное средство-антитело/фрагмент антитела (DAR), превышающее 1, т.е. к антителу/фрагменту антитела присоединено более одной молекулы лекарственного средства. Как правило, конъюгат имеет соотношение DAR от примерно 2:1 до примерно 16:1, в частности, от примерно 4:1 до примерно 10:1 и, более конкретно, от примерно 6:1 до примерно 8:1. Значение DAR может быть рассчитано на основе статистического распределения в соответствии с известными способами.

В некоторых вариантах осуществления ингибитор топоизомеразы-I конъюгируют с антителом или антигенсвязывающим фрагментом с помощью линкера. В некоторых вариантах осуществления линкер является расщепляемым линкером, т.е. линкером, расщепляемым в физиологических условиях, например, физиологическими ферментами. Конкретными примерами расщепляемых линкеров являются линкеры на основе пептидов, которые могут быть подвержены расщеплению протеазой, или линкеры на основе гликозидов, которые могут быть подвержены расщеплению гликозидазой.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер, например, как описано Conilh et al. "Exatecan antibody drug conjugates based on a hydrophilic polysarcosine drug-linker platform" (Pharmaceuticals 14 (2021), 247). Дополнительные предпочтительные линкеры включают линкеры, содержащие по меньшей мере одну этиленгликолевую единицу, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более единиц этиленгликоля, например, линкер конъюгата антитело-лекарственное средство MEDI7247, мсс-триазольный спейсер-PEG7-гликолевый линкер x-Lys-PAVC от Trodelvy®. Другие предпочтительные линкеры включают олигопептид, в частности ди-декапептид, например, тетрапептидные последовательности, такие как глицин-глицин-фенилаланин-глицин от Enhertu®. Дополнительные предпочтительные линкеры включают высокополярные спейсеры, такие как ацильная группа, карбамоильная группа и/или сульфамидная группа, добавляемые по меньшей мере к одной этиленгликолевой единице, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более единиц этиленгликоля, например, технологию линкеров под названием Hydraspace™.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий, например, до 15 единиц саркозина и по меньшей мере одну единицу этиленгликоля, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более единиц этиленгликоля, где линкер подвергается расщеплению гликозидазой и в частности, подвергается расщеплению глюкуронидазой.

В определенных вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий, например, около 8-12 единиц саркозина и по меньшей мере одну единицу этиленгликоля, например, до 10 единиц этиленгликоля, и в котором линкер подвергается расщеплению гликозидазой и, в частности, подвергается расщеплению глюкуронидазой.

В некоторых вариантах осуществления линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий 10 единиц саркозина и 2 единицы этиленгликоля, и в котором линкер подвергается расщеплению глюкуронидазой.

Конъюгат антитело-лекарственное средство по настоящему изобретению может

быть получен известными способами.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены в подходящей клетке-хозяине, содержащей молекулу нуклеиновой кислоты, например молекулу ДНК, кодирующую область VH антитела или область VL антитела, или кодирующую полное антитело или фрагмент антитела, или вектор или векторную систему, т.е. множество векторов, содержащих указанную молекулу (молекулы) нуклеиновой кислоты, предпочтительно в функциональной связи с последовательностью, контролирующей экспрессию, в частности, с гетерологичной последовательностью, контролирующей экспрессию. Клеткой-хозяином может быть любая известная клетка-хозяин для продукции антител или фрагментов антител, например, прокариотическая клетка, такая как клетка *E. coli*, дрожжевая клетка, клетка насекомого или клетка млекопитающего, например, клетка СНО или гибридная клетка.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут взаимодействовать с конъюгатом линкер-лекарственное средство для получения конъюгата антитело-лекарственное средство. Конъюгат линкер-лекарственное средство содержит молекулу лекарственного средства, например, имеющую присоединенный к ней подходящий линкер, причем линкер содержит реакционноспособную группу, способную реагировать с необходимыми положениями присоединения к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту. Для присоединения к остаткам цистеина конъюгат линкер-лекарственное средство содержит тиолреактивную группу, например, малеимидную группу.

Дополнительный аспект изобретения относится к конъюгату линкер-лекарственное средство, включающему:

(i) гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий, например, около 8-12 единиц саркозина и по меньшей мере одну единицу этиленгликоля, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более единиц этиленгликоля, где линкер подвергается расщеплению посредством гликозидазой и, в частности, подверженный расщеплению глюкуронидазой, и где линкер содержит тиолреактивную группу, например, малеимидную группу, способную реагировать с остатками цистеина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте, и

(ii) ингибитор топоизомеразы I, в частности эксатекан, ковалентно присоединенный к линкеру.

В конкретных вариантах осуществления конъюгат линкер-лекарственное средство включает:

(i) гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий 10 единиц саркозина и 2 единицы этиленгликоля, где линкер подвергается расщеплению гликозидазой и, в

частности, подвергается расщеплению глюкуронидазой, и где линкер содержит малеимидную группу, способную реагировать с остатками цистеина на антителе или антигенсвязывающем фрагменте, и

(ii) эксатекан, ковалентно присоединенный к линкеру.

Конъюгат линкер-лекарственное средство особенно пригоден для присоединения к антителу против нектин-4, как описано в настоящей заявке. Следует, однако, отметить, что конъюгат линкер-лекарственное средство также пригоден для присоединения к любому антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, например, антителу, связывающемуся с опухолевым антигеном, или его антигенсвязывающему фрагменту.

Фармацевтические композиции

Дополнительным аспектом настоящего изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая активный агент, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4 и где лекарственное средство является ингибитором топоизомеразы I, в частности, эксатеканом, и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

Примеры подходящих носителей и вспомогательных веществ для приготовления конъюгатов антитело-лекарственное средство включают физиологический раствор и водные буферные растворы, и хорошо известны в данной области техники. Как правило, фармацевтическая композиция адаптирована для парентерального введения, например, для подкожной, внутримышечной или внутривенной инъекции, или путем инфузии. В других вариантах осуществления фармацевтическая композиция адаптирована для местного введения, например, для интравезикальной инстилляции в мочевой пузырь.

В зависимости от стадии и тяжести расстройства фармацевтическая композиция может быть введена один или несколько раз в терапевтически эффективной дозе субъекту, нуждающемуся в ней, в частности субъекту-человеку. Например, ее можно вводить один или несколько раз в день, каждый второй день, два раза в неделю или еженедельно в течение подходящего периода, например, по меньшей мере одной недели или по меньшей мере одного месяца.

Медицинское применение

Согласно дополнительному аспекту изобретения, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция, описанная выше, используется в медицине, включая медицину человека и ветеринарию, в частности в медицине человека.

В конкретном варианте осуществления конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция, описанные выше, используются в способе профилактики и/или лечения расстройства, ассоциированного с нектином-4, в частности, для профилактики и/или лечения нектин-4-положительного рака, более конкретно, для профилактики и/или лечения рака, связанного со сверхэкспрессией нектина-4.

Рак, подлежащий профилактике и/или лечению, может быть любым видом рака, причем термин «рак» используется здесь для обозначения пролиферативных заболеваний. Рак, подлежащий профилактике и/или лечению в соответствии с настоящим изобретением, предпочтительно выбирают из группы, состоящей из рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, рака печени, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легкого, рака яичника, рака головы и шеи, и/или рака пищевода.

При терапевтическом применении активный агент вводят в эффективном количестве субъекту, нуждающемуся в нем, в частности субъекту-человеку. Доза будет зависеть от конкретного типа агента, например, типа антитела или фрагмента антитела, типа заболевания и способа введения, например, местного или системного.

При профилактике и/или лечении рака терапевтическая доза конъюгата антитело-лекарственное средство обычно составляет от примерно 0,3 мг/кг до примерно 10 мг/кг.

Конъюгат антитело-лекарственное средство может быть введен отдельно или вместе с другим активным агентом, который может быть выбран из химиотерапевтических агентов, например, антиметаболитов, алкилирующих агентов, интеркалирующих агентов или антимитотических агентов), ингибиторов специфических киназ, например, ингибиторов тирозинкиназы, ингибиторов серин/треонинкиназы или ингибиторов фосфоинозитидкиназ, иммунотерапевтических соединений, например, ингибиторов иммунных контрольных точек, CAR-T-клеток, терапевтических вакцин или онколитических вирусов.

Далее, настоящее изобретение объясняется более подробно с помощью следующих таблиц, чертежей и примеров.

Описание чертежей

Фиг. 1: Ch-15A7.5 и Ch-5A12.2 распознают человеческий нектин-4. Детекция с помощью проточной цитометрии.

Анализ методом проточной цитометрии MDA-MB231, трансфицированных N-концевым эпитопом нектина-4, меченным Flag, с использованием диапазона доз (0,3 нг/мл - 5 мкг/мл) антител Ch-15A7 и Ch-5A12.2. Родительские клетки MDA-MB231 включены в качестве контроля. Затем клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козым

антителом к человеческому Fc. Показана нормализованная средняя интенсивность флуоресценции. Вставка: окрашивание родительских клеток MDA-MB231 моноклональными антителами к нектину-1, -2 и -3 (5 мкг/мл). Представлена средняя интенсивность флуоресценции.

Фиг. 2: Ch-15A7.5 распознает IgV-подобный домен человеческого нектина-4. Детекция с помощью ELISA.

96-луночные планшеты покрывали, как указано, 5 мкг/мл рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-1 (Nec1-VCC), или рекомбинантного гибридного белка Fc и IgV-подобного домена нектина-4 (Nec4-V), или рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-4 (Nec4-VCC) в течение ночи при температуре 4°C. Ch15A7.5 распознает внеклеточный домен нектина-4, точнее, IgV-подобный домен нектина-4, но не внеклеточный домен нектина-1.

Фиг. 3: Характеристика эпитопа Ch-15A7.5. Конкурентный анализ был проведен методом ELISA.

96-луночные планшеты покрывали 5 мкг/мл рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-4 (Nec4-VCC) в течение ночи при температуре 4°C. Связывание конъюгированного с пероксидазой Ch-15A7.5 мАт (5 мкг/мл) измеряли в присутствии увеличивающихся концентраций (2,75 нг/мл - 6 мкг/мл) ритуксимаба, Ch-15A7 мАт, Энфортумаба (HA22), Ch-N41 мАт и Ch-14A5 мАт. HA22, Ch-N41 и CH-14A5 распознают IgV-домен нектина-4.

Фиг. 4: Конкуренция мАт Ch-15A7.5 и 5A12.2 с нектином-1 за связывание с нектином-4. Конкуренцию оценивали с помощью проточной цитометрии.

96-луночные планшеты засеивали 50 000 клетками СНО, трансфицированными кДНК человеческого нектина-4. Клетки инкубировали 45 минут с возрастающими концентрациями изотипического контроля или моноклонального антитела Ch-15A7.5 или Ch-5A12.2 (8 нг/мл – 5 мкг/мл). После промывки планшеты инкубировали с 20 мкг/мл рекомбинантного гибридного белка Fc и внеклеточного домена нектина-1 (Nec1-VCC). Связывание с нектином-1 выявляли после инкубации с козым антителом к человеческому Fc, конъюгированным с фикоэритрином.

Фиг. 5: Перекрестная реактивность с нектином-4 от яванской макаки, крысы и мыши. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ методом проточной цитометрии клеток СНО, трансфицированных нектином-4 человека, макаки-крабоеда, крысы или мыши, с использованием диапазона доз антител Ch-15A7 (A), Ch-3A1.4 (B), Ch-5A12.2 (C), Ch-9A2.7 (D) или энфортумаба (HA22, B) (0,05 нг/мл – 5 мкг/мл). Затем клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с

козьим антителом к Fc человека. Показана нормализованная средняя интенсивность флуоресценции. В таблицах приведены расчетные значения EC₅₀, определенные программным обеспечением GraphPad Prism 9 с использованием нелинейного построения кривой (4 параметра). Символ «~» указывает на то, что сообщаемое значение является неоднозначным из-за плохой подгонки кривой.

Фиг. 6: Дифференциальное связывание с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и нормальными дифференцированными кератиноцитами человека. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ клеточной линии TNBC (SUM190, темные символы) и нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) кератиноцитов человека (NHEK, незакрашенные символы) методом проточной цитометрии с использованием диапазона доз (1,2 нг/мл - 5 мкг/мл) энфортумаба (HA22, квадраты), Ch-15A7.5 (круги), Ch-3A1.4 (треугольники) и Ch-9A2.7 (ромбы). Клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козьим антителом к человеческому Fc. Показаны нормализованные значения средней интенсивности флуоресценции. Построение нелинейной кривой (4 параметра) было выполнено с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Горизонтальная черта расположена на уровне 50% от максимальной интенсивности окрашивания, полученной с помощью антитела HA22 на клетках SUM190.

Фиг. 7: Дифференциальное связывание с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и нормальными дифференцированными кератиноцитами человека. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ клеточной линии TNBC (SUM190, A) и нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) кератиноцитов человека (NHEK, B) методом проточной цитометрии с использованием 5 мкг/мл HA22 (энфортумаба), Ch-5A12.2, Ch-15A7.5 и Ch-8F06. Клетки окрашивали козьим антителом к человеческому Fc, конъюгированным с фикоэритрином. Показаны нормализованные значения средней интенсивности флуоресценции.

