

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491151** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.10.17

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

(22) Дата подачи заявки
2022.12.09

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CDH6 И ИХ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО-ЛЕКАРСТВЕННОЕ
СРЕДСТВО**

(31) **202111507685.5; PCT/CN2021/136994**

(32) **2021.12.10**

(33) **CN**

(86) **PCT/CN2022/137932**

(87) **WO 2023/104188 2023.06.15**

(71) Заявитель:
**МАЛТИТЮД ТЕРАПЬЮТИКС
ИНК. (CN)**

(72) Изобретатель:
**Мэн Сюнь, Лю Шу-Хуэй, Ши Цзин,
Ван Минцяо, Пань Жун, Цзян Юэюнь,
Ван Ицян, Ван Чжаохуэй (CN)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Изобретение относится к антигенсвязывающему белку, обладающему следующими свойствами: (а) специфически связывающемуся с CDH6, и (b) обладающему активностью, состоящей в интернализации в клетки, экспрессирующие CDH6, путем связывания с CDH6. Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое (который) специфически связывается с CDH6 и обладает активностью интернализации, фармацевтический продукт, содержащий указанный иммуноконъюгат и оказывающий терапевтическое действие на опухоль, способ лечения опухоли с использованием указанного иммуноконъюгата или фармацевтического продукта и т.п.

A1

202491151

202491151

A1

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CDH6 И ИХ КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛО – ЛЕКАРСТВЕННОЕ СРЕДСТВО

[0001] Настоящая заявка на патент испрашивает приоритет на основании заявки в рамках договора о патентной кооперации PCT/CN2021/136994, поданной 10 декабря 2021 года, и заявки CN2021115076855, поданной 10 декабря 2021 года. На основании указанных заявок испрашивается приоритет, и описания указанных предшествующих заявок считаются частью описания настоящей заявки, и содержание вышеупомянутых заявок полностью включено в настоящий документ.

[0002] Настоящая заявка включает посредством ссылки Перечень последовательностей, поданный вместе с настоящей заявкой в виде XML-файла под названием «0283-PA-002.xml», созданного 01 ноября 2022 года и имеющего размер 149 920 байтов.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] Кадгерин-6 (CDH6) специфически экспрессируется в головном мозге или почках на стадии развития и, как сообщается, играет важную роль в формировании контура центральной нервной системы и развитии нефронов в почках. Экспрессия CDH6 в нормальных тканях взрослого человека локализована в канальцах почки, эпителиальных клетках желчных протоков и т.п.

[0004] При этом известно, что CDH6 специфически сверхэкспрессируется в сайтах опухолей при некоторых типах рака взрослого возраста. Сообщалось о корреляции экспрессии CDH6 с плохим прогнозом, а также его применимости в качестве онкомаркера при почечно-клеточной карциноме человека, в частности, почечной светлоклеточной карциноме и папиллярной почечно-клеточной карциноме. Сообщалось также о высокой экспрессии CDH6 в связи с раком яичника у человека. Также сообщалось, что CDH6 вовлечен в эпителиально-мезенхимальный переход при раке щитовидной железы человека. Кроме того, сообщалось, что CDH6 также экспрессируется при раке желчных протоков человека и мелкоклеточном раке легких человека.

[0005] Конъюгаты антител – лекарственное средство («ADC») применяли для местной доставки цитотоксических агентов при лечении рака (см., например, Lambert, *Curr. Opinion In Pharmacology* 5: 543-549, 2005). ADC обеспечивают нацеленную доставку лекарственного

фрагмента, при которой может быть достигнута максимальная эффективность при минимальной токсичности. Хотя недавнее одобрение FDA шести новых конъюгатов антитело – лекарственное средство (ADC) является многообещающим, отсев ADC в ходе клинических исследований остается значительным.