Фиг. 8: Дифференциальное связывание с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и кератиноцитами человека. Детекция с помощью иммуногистохимии.

Криоконсервированные, залитые реагентом ОСТ блоки с линией опухолевых клеток с высоким уровнем экспрессии нектина-4 (SUM190), линией опухолевых клеток с низким уровнем экспрессии нектина-4 (SUM149) из кожи человека и яванской макаки обрабатывали для окрашивания 15A7,5 мАт (A) и 9A2,7 мАт (B). Показаны значения по шкале быстрой оценки, полученные для каждого мАт (A, B). C, отношение по шкале быстрой оценки SUM190 по сравнению с кожей человека.

Фиг. 9: Дифференциальная интернализация в линии опухолевых клеток и кератиноцитах человека. Детекция с помощью флуоресценции.

Энфортумаб (HA22), Ch-15A7.5 и изотипические контрольные мАт соединяли с тиолреактивным красителем рНАВ для достижения соотношения краситель-антитело, составляющего от 4,58 до 5,55. Диапазон доз каждого из этих конъюгатов краситель-антитело (1,6 нг/мл - 5 мкг/мл) инкубировали в двух экземплярах с экспрессирующей нектин-4 клеточной линией SUM190PT (A) и нормальными дифференцированными (0,1 mM CaCl₂) человеческими кератиноцитами (B). Внутриклеточную флуоресценцию регистрировали через 24 часа с помощью флуоресцентного ридера микропланшетов (ClarioStar). Приведены данные по интенсивности флуоресценции в зависимости от концентрации конъюгата краситель-антитело.

Фиг. 10: Дифференциальная цитотоксическая активность *in vitro* по отношению к опухолевым клеткам и нормальным дифференцированным кератиноцитам человека. Выживаемость клеток измеряли с помощью МТТ-анализа.

Энфортумаб (HA22, ромбы), Ch-15A7.5 (треугольники) и Ch-9A2.7 (квадраты) мАт соединяли с α -аманитином для получения конъюгатов антитело-лекарственное средство, цитотоксическую активность которых в диапазоне доз (7,7 пг/мл - 15 мкг/мл) оценивали на нектин-4-экспрессирующей клеточной линии SUM190PT (A, D) или нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) человеческих кератиноцитах (B, E). Регистрировали жизнеспособность (МТТ-анализ) после 5-дневного инкубационного периода. Значения EC₅₀ определяли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9 с использованием построения нелинейной кривой (4 параметра). Для каждого состояния рассчитывали и регистрировали отношение EC₅₀ ADC Ch-15A7.5 (C) или ADC Ch-9A2.7 (F) к HA22-ADC. Представленные данные являются типичными для 2 различных линий опухолевых клеток, экспрессирующих нектин-4 (SUM190PT и MDA-MB468), и 3 независимых доноров человеческих кератиноцитов.

Фиг. 11: Лечение мышей NSG с трансплантатом SUM190 с помощью ADC Ch-15A7.5-MA-PS- β Glu-эксатекан индуцирует длительный период регрессии опухоли.

У мышей NSG (n=5/группу) проводили ортотопическую двустороннюю ксенотрансплантацию клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и Ch-15A7.5-MA-PS- β Glu-Эксатекан и заменитель энфортумаба ведотина, HA22-МС-vc-РАВС-ММАЕ. Лечение мышей (однократная внутривенная инъекция) начинали, когда опухоли достигали объема приблизительно 150 мм³. Ch-15A7.5-MA-PS- β Glu-Эксатекан (Ch-15A7.5-Ex) и Ch-5A12.2-MA-PS- β Glu-Эксатекан (Ch-5A12.2-Ex) оценивали в 2 дозах (4 или 8 мг/кг), ICT-MA-PS-

β Glu-эксатекан (ICT-Ex) вводили в дозе 8 мг/кг, а заменитель энфортумаба ведотина (EV) - в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю, и размер определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Фиг. 12: Кажущая аффинность гуманизированных вариантов к опухолевым клеткам. Определение методом проточной цитометрии.

Опухолевые клетки человека T47D, экспрессирующие нектин-4, нумеровали и инкубировали с диапазоном доз (169 пг/мл – 30 мкг/мл) Ch-15A7.5 или указанных гуманизированных вариантов. Числа, ассоциированные с H и L, относятся к числу введенных обратных мутаций. Затем клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина и козьего антитела против человеческого Fc, и анализировали методом проточной цитометрии. Приведены средние значения интенсивности флуоресценции. Для построения нелинейной кривой использовали программное обеспечение GraphPad Prism 9 (4 параметра).

Фиг. 13: Лечение мышей NSG с трансплантатом SUM190 с помощью ADC HA22-MA-PS- β Glu-эксатекана индуцирует длительный период регрессии опухоли.

У мышей NSG (n=5/группа) проводили ортотопическую билатеральную ксенотрансплантацию клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы три различных ADC: изотипический контроль, ICT- и HA22-MA-PS- β Glu-эксатекан и заменитель энфортумаба ведотина, HA22-MC-vc-PABC-MMAE. Лечение мышей (однократное внутривенное введение) начинали, когда опухоли достигали приблизительно 150 мм³. HA22MA-PS- β Glu-эксатекан (HA22-Ex) оценивали в 2 дозах (4 или 8 мг/кг), ICT-MA-PS- β Glu-эксатекан (ICT-Ex) в дозе 8 мг/кг, а заменитель энфортумаба ведотина (EV) в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группу) контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю, и размеры определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Фиг. 14: Лечение мышей NSG с трансплантатом SUM190 с помощью ADC HA22-MA-PS- β Glu-эксатекан и HA22-MC-GGFG-DX8951 индуцирует длительный период регрессии опухоли.

У мышей NSG (n=5/группу) проводили ортотопическую билатеральную ксенотрансплантацию клеток SUM190PT, внедренных в матригель. Были протестированы пять различных ADC: изотипический контроль, ICT- и HA22 в сочетании либо с MA-PS- β Glu-эксатеканом (ICT-Ex и HA22-Ex), либо с MC-GGFG-DX8951 (ICT- и HA22-Dxd) и заменителем энфортумаба ведотина, HA22-MC-vc-PABC-MMAE (EV). Лечение мышей (однократная внутривенная инъекция) начинали, когда опухоли достигали

приблизительно 150 мм³. HA22-Eх и HA22-Dхd оценивали в 2 дозах (4 или 8 мг/кг), ICT-EХ и ICT-Dхd вводили в дозе 8 мг/кг, а заменитель энфортумаба ведотина (EV) вводили в дозе 4 мг/кг. Размеры опухоли (n=10/группа) контролировали с помощью штангенциркуля дважды в неделю, и размеры определяли по следующей формуле $(L \times l \times h \times \pi) / 6$.

Фиг. 15: Дифференциальное связывание Ch-15A7.5 и его гуманизированных вариантов с нектином-4, экспрессируемым линией опухолевых клеток, и нормальными дифференцированными кератиноцитами человека. Детекция методом проточной цитометрии.

Анализ клеточной линии TNBC методом проточной цитометрии (SUM190, верхние панели) и нормальных дифференцированных (0,1 mM CaCl₂) кератиноцитов человека (NHEK, нижние панели) с использованием диапазона доз (8 мкМ – 33 нМ) Ch-5A12.2, Ch-15A7.5 и его гуманизированных вариантов 15A7.5-H1L2, -H1L3, -H2L2, -H2L3, -H3L0, -H3L2, -H3L3. Клетки окрашивали конъюгатом фикоэритрина с козым антителом к человеческому Fc. Показаны нормализованные значения средней интенсивности флуоресценции. Построение нелинейной кривой (4 параметра) выполняли с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 9. Отмечен значительно более низкий показатель EC₅₀ Ch-15A7.5 и его гуманизированных вариантов по отношению к кератиноцитам (нижние панели) по сравнению с Ch-5A12.2.

Фиг. 16: Аминокислотная последовательность вариабельной тяжелой цепи (VH) и вариабельной легкой цепи (VK) родительского клона антител 5A12.2. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фиг. 17: Аминокислотные последовательности вариабельных тяжелых цепей (VH) и вариабельных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 9A2.7. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фиг. 18: Аминокислотные последовательности вариабельных тяжелых цепей (VH) и вариабельных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 3A1.4. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фиг. 19: Аминокислотные последовательности вариабельных тяжелых цепей (VH) и вариабельных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 8F06. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG подчеркнуты.

Фиг. 20: Аминокислотные последовательности вариабельных тяжелых цепей (VH) и вариабельных легких цепей (VK) гуманизированных вариантов 15A7.5.

Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG выделены серым фоном.

Фиг. 21: Значения аффинности гуманизированных вариантов 15A7.5.

Фиг. 22: Аминокислотные последовательности родительского клона антител 15A7.5 с переменными тяжелыми цепями (VH) и переменными легкими цепями (VK). Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG выделены серым фоном.

Фиг. 23: Аминокислотная последовательность переменной тяжелой цепи (VH) и переменной легкой каппа-цепи (VK) антитела HA22. Последовательности H-CDR и L-CDR в соответствии с номенклатурой IMTG выделены серым фоном.

Примеры

Материалы и методы

Клеточные линии:

Клеточную линию карциномы молочной железы человека MDA-MB231 (ATCC, Манассас, Вирджиния) культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 50 МЕ/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамин. Клетки были трансфицированы вектором экспрессии р3XFLR4.C1, содержащим кДНК PVRL4. Линию клеток трижды негативного рака молочной железы человека SUM190PT (BioIVT, Уэстбери, Нью-Йорк) культивировали в среде Ham's F12 с 5% эмбриональной телячьей сыворотки, 1% неэссенциальных аминокислот, 1% Hepes, 1% инсулина, 1 мкг/мл гидрокортизона, 6,8 нг/мл трийод-L-тирозина, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамин. Клеточную линию CHO яичников китайского хомячка культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ глутамин. Клеточные линии рака молочной железы человека MDA-MB-468 и T47D культивировали в RPMI с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина.

ELISA:

Для контроля специфичности антител к Ch-15A7.5 и для проведения конкурентных анализов между различными мАт использовали сэндвич-иммуноферментный анализ. 96-луночные планшеты покрывали 10 нМ нектин-4-VCC-Fc, нектин-1-VCC-Fc (вся внеклеточная часть) или нектин-4-V-Fc (включающего только IgV-домен) в течение ночи при температуре +4°C. После промывки и насыщения раствором ФБР с 1% БСА, клетки инкубировали в течение 2 часов при 25°C с 10 нМ конъюгированного с пероксидазой Ch-15A7,5 мАт. В случае конкуренции измеряли связывание 0,5 нМ конъюгированного с

пероксидазой Ch-15A7,5 мАТ в присутствии переменной концентрации (от 0,018 нМ до 40 нМ) простого мАт. Добавляли 100 мкл пероксидазного субстрата (One Step ABST, Pierce), и измеряли оптическую плотность при 405 нм.

Проточная цитометрия:

Клетки или клеточные линии (10000-50000), экспрессирующие нектин-4 (естественным путем или трансфицированные), инкубировали с указанными антителами в диапазоне доз. После промывки клетки окрашивали конъюгированным с фикоэритрином козым антителом против белков человека (5 мкг/мл) (Jackson Immuno Research). После фиксации клетки окрашивали красителем для определения жизнеспособности (e780, Invitrogen) перед проведением проточной цитометрии.

Иммуногистохимия:

Замороженные образцы, хранящиеся при температуре -80°C , держали на сухом льду и помещали в пластиковые криоформы таким образом, чтобы максимально увеличить количество последующих срезов, и помещали в среду для получения срезов при оптимальной температуре (ОСТ). Замороженные блоки ОСТ монтировали на диски с ОСТ и проводили криосекцию при температуре -20°C на криостате NX70 (Thermo Scientific). Криосрезы (7 мкм) помещали на предметных стеклах Superfrost+ (VWR). Готовили только необходимое количество предметных стекол для каждого вида анализа и хранили при температуре -80°C до использования. Оставшиеся блоки хранили при температуре -80°C до дальнейшего использования. Срезы помещали на предметное стекло и фиксировали в ацетоне при температуре -20°C в течение 10 минут. Эндogenous пероксидазы ингибировали путем погружения слайдов в перекись водорода (H_2O_2) в рамках протокола Roche DAB kit. Для оптимизации отношения сигнал/шум были протестированы несколько разведений каждого мАт, и 0,5 мкг/мл мышинового 15A7,5 мАт и 10 мкг/мл мышинового 9A2,7 мАт были определены как оптимальные. Чтобы уменьшить неспецифическое связывание вторичного антитела с мышинной тканью, после первичной инкубации антител добавляли кроличье антитело к IgG мыши (4 мкг/мл, Abcam). Затем использовали конъюгат антител к иммуноглобулинам кролика с пероксидазой хрена Omni-map (Roche) для окрашивания DAB в соответствии с инструкцией производителя (Ventana automat). Была проведена оценка как интенсивности окрашивания, так и доли окрашенных клеток. Два обученных техника наблюдали за одним и тем же полем микроскопа независимо и последовательно. Для каждого поля оценивали как долю окрашенных клеток, так и интенсивность окрашивания. Для каждого окрашивания случайным образом выбирали 10 полей при увеличении, которое обеспечивало наилучшую визуализацию тканей. Процедура подсчета баллов была следующей: (i)

оценивали долю клеток, окрашенных положительно, и каждому полю присваивали оценку от 0 до 4 (0= 0-5%; 1= 5-25%; 2= 25-50%; 3= 50-75%; и 4= 75-100%); и (ii) интенсивность окрашивания оценивали как 0, 1, 2 или 3, что соответствовало наличию отрицательного, слабого, промежуточного и сильного коричневого окрашивания, соответственно. Окончательная оценка для каждого поля и для каждого наблюдателя представляла собой результат умножения двух значений (0 = отсутствие окрашивания в ткани; 12 = ткань содержит сильно окрашенные клетки). Для каждого типа ткани на каждом из 5 срезов каждого набора срезов параллельно оценивали 10 независимых полей наблюдения как по интенсивности окрашивания, так и по процентному содержанию меченых клеток. Специалисты одновременно наблюдали за заданным полем (виртуальный слайд на экране компьютера) и оценивали результаты, независимо от результатов других наблюдателей. Для каждого среза были усреднены 10 баллов от каждого специалиста, чтобы установить окончательный балл для каждого наблюдателя. Итоговые оценки двух наблюдателей были усреднены, что дало оценку ткани для данного среза. Для кожи человека представлены только результаты первого набора показателей повторяемости.

Анализ интернализации

Десять тысяч SUM190PT или дифференцированных кератиноцитов человека (0,1 mM CaCl₂) высевали в 96-луночные планшеты и затем инкубировали в течение 24 часов при 37°C с диапазоном доз (1,6 нг/мл – 5 мкг/мл) антител против нектин-4 и изотипического контроля, конъюгированных с тиолреактивным красителем rHAB. После интернализации и эндолизосомальной обработки кислая среда вызывает флуоресценцию красителя. Интенсивность флуоресценции контролировали на ридере для микропланшетов с возбуждением при 532 нм и излучением при 560 нм.

Цитотоксический анализ *in vitro*

Для анализа цитотоксической активности ADC *in vitro* оценивали жизнеспособность клеток с использованием протокола окрашивания AlamarBlue, рекомендованного производителем (Biosource, Калифорния, США). Тест включает флуоресцентный индикатор окисления-восстановления. Интенсивность флуоресценции пропорциональна снижению клеточного метаболизма. Эксперименты проводили путем инкубации 3000 клеток/лунку (SUM190PT или дифференцированные NHEK) в трех экземплярах с последовательными разведениями ADC на 0-й день в 96-луночных планшетах. AlamarBlue анализировали на 5-й день путем инкубации 1/10 объема раствора alamarBlue в течение 2 часов при 37°C и измерения при 595 нм (FLUOstar Optima, BMG Labtech).

Эксперименты на мышах

Мыши NOD/SCID (не страдающие ожирением диабетиками/тяжелый комбинированный иммунодефицит)/*gcs null* (NSG) были получены от Charles River Laboratory (Маргейт, Великобритания). Самкам в возрасте от шести до семи недель ($n=5$ /группу) была проведена ортотопическая двусторонняя ксенотрансплантация с использованием клеток SUM190PT ($0,5 \times 10^6$), внедренных в матригель. Лечение ADC проводили, как упоминалось в соответствующих экспериментах. Размеры опухоли ($n=10$ /группу) контролировали с помощью штангенциркуля два раза в неделю и определяли по следующей формуле ($L \times l \times h \times \pi / 6$).

Секвенирование гибридомы

Для секвенирования гибридомы сначала выделяли РНК из клеток гибридомы. кДНК генерировали методом обратной транскрипции, а домены VH и VL амплифицировали методом полимеразной цепной реакции с использованием ДНК-полимеразы Prime StarMax (Takara). Продукты ПЦР впоследствии клонировали в специализированный вектор экспрессии тяжелых и легких цепей, а затем секвенировали.

Генерация, продукция, очистка и контроль химерных антител

Вектор экспрессии легкой цепи кодирует V-каппа-цепь. В зависимости от используемой нагрузки использовали 2 различных вектора экспрессии тяжелой цепи, один кодирующий Fc-фрагмент с мутациями D265C (ThiomAb), L234A и L235A, другой кодирующий Fc-фрагмент с мутациями P331S, L234Q и L235F. Оба фрагмента Fc являются «Fc-молчащими». Последовательности анти-нектин-4 Энфортумаба (HA22) также были клонированы в тех же векторах.

Векторы с легкой и тяжелой цепями трансфицировали в НЕК293, посеянные в соотношении 1,2/1. После 6 дней продукции надосадочные жидкости культур осветляли, и мАт очищали с использованием смолы MabSelect Prisma (GE Healthcare) в соответствии с инструкциями производителя. В качестве связывающего буфера использовали 0,5М глицин, 3М NaCl, pH 8,9, а для элюирования использовали 0,1М цитрат, pH 3. Постоянную нейтрализацию проводили 10 об.% 1М Трис-HCl с pH 9. Затем моноклональные химерные антитела подвергали диализу против ФБР 1X pH 7,4 (мини-устройства для диализа, 2 мл-10к, Thermo Scientific) с последующей фильтрацией на фильтре 0,22 мкм (Milelex GV hydrophilic PVDF, Millipore). Концентрацию определяли с помощью спектрофотометра Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) с учетом удельного коэффициента экстинкции ($E1\%_{280 \text{ nm}}$) каждого моноклонального антитела. Чистоту определяли методом эксклюзионной УВЭЖХ с помощью Acquity UPLC-HClass Bio (Waters) с использованием колонки Protein-BEH 200A, уравновешенной в 0,2М NaPO₄,

0,3M NaCl, pH 6,9, с добавлением 10% изопропанола. Массу антител определяли на масс-спектрофотометре Xevo G2-S Q-ToF (Waters) с использованием обращенно-фазовой колонки (PLRP-S 4000A, Agilent technologies). Все образцы анализировали после дегликозилирования гликозидазой PNGase F (New England Biolabs) при температуре 37°C в соответствии с инструкциями производителя. Фрагментацию и/или агрегацию конечного материала оценивали с помощью ДСН-ПАГЭ. Концентрацию эндотоксина определяли с помощью хромогенного LAL-кинетического анализа (Charles River Endosafe).

Конъюгация антител

Тиолреактивный краситель pHAB (Promega) конъюгировали с цистеином отобранных анти-нектин-4 ThiomAb (D265C, L234A, L235A) с использованием малеимидной химии в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, антитела подвергали диализу в 0,1M фосфатном буфере с pH 7,0 перед восстановлением в 2,5 mM в течение 1 часа при комнатной температуре при слабом перемешивании. Впоследствии DTT удаляли путем двойного промывания/центрифугирования на обессоливающих колонках Zeba spin (7 MWCO). К 100 мкг антитела добавляли 1,2 л реагента pHdye (10 мкг/мл ДМСО) и инкубировали 1 час при комнатной температуре, защищая от света. После удаления избытка красителя с помощью обессоливающих колонок Zeba рассчитывали соотношение краситель-антитело для подтверждения эквивалентной конъюгации между различными антителами.

Цистеин-реактивное соединение линкер-эксатекан, малеимид-Gly-PSAR10-глюкуронид-эксатекан (Maplink) конъюгировали с цистеиновыми остатками избранных моноклональных антител против нектин-4 (P331S, L234Q и L235F). Вкратце, мАт в ФБР 1X, 1 mM ЭДТА восстанавливали 14 молярными эквивалентами TCEP в течение 2 часов при 37°C, после чего буфер заменяли (Amicon ultra 30 кДа) на 100 mM КРО₄, 1 mM ЭДТА, pH 7,4. 12 молярных эквивалентов цистеинреактивного соединения линкер-эксатекан использовали для конъюгации с реакционноспособными цистеинами в течение 35 минут при комнатной температуре. Затем буфер заменяли на 100 mM КРО₄ с pH 8,0 перед инкубацией при 37°C в течение 24 часов в отсутствие кислорода, чтобы малеимид мог самогидролизироваться. Окончательный обмен буфера проводили в 20 mM растворе с pH 6,0 перед фильтрацией через фильтр с размером пор 0,22 мкм. Соотношение лекарственного средства и антитела (DAR), согласно анализу ЖХ-МС, составило от 7,77 до 7,82 токсинов на конъюгированное мАт. Как было определено методом SEC-ВЭЖХ, подверглось агрегации менее 8% материала.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и лекарственное средство, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4, а лекарственное средство является ингибитором топоизомеразы I.

2. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1, содержащий антитело, выбранное из химерного антитела, мультиспецифического антитела, в частности биспецифического антитела, человеческого антитела, гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

3. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 1 или п. 2, содержащий антитело, выбранное из антитела класса IgG, например, подкласса IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, класса IgM, класса IgA, или его антигенсвязывающий фрагмент, или одноцепочечное антитело, или Fv фрагмент антитела, где антитело при необходимости включает константный домен тяжелой цепи, имеющий сниженную эффекторную функцию, например, который имеет сниженное связывание с Fc-рецептором.

4. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, включающий антитело, которое специфически связывается с нектином-4, экспрессируемым опухолями, с более высокой аффинностью по сравнению с нектином-4, экспрессируемым дифференцированными кератиноцитами человека, или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-4, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(а) переменную область тяжелой цепи (VH), включающую гиперпеременные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 1 или 7, 88, 96 или 104,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 2 или 8, 89, 97 или 105,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:

3 или 9, 90, 98 или 106,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 4 или 10, 92, 100 или 108,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 5 или 11, 93, 101 или 109,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 6 или 12, 94, 102 или 110,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот.

6. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-5, включающий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий:

(a) (i) область VH, включающую CDR-H1 из SEQ ID NO:1, CDR-H2 из SEQ ID NO:2 и CDR-H3 из SEQ ID NO:3, и при необходимости

(ii) область VL, включающую CDR-L1 из SEQ ID NO:4, CDR-L2 из SEQ ID NO:5 и CDR-L3 из SEQ ID NO:6,

или

(b) (i) область VH, включающую CDR-H1 из SEQ ID NO:7, CDR-H2 из SEQ ID NO:8 и CDR-H3 из SEQ ID NO:9, и при необходимости

(ii) область VL, включающую CDR-L1 из SEQ ID NO:10, CDR-L2 из SEQ ID NO:11 и CDR-L3 из SEQ ID NO:12,

или

(c) (i) область VH, включающую CDR-H1 из SEQ ID NO:88, CDR-H2 из SEQ ID

NO:89, и CDR-H3 из SEQ ID NO:90, и при необходимости

(ii) область VL, включающую CDR-L1 из SEQ ID NO:92, CDR-L2 из SEQ ID NO:93 и CDR-L3 из SEQ ID NO:94,

или

(d) (i) область VH, включающую CDR-H1 из SEQ ID NO:96, CDR-H2 из SEQ ID NO:97 и CDR-H3 из SEQ ID NO:98, и при необходимости

(ii) область VL, включающую CDR-L1 из SEQ ID NO:100, CDR-L2 из SEQ ID NO:101 и CDR-L3 из SEQ ID NO:102,

или

(e) (i) область VH, включающую CDR-H1 из SEQ ID NO:104, CDR-H2 из SEQ ID NO:105, и CDR-H3 из SEQ ID NO:106, и при необходимости

(ii) область VL, включающую CDR-L1 из SEQ ID NO:108, CDR-L2 из SEQ ID NO:109 и CDR-L3 из SEQ ID NO:110.

7. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-6, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий:

(a) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 13, 91, 99 или 107, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(b) область VL, в частности область VL, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:14, 95, 103 или 111, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

8. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-7, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий:

(a) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:13, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 14, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

или

(b) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 91, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 95, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

или

(c) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 99, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 103, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

или

(d) (i) область VH, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 107, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%,

и при необходимости

(ii) область VL, в частности, область VL, содержащую аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO:111, или аминокислотную последовательность, имеющую идентичность с ней по меньшей мере 85%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 95% или по меньшей мере 99%.

9. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из предыдущих пунктов, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, включающий:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую гиперпеременные области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO:

21, 35, 49 или 63,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 22, 36, 50 или 64,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 23, 37, 51 или 65,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(b) переменную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гиперпеременные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 24, 38, 52 или 66,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 25, 39, 53 или 67,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность в соответствии с SEQ ID NO: 26, 40, 54 или 68,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот.

10. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-3, содержащий антитело или полученный из него антигенсвязывающий фрагмент, включающий:

(a) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую гиперпеременные

области (CDR) CDR-H1, CDR-H2 и CDR-H3, где

(i) CDR-H1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 72 или 80,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-H2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 73 или 81,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-H3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 74 или 82,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

и при необходимости

(b) вариабельную область легкой цепи (VL), в частности область VL, содержащую гипервариабельные области (CDR) CDR-L1, CDR-L2 и CDR-L3, где

(i) CDR-L1 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 75 или 84,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(ii) CDR-L2 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 76 или 85,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот,

(iii) CDR-L3 содержит аминокислотную последовательность согласно SEQ ID NO: 77 или 86,

или аминокислотную последовательность, включающую замену или вставку, в частности консервативную замену и/или гистидиновую вставку по меньшей мере одной аминокислоты, например, 1 или 2 аминокислот.

11. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-10, где

ингибитором топоизомеразы I является камптотецин или его аналог, и где ингибитором топоизомеразы I является, в частности, эксатекан или дерукстекан.

12. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-11, который имеет молярное соотношение лекарственное средство-антитело/фрагмент антитела (DAR) от примерно 2:1 до примерно 16:1, в частности, от примерно 4:1 до примерно 10:1 и, более конкретно, от примерно 6:1 до примерно 8:1.

13. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-12, в котором лекарственное средство конъюгировано с реакционноспособным аминокислотным остатком на антителе, например, аминокислотным остатком, имеющим боковую цепь, содержащую амино-, гидроксид- или тиольную группу, или реакционноспособную группу в структуре гликанов антитела, и

в котором лекарственное средство конъюгировано, в частности, с реакционноспособной тиоловой группой в боковой цепи остатка цистеина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте.

14. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-13, в котором лекарственное средство конъюгировано с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом посредством линкера, в частности, где линкер представляет собой расщепляемый линкер и/или где линкер представляет собой, в частности, гидрофильный полисаркозиновый линкер, гидрофильный линкер, содержащий по меньшей мере одну единицу этиленгликоля, линкер, содержащий высокополярный спейсер, или олигопептидный линкер.

15. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 14, в котором линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер и по меньшей мере одну этиленгликолевую единицу, причем линкер подвергается расщеплению гликозидазой, и в частности, подвергается расщеплению глюкуронидазой.

16. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п. 14 или п. 15, в котором линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий, например, около 8-12 саркозиновых единиц и по меньшей мере одну этиленгликолевую единицу, например, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, или 10 или более этиленгликолевых единиц, где линкер подвергается расщеплению гликозидазой, и в частности, подвергается расщеплению глюкуронидазой.

17. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 14-16, в котором линкер представляет собой гидрофильный полисаркозиновый линкер, содержащий 10 саркозиновых единиц и 2 полиэтиленгликолевых единицы.

18. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 14-17, в котором

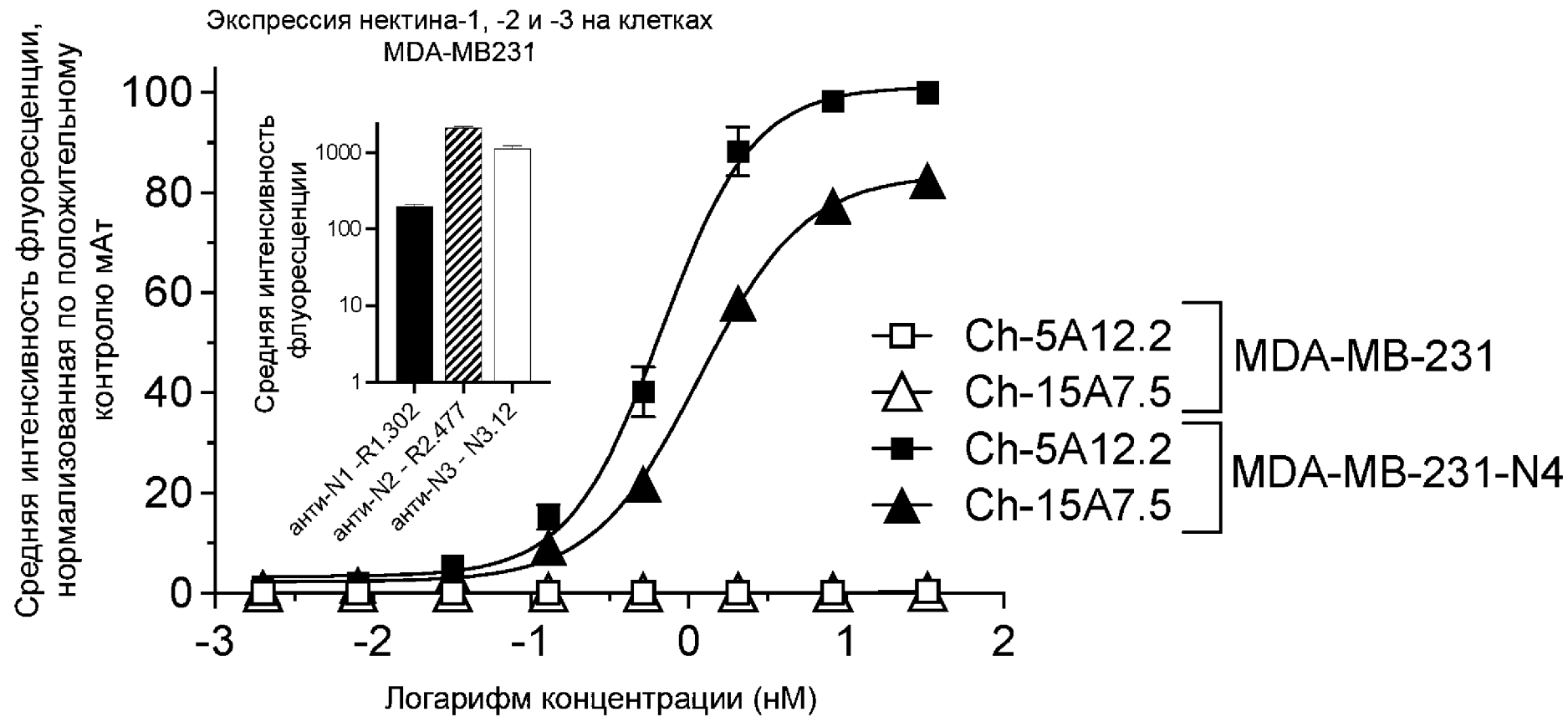
линкер подвергается расщеплению глюкуронидазой.

19. Конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп. 14-18, в котором линкер присоединен к остатку цистеина на антителе или его антигенсвязывающем фрагменте посредством тиолреактивной группы, в частности малеимидной группы.

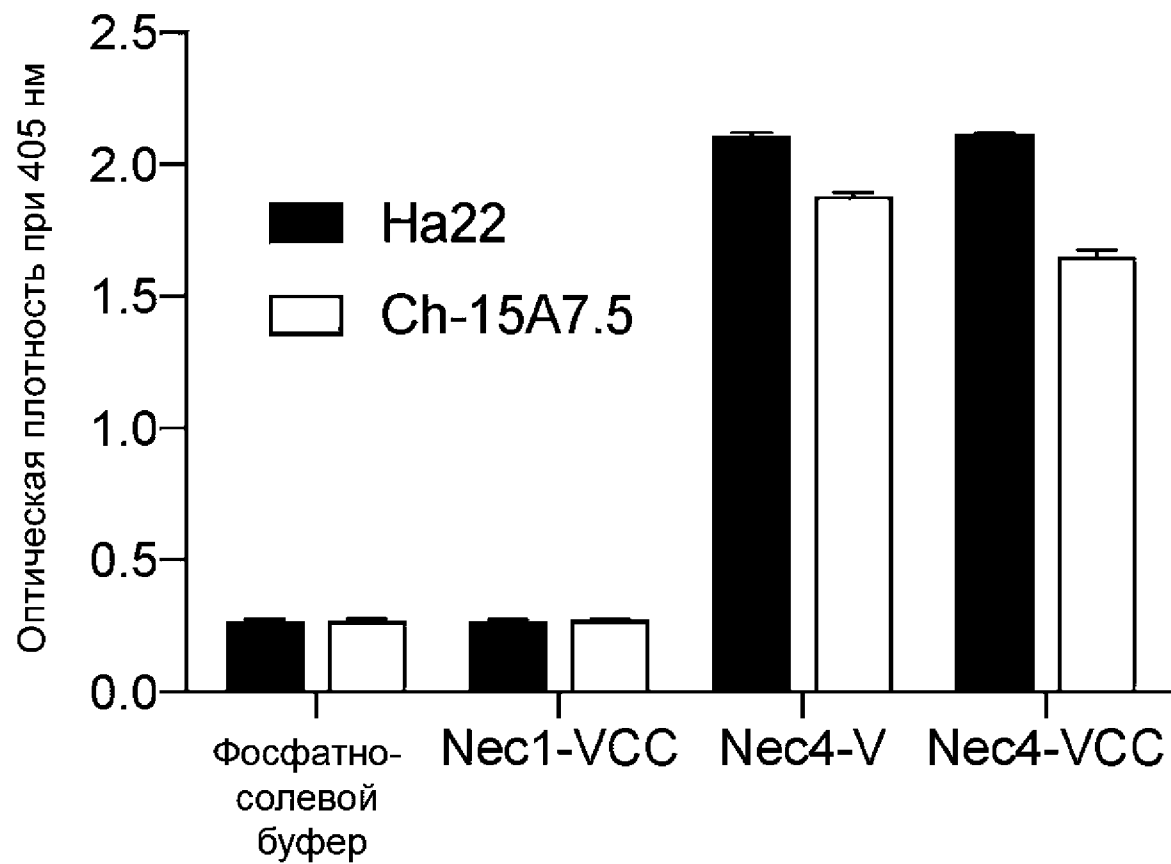
20. Фармацевтическая композиция, содержащая активный агент, который представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связываются с нектином-4 и где лекарственное средство является ингибитором топоизомеразы I, и фармацевтически приемлемый носитель и/или вспомогательное вещество.

21. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п. 19 в медицине, в частности в медицине для человека.

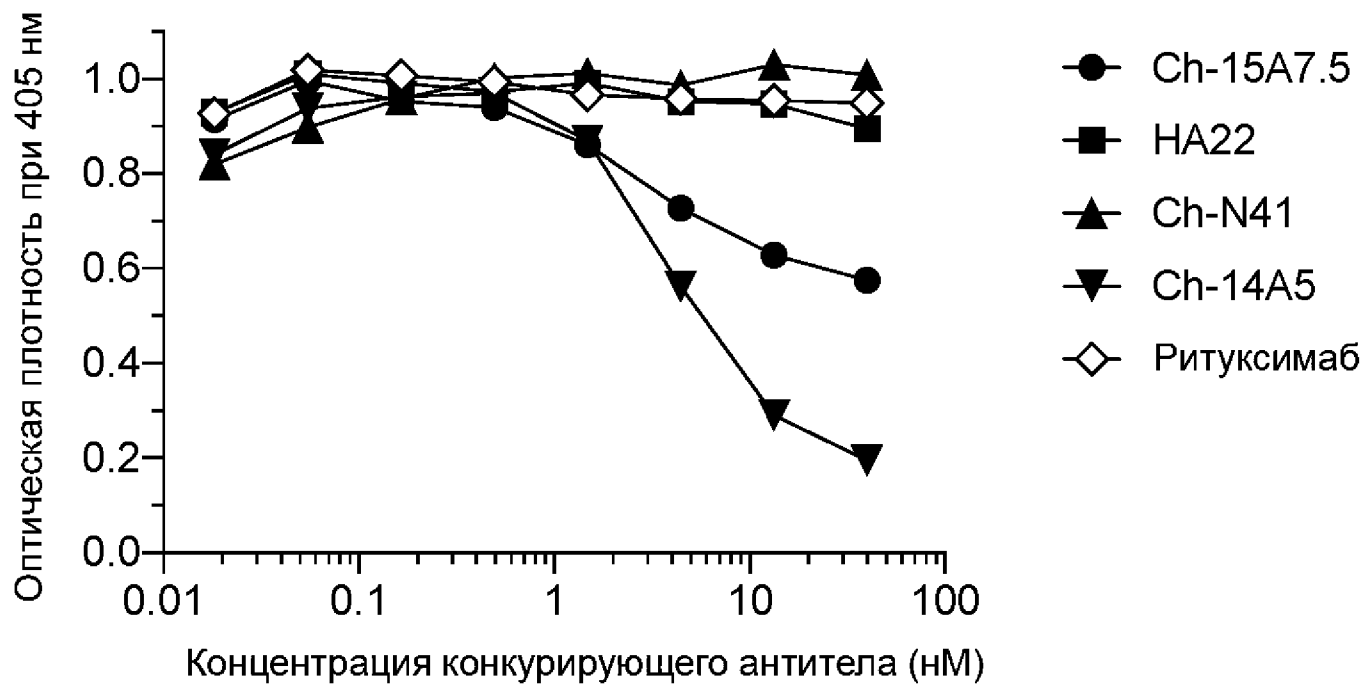
22. Применение конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп. 1-19 или фармацевтической композиции по п. 19 в способе профилактики и/или лечения расстройства, ассоциированного с нектином-4, в частности, для профилактики и/или лечения нектин-4-позитивного рака, в частности, для профилактики и/или лечения рака, выбранного из рака мочевого пузыря, уротелиального рака, рака эндометрия, рака шейки матки, колоректального рака, рака печени, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака легких, рака яичников, рака головы и шеи, и/или рака пищевода.