[0006] DS-6000a, разработанный Daiichi Sankyo, является единственным известным конъюгатом направленного на CDH6 антитела с лекарственным средством (ADC) (на стадии фазы I клинических исследований). DS-6000a состоит из гуманизированного моноклонального антитела IgG1 против CDH6, присоединенного к рабочему веществу – ингибитору топоизомеразы I, производному экзатекана, через расщепляемый линкер на основе тетрапептида. DS-6000a не был одобрен при каких-либо показаниях ни в одной стране, и необходимо подтверждение его безопасности и эффективности.

[0007] Следовательно, сохраняется потребность в усовершенствованных способах лечения рака, резистентного или в значительной мере склонного к резистентности к ингибиторам тирозинкиназы, ингибиторам серин/треонин-киназы, и/или к химиотерапии, в частности, с применением CDH6-ADC.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0008] В настоящем документе предложен антигенсвязывающий белок, обладающий одним или более из следующих свойств:

- i) способность связываться с белком CDH6 с чувствительностью менее 12,5 нг/мл в ИФА ELISA;
- ii) способность связываться с белком CDH6 со значением KD ниже чем приблизительно $3,1 \times 10^{-9}$ М в ИФА ELISA; и
- iii) способность к интернализации в CDH6-экспрессирующую клетку после связывания с CDH6.

[0009] Согласно некоторым вариантам реализации CDH6 представляет собой белок CDH6 млекопитающего.

[00010] Согласно некоторым вариантам реализации CDH6 представляет собой белок CDH6 человека.

[00011] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок конкурирует за связывание с белком CDH6 с референсным антителом, при этом референсное

антитело содержит вариабельную область легкой цепи (VL) и вариабельную область тяжелой цепи (VH); при этом:

VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, а VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, а VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46.

[00012] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[00013] Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело содержит моноклональное антитело, поликлональное антитело, димер, мультимер, интактное антитело, антитело человека, гуманизованное антитело и/или химерное антитело.

[00014] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', Fv-фрагмент, F(ab')₂, scFv, di-scFv и/или dAb.

[00015] Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

[00016] Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело представляет собой химерное антитело, гуманизованное антитело и/или антитело человека.

[00017] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одну CDR (область, определяющую комплементарность) вариабельной области тяжелой цепи (VH), причем VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 103.

[00018] Согласно некоторым вариантам реализации указанные антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержат по меньшей мере одну CDR вариабельной области легкой цепи (VL), причем указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

[00019] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[00020] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO: 97.

[00021] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 98.

[00022] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 99.

[00023] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10.

[00024] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; или где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:

91; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99.

[00025] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR1, где С-конец HFR1 прямо или непрямо связан с N-концом HCDR1, и указанная HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 52.

[00026] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR2, при этом HFR2 расположена между HCDR1 и HCDR2, и HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 48.

[00027] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR3, при этом HFR3 расположена между HCDR2 и HCDR3, и HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 53.

[00028] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR4, при этом N-конец HFR4 прямо или непрямо связан с С-концом HCDR3, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 50.

[00029] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит каркасные области HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, при этом С-конец HFR1 прямо или непрямо связан с N-концом HCDR1, HFR2 расположен между HCDR1 и HCDR2, HFR3 расположен между HCDR2 и HCDR3, и N-конец HFR4 прямо или непрямо связан с С-концом HCDR3; при этом HFR1 содержит

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; или

hFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26; или

hFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26; или

hFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40; или

hFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50; или

hFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

[00030] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH, причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 103.

[00031] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит константную область тяжелой цепи антитела.

[00032] Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи антитела содержит константную область, происходящую из IgG человека; необязательно, указанная константная область тяжелой цепи антитела содержит константную область, происходящую из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

[00033] Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70.

[00034] Согласно некоторым вариантам реализации тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 87.

[00035] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 100.

[00036] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 101.

[00037] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 94 или SEQ ID NO: 102.