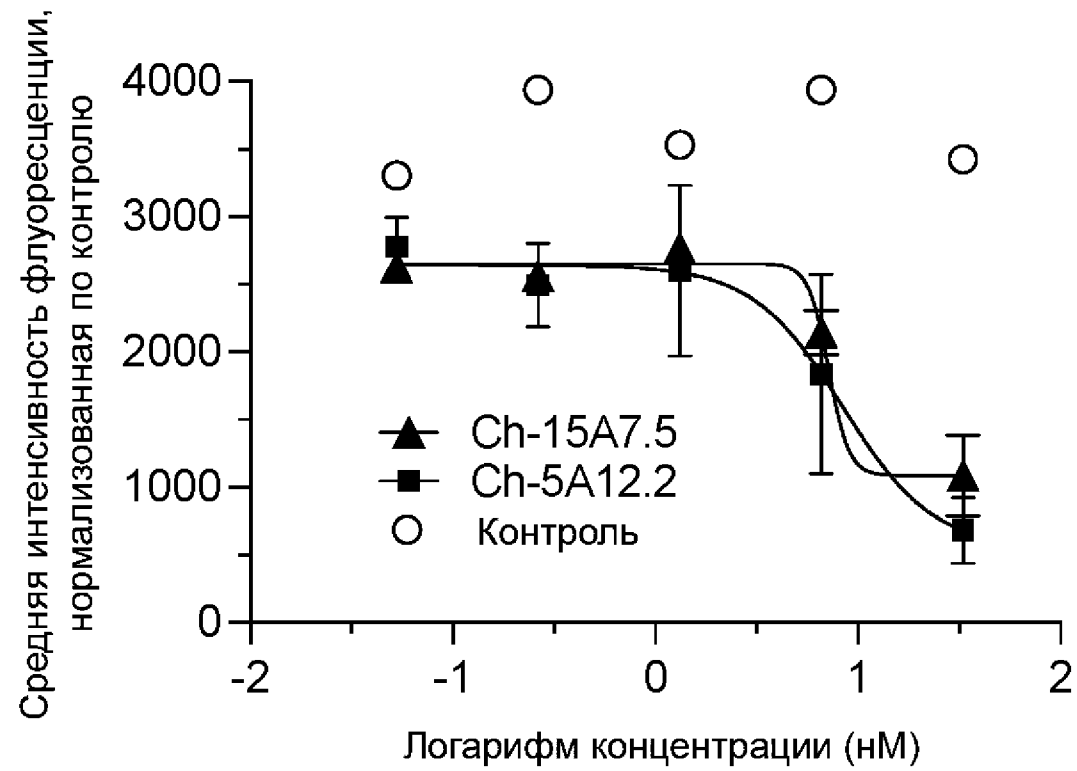
Фиг. 1



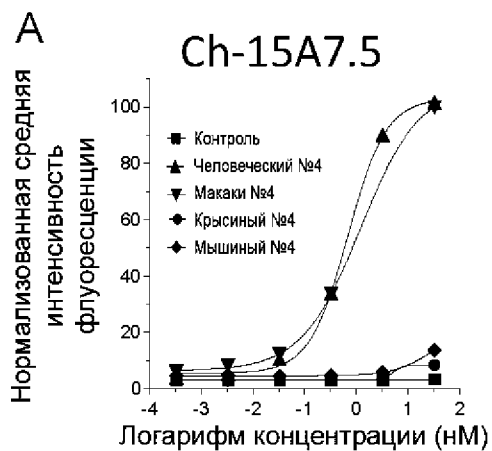
ФИГ. 2



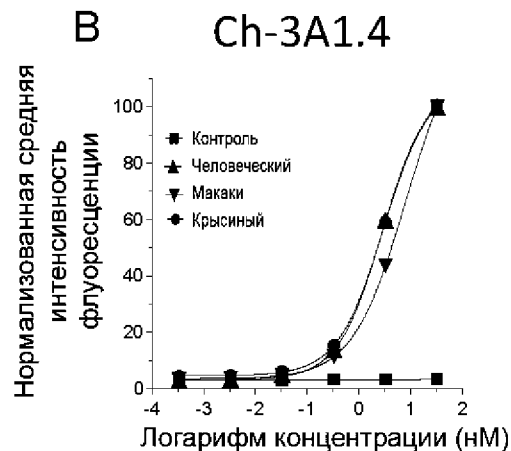
Фиг. 3



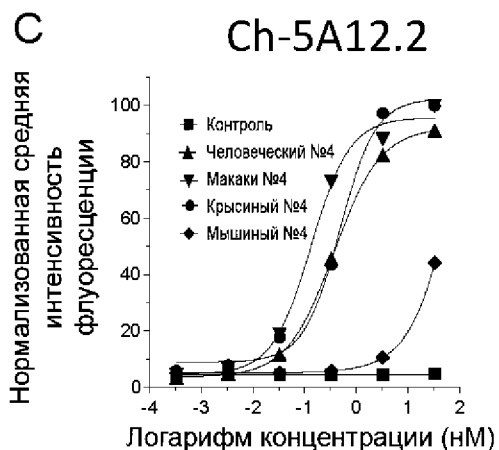
Фиг. 4



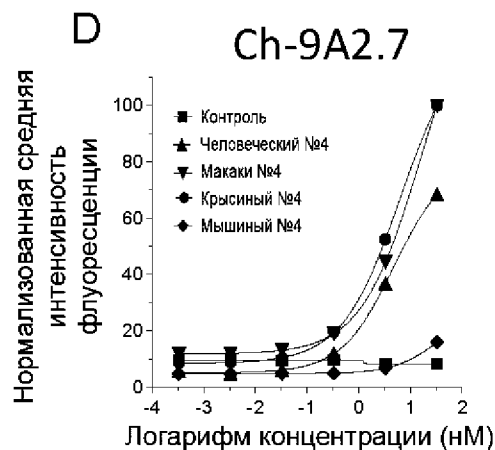
| | Контроль | Человеческий №4 | Макаки №4 | Крысиный №4 | Мышиный №4 |
|------|----------|-----------------|-----------|-------------|------------|
| EC50 | ~ 14290 | 0.6918 | 1.218 | ~ 5.156 | ~ 31.17 |



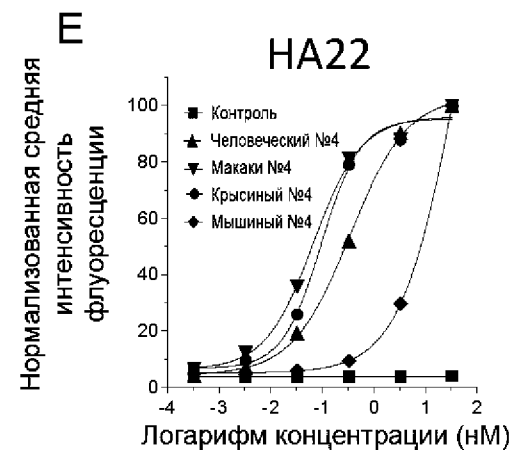
| | Контроль | Человеческий №4 | Макаки №4 | Крысиный |
|------|----------|-----------------|-----------|----------|
| EC50 | ~ 14290 | 2.835 | 8.050 | 3.013 |



| | Контроль | Человеческий №4 | Макаки №4 | Крысиный №4 | Мышиный №4 |
|------|----------|-----------------|-----------|-------------|------------|
| EC50 | ~ 34.74 | 0.3701 | 0.1343 | 0.4780 | ~ 204.7 |



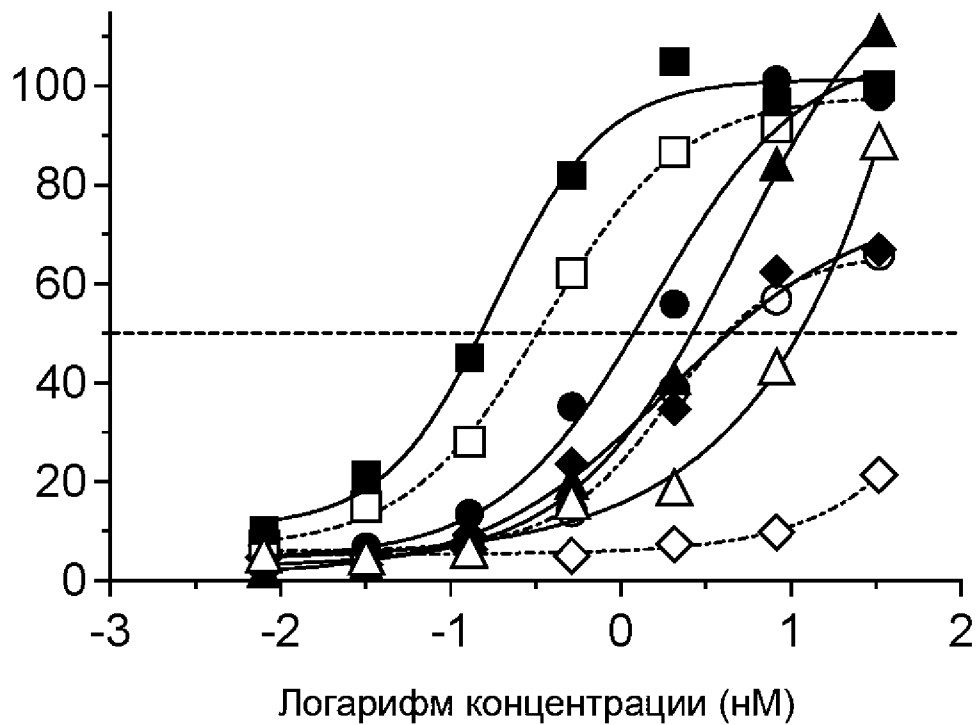
| | Контроль | Человеческий №4 | Макаки №4 | Крысиный №4 | Мышиный №4 |
|------|----------|-----------------|-----------|-------------|------------|
| EC50 | ~ 1.239 | 4.758 | 16.11 | 6.415 | 37.22 |



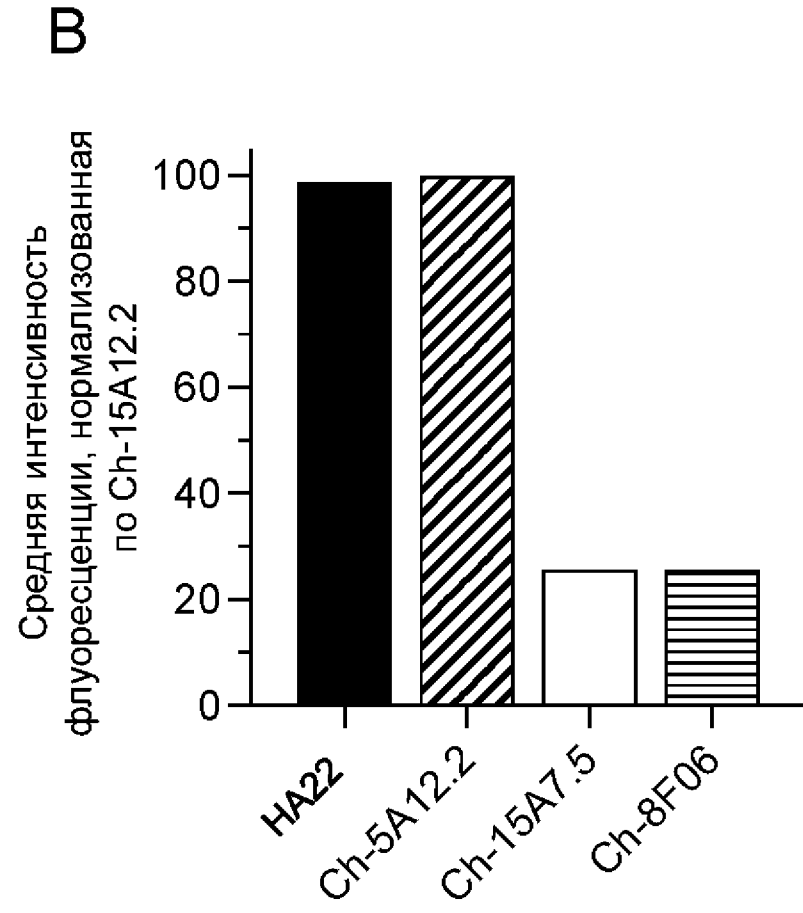
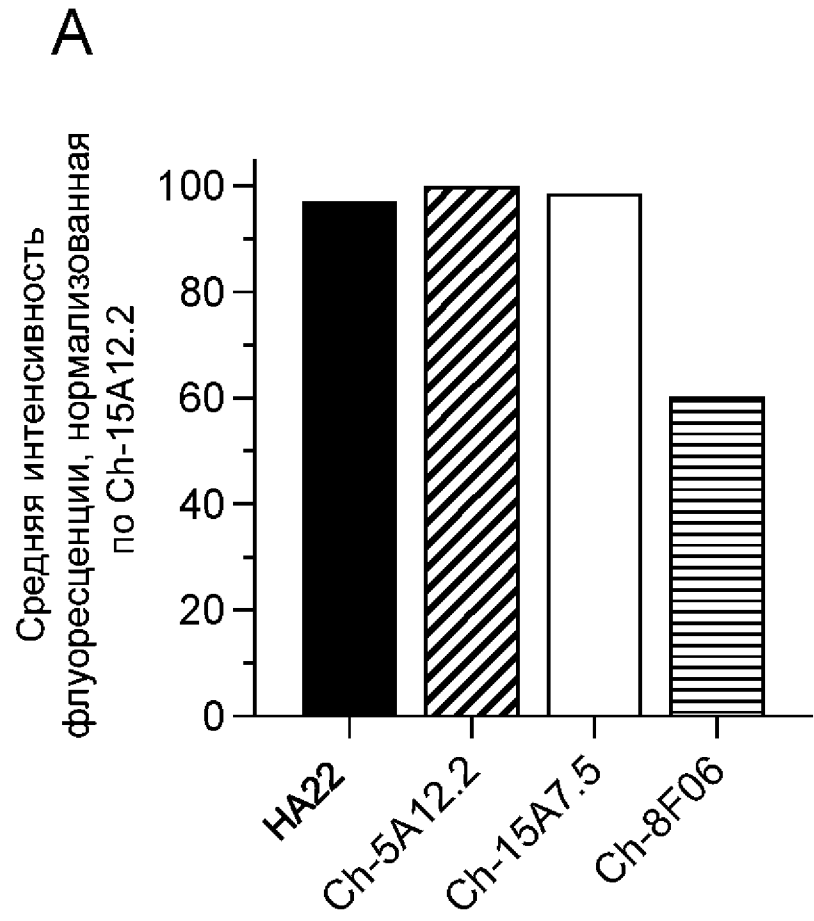
| | Контроль | Человеческий №4 | Макаки №4 | Крысиный №4 | Мышиный №4 |
|------|--------------|-----------------|-----------|-------------|------------|
| EC50 | ~ 2.662e-022 | 0.3456 | 0.06780 | 0.09696 | 41.09 |

Фиг. 5

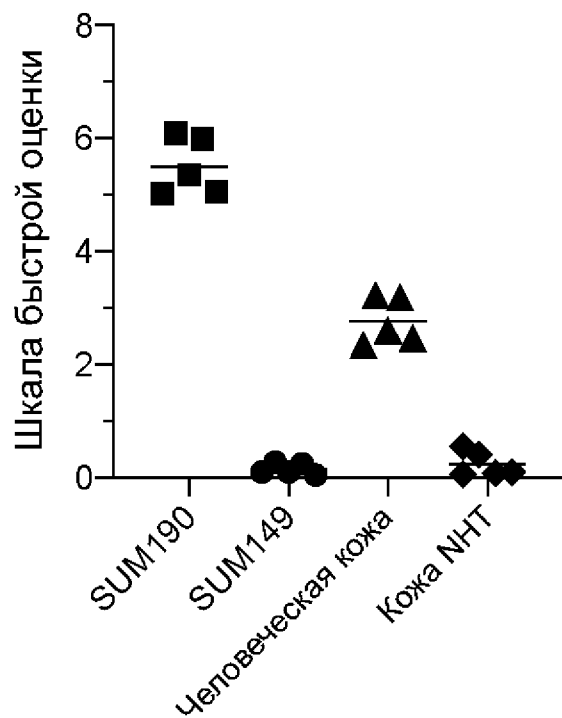
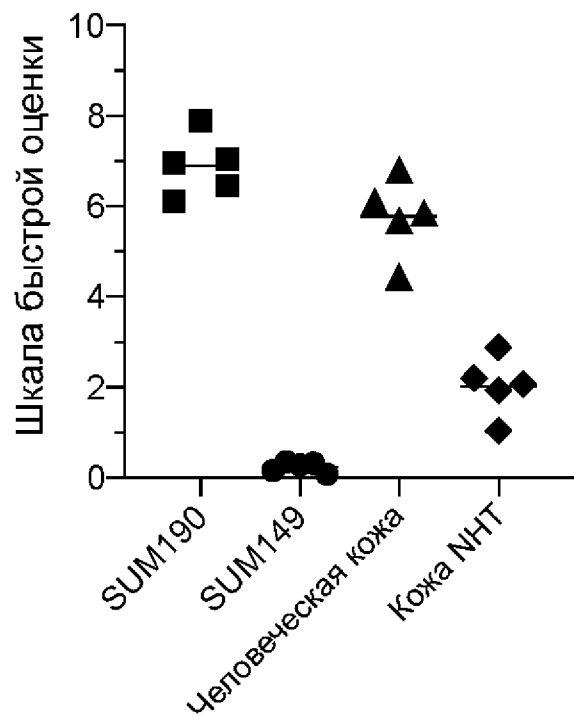
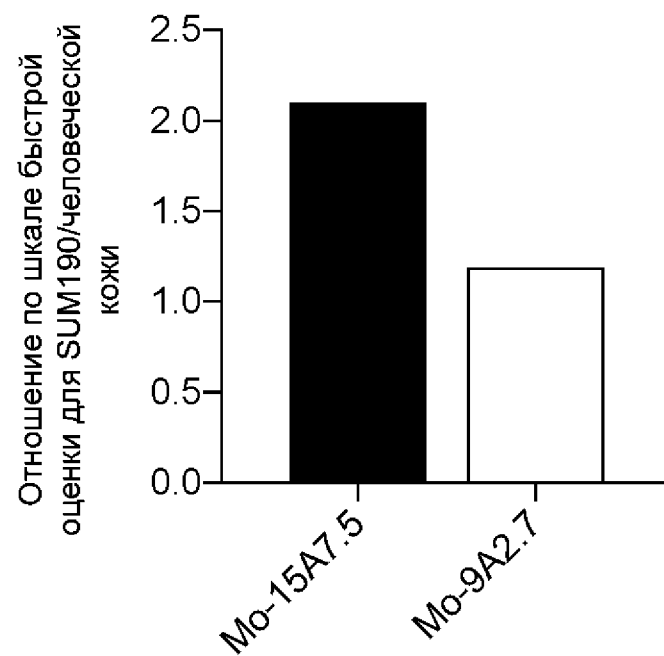
Средняя интенсивность флуоресценции,
нормализованная по HA22



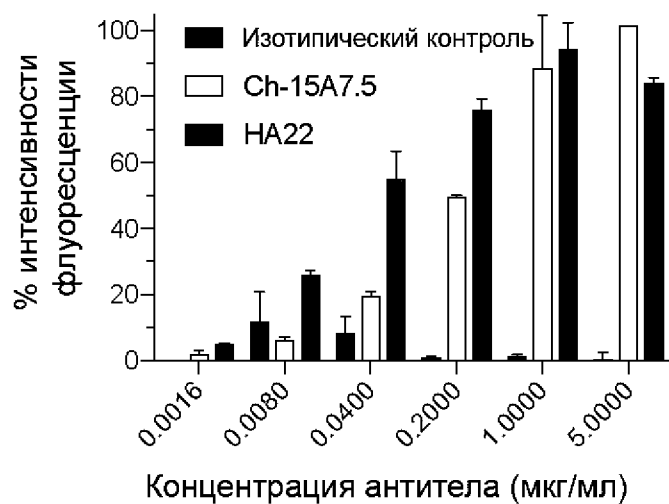
Фиг. 6



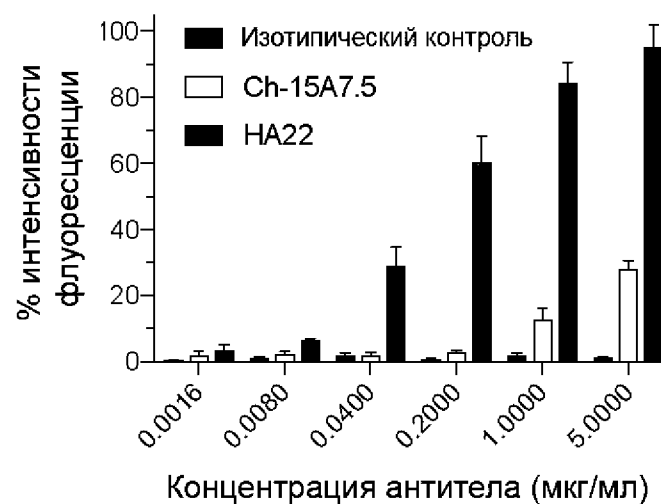
Фиг. 7

A**B****C****Фиг. 8**

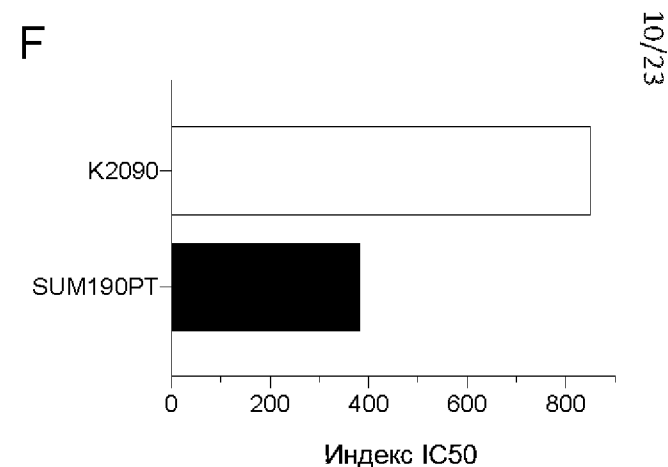
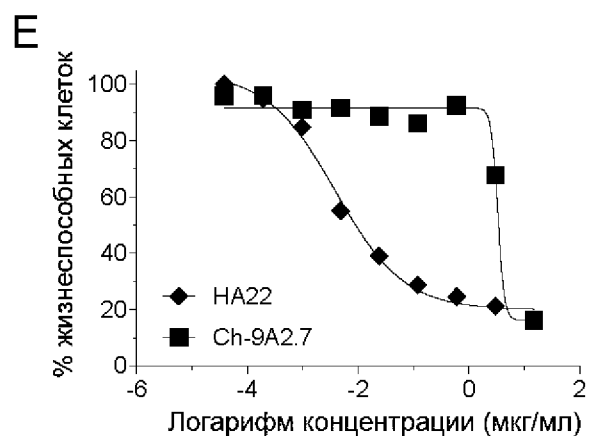
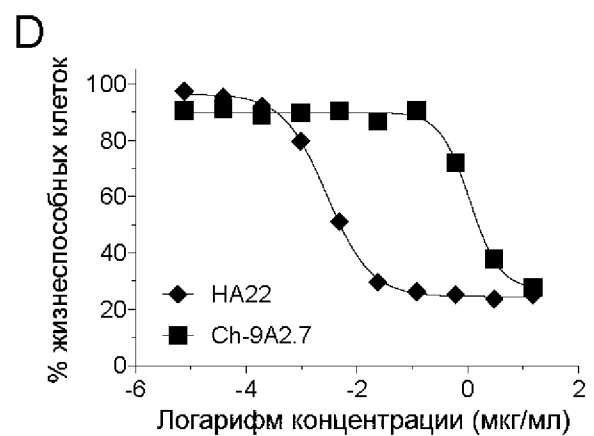
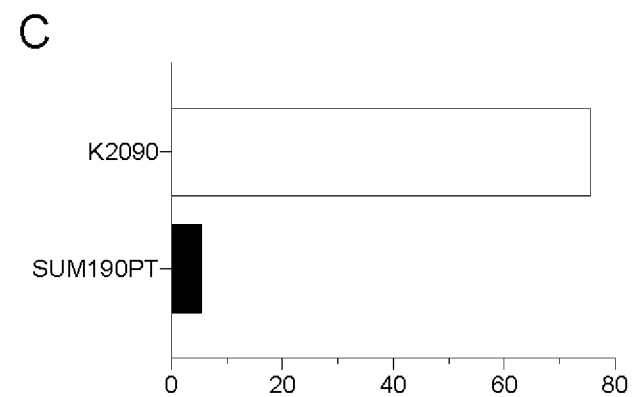
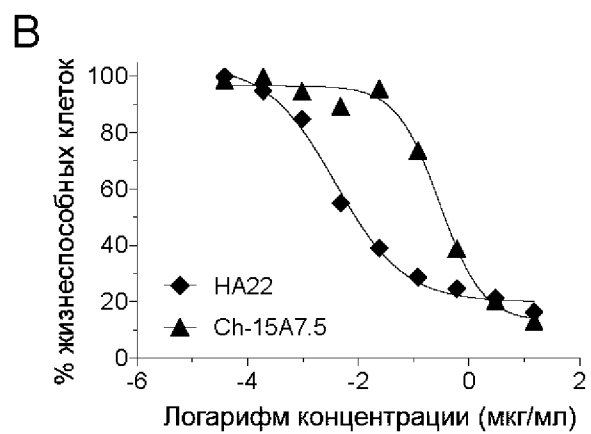
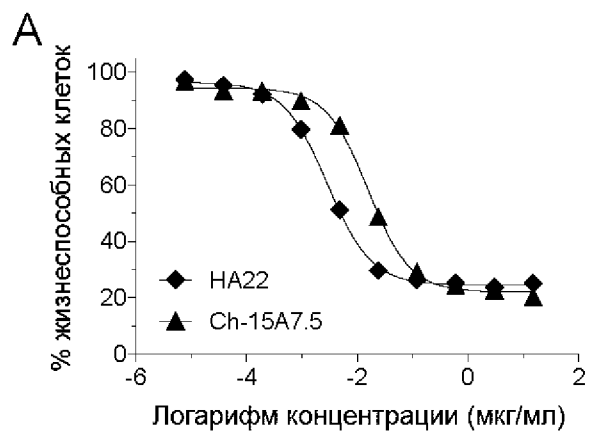
A