[00038] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2

содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94; или

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

[00039] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH и VL, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, а указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[00040] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH и VL, причем VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, и VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, причем HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

[00041] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR1, при этом С-конец LFR1 прямо или непрямо связан с N-концом LCDR1, и LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 64.

[00042] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR2, при этом LFR2 расположена между LCDR1 и LCDR2, и LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60.

[00043] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR3, LFR3 расположена между LCDR2 и LCDR3, и LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61.

[00044] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR4, при этом N-конец LFR4 прямо или непрямо связан с С-концом LCDR3, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 62.

[00045] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит каркасные области LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, при этом С-конец LFR1 прямо или непрямо соединен с N-концом LCDR1, LFR2 расположен между LCDR1 и LCDR2, LFR3 расположен между LCDR2 и LCDR3, и N-конец LFR4 прямо или непрямо соединен с С-концом LCDR3; при этом LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22; или LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31,

LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

[00046] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VL, причем указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

[00047] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит VH и VL, причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 18, а указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 46; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 68; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 69; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную

в SEQ ID NO: 96; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность,

представленную в SEQ ID NO: 104.

[00048] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит константную область легкой цепи антитела.

[00049] Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область легкой цепи антитела содержит константную область Ig_k человека или константную область Ig_λ человека.

[00050] Согласно некоторым вариантам реализации указанная константная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71.

[00051] Согласно некоторым вариантам реализации легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 88.

[00052] Согласно некоторым вариантам реализации указанный антигенсвязывающий белок содержит тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, причем указанная тяжелая цепь

антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, а указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73; или

при этом тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86; или

при этом тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81; или

при этом тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88.

[00053] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен антигенсвязывающий белок, который специфически связывает CDH6, содержащий

(i) VL, содержащую VL CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 18; и/или VH, содержащую VH CDR1, CDR2 и CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 23;

(ii) VL, содержащую VL CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 41; и/или VH, содержащую VH CDR1, CDR2 и CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 46;

(iii) VL, содержащую VL CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 66; и/или VH, содержащую VH CDR1, CDR2 и CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 68;

(iv) VL, содержащую VL CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 67; и/или VH, содержащую VH CDR1, CDR2 и CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 69;

(v) VL, содержащую VL CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 95; и/или VH, содержащую VH CDR1, CDR2 и CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 96; или

(vi) VL, содержащую VL CDR1, CDR2 и CDR3 из VL, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 103; и/или VH, содержащую VH CDR1, CDR2 и CDR3 из VH, имеющей аминокислотную последовательность, состоящую из SEQ ID NO: 104.

[00054] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен антигенсвязывающий белок, который конкурирует с антигенсвязывающим белком, предложенным в настоящем документе, за связывание с CDH6.

[00055] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен полипептид, содержащий антигенсвязывающий белок, описанный выше.

[00056] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена молекула или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антигенсвязывающий белок, описанный выше, или полипептид, описанный выше.

[00057] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен вектор, содержащий указанную молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше.

[00058] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена клетка, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше, или вектор, описанный выше, или экспрессирующий антигенсвязывающий белок, описанный выше, или полипептид, описанный выше.

[00059] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен способ получения антигенсвязывающего белка, описанного выше, причем способ включает культивирование клетки, описанной выше, в условиях, обеспечивающих экспрессию антигенсвязывающего белка, описанного выше.

[00060] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок, описанный выше, полипептид, описанный выше, молекулу нуклеиновой кислоты, описанную выше, вектор, описанный выше, и/или клетку, описанную выше, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.

[00061] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен набор, содержащий антигенсвязывающий белок, описанный выше, полипептид, описанный выше, или фармацевтическую композицию, описанную выше.

[00062] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложено применение антигенсвязывающего белка, описанного выше, полипептида, описанного выше, молекулы нуклеиновой кислоты, описанной выше, вектора, описанного выше, и/или клетки, описанной выше, и/или фармацевтической композиции, описанной выше, для получения медикамента для предотвращения