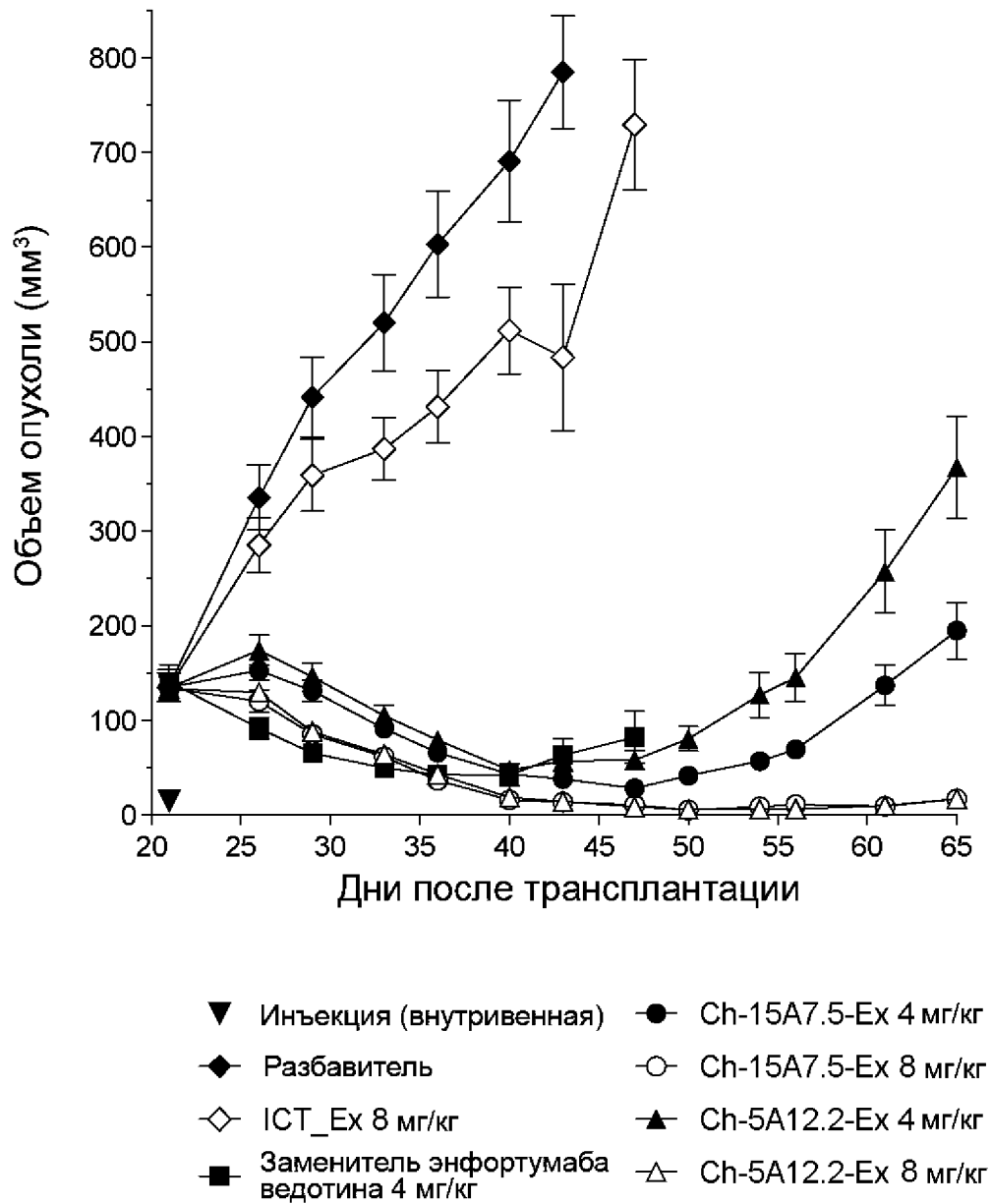
B



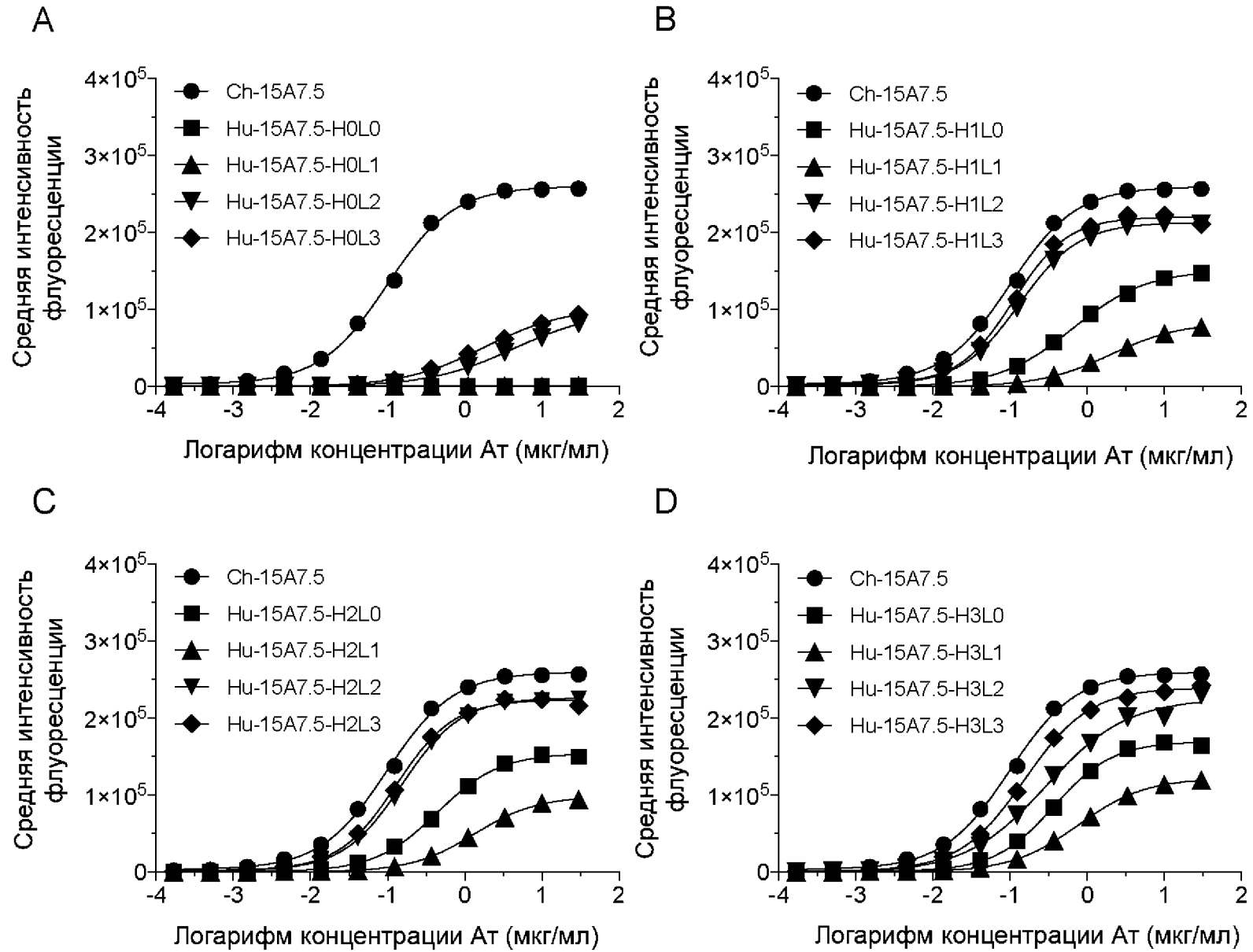
ФИГ. 9



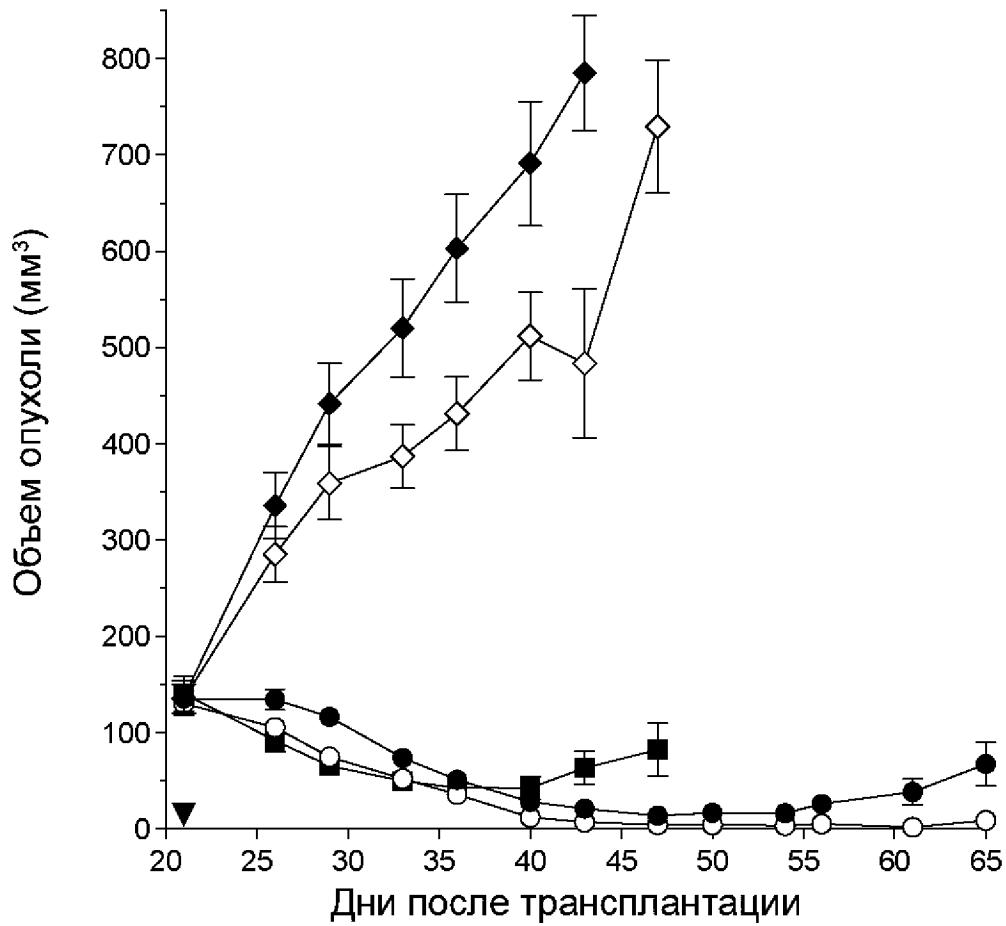
Фиг. 10



Фиг. 11

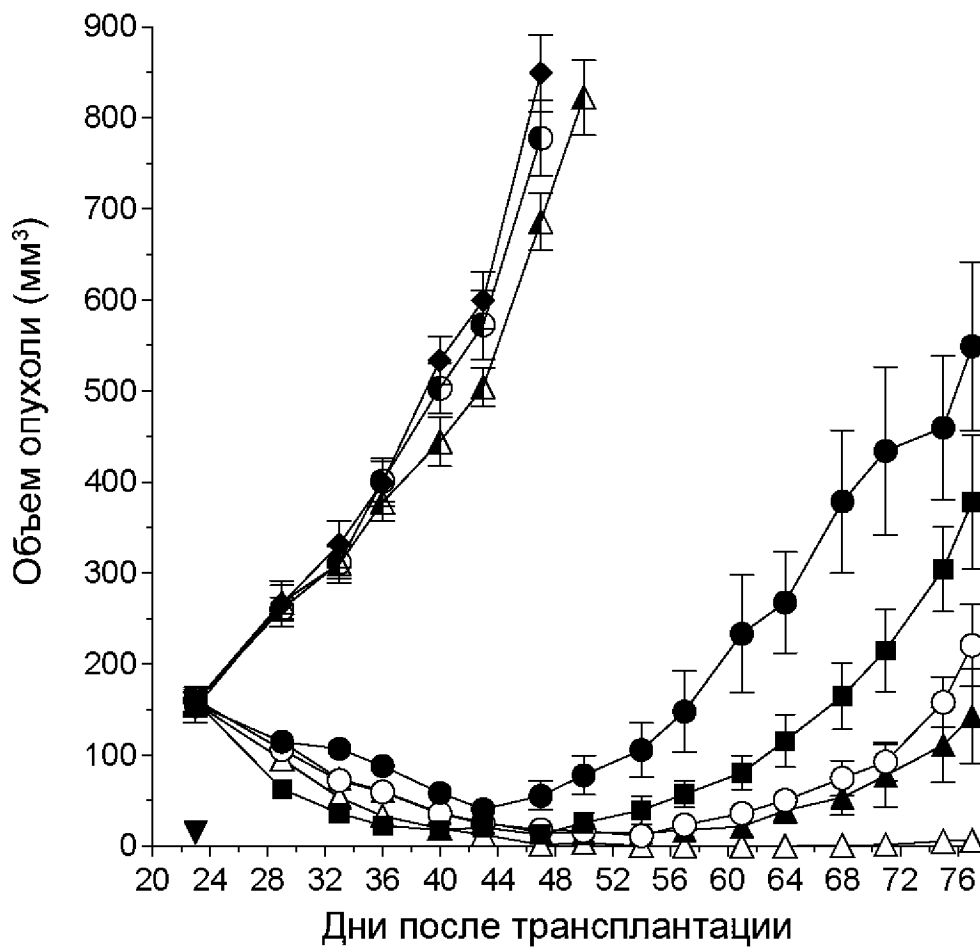


Фиг. 12



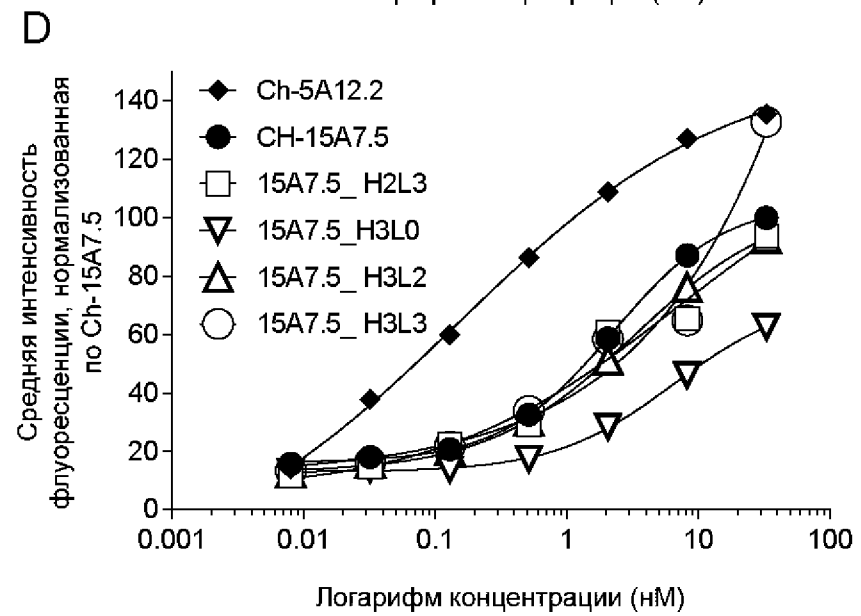
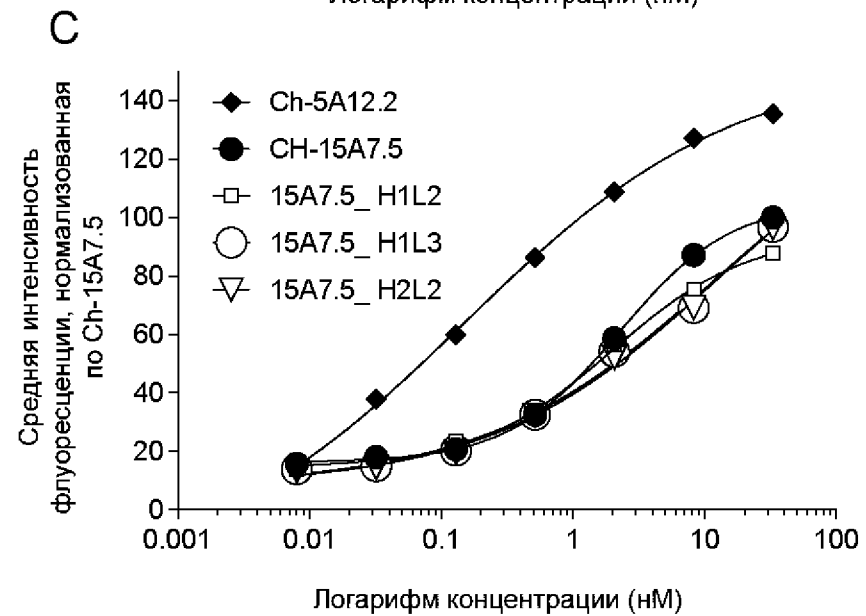
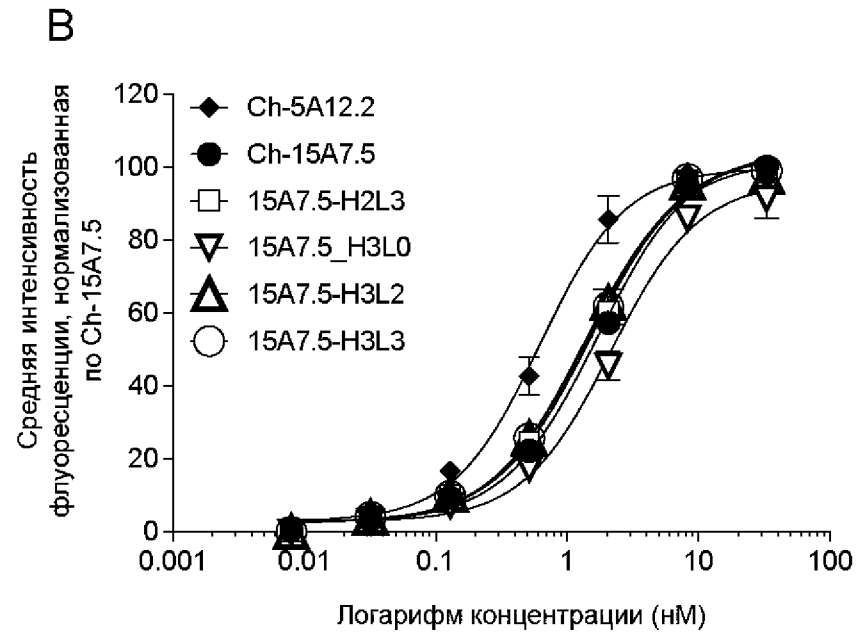
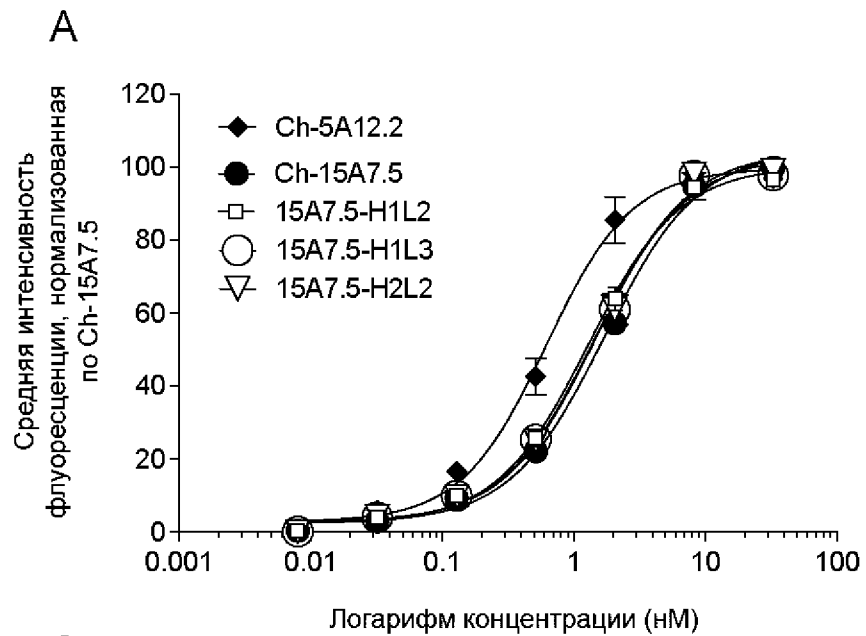
- ▼ Иъекция (внутривенная)
- ◆ Разбавитель
- ◇ ICT_Ex 8 мг/кг
- HA22-Ex 4 мг/кг
- Заменитель энфортумаба ведотина 4 мг/кг
- HA22-Ex 8 мг/кг

Фиг. 13



- △ HA22_Ex 8 мг/кг
- ▲ HA22_Ex 4 мг/кг
- HA22_Dxd 8 мг/кг
- HA22_Dxd 4 мг/кг
- ▼ Инъекция (внутривенная)
- ▲ ICT_Ex 8 мг/кг
- ⊕ ICT_Dxd 8 мг/кг
- EV 4 мг/кг
- ◆ Разбавитель

Фиг. 14



Фиг. 15

- Клон антитела 5A12.2

>VH_5A12.2

QIQLQQSGAELVKPGASVTLSCKTSGFTFNSMYISWLKQKPGQSLEWIAWIYAGTGGT
RFNQKFTGKVQLTVDTSSTAYMQFSSLTTDDSAIYYCAIRSGFVPMDYWGQGTSVTV
SS

>VK_5A12.2

SIVMTQTPKFLLSAGDRVTITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVP
DRFTGSGYGTDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSPWTFGGGKLEIK

CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 16

- Клон антитела 9A2.7

>VH_9A2.7

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYNFTTFWINWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSYA
NYNQKFKDKATLTVDKSSSTTAYMQLSSPTSEDSAVYYCTRPSYFGRNSFAYWGQGT^{LVTV}
SA

>VK_9A2.7

DIVMTQSPSSLVSVGEEKVTMSCKSSQSLLYSVNHKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWAST
RESGVPDRFTGSGSGTDFSLTISSVKAEDLAVYYCHQYYTYPLT^{FGAGTKLELK}

CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 17

- Клон антитела 3A1.4

>VH_3A1.4

DVQLQESGPSLVKPSQTL~~SLTCSVTGDSITSGYWNWIRKFP~~GNKLEYMGYISNSGITYYNPSLKS
RISITRDTSKNQYFLQLNSVTAEDTATYYCTTRFGSTMILYYTMDYWGQGTSVTVSS

>VK_3A1.4

DIVMTQSPVTL~~SVTPGDRVSLSCRASQ~~SISDYLHWYQQKSKQESPRLLIKYASKSISGIPSRFSGSG
SGSNFTLSINSVEPEDVGVYYCQNGHSFPLTFGAGTKLELK

CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 18

- Клон антитела 8F06

>VH_8F06

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYND
GTKYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCVTLFAYWGQGLTVSA

>VK_8F06

QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSISYMHWYQQKPGTSPKRWIYDTSKLAGVP
ARFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYPFTFGSGTKLEIK

CDR : Номенклатура IMGT

Фиг. 19

Гуманизированные варианты 15A7.5

> H0_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MWVVRQAPGK
GLEWV^SFISNLAYGI^NYADSVKGR^RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAE
DTAVYY^CAR^RGARATGWFAY^WGQGTLTVSS

> H1_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MA^WVRQAPGKG
LEWV^SFISNLAYGI^NYADTVIG^RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED
TAVYY^CAR^RGARATGWFAY^WGQGTLTVSS

> H2_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MA^WVRQAPGKG
LEWV^AFISNLAYGI^NYADTVIG^RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED
TAVYY^CAR^RGARATGWFAY^WGQGTLTVSS

> H3_15A7.5

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA^SGFTF^SNYG^MA^WVRQAPGKG
PEWV^AFISNLAYGI^NYADTVIG^RFTISRDNKNSLYLQMNSLRAED
TAVYY^CAR^RGARATGWFAY^WGQGTLTVSS

> L0_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA^SQNVDTH^VAWFQQKPGKAP
KSLI^YSAS^YLQSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQ
YNSYPLT^FGGGKVEIK

> L1_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC^CKA^SQNVDTH^VA^WFQQKPGKAP
KSLI^YSAS^YRYSG^VPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQ
YNSYPLT^FGGGKVEIK

> L2_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC^CKA^SQNVDTH^VA^WYQQKPGKAPK
ALI^YSAS^YRYSG^VPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQY
NSYPLT^FGGGKVEIK

> L3_15A7.5

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC^CKA^SQNVDTH^VA^WYQQKPGKSPK
ALI^YSAS^YRYSG^VPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYY^CQQY
NSYPLT^FGGGKVEIK

CDR: номенклатура IMGT/ номенклатура Kabat/ якорь IMGT и/или Kabat/
обратные мутации

20/23

Фиг. 20

Гуманизированные варианты 15A7.5

| Клон/вариант | KD (нМ) | Ka (1/Мо) | Kdis (1/с) | R² |
|--------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Ch-15A7.5 | 45.9 | 7.52 ^{E+04} | 3.45 ^{E-03} | 0.98 |
| 15A7.5_H1L2 | 52 | 8.01 ^{E+04} | 4.16 ^{E-03} | 0.97 |
| 15A7.5_H1L3 | 50 | 8.24 ^{E+04} | 4.12 ^{E-03} | 0.97 |
| 15A7.5_H2L2 | 59.7 | 7.79 ^{E+04} | 4.65 ^{E-03} | 0.97 |
| 15A7.5_H2L3 | 60 | 8.00 ^{E+04} | 4.80 ^{E-03} | 0.97 |
| 15A7.5_H3L2 | 55.5 | 8.81 ^{E+04} | 4.89 ^{E-03} | 0.97 |
| 15A7.5_H3L3 | 58.1 | 7.86 ^{E+04} | 4.57 ^{E-03} | 0.97 |
| 15A7.5_H0L3 | Нерелевантный | Нерелевантный | Нерелевантный | 0.92 |

Фиг. 21

- Клон исходного антитела 15A7.5

>VH_15A7.5

EVKLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSNYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISNLAYGI
NYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMRLRSEDTAMYYCARGGARATGWFAYWGQGT
LVTVSA

>VK_15A7.5

DIVMTQSQKFMSTSIGDRVSVTCKASQNVDTHVAWYQEKPGQSPKALIYSASYRYS
GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFCQQYNSYPLTFGGGTKLEIK

CDR : Номенклатура IMGT, *номенклатура Kabat*

>VH_HA22

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYNMNWVRQAPG
KGLEWWSYISSSSSTIYYADSVKGRFTISRDNAL
NSLSLQMNSLRDEDTAIVYYCARAYYYGMDVWGQGTTVTVSS

>VK_HA22

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISGWLAWYQQKPGKA
PKFLIYAASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSL
QPEDFATYYCQQANSFPPTFGGGGTKVEIK

Фиг. 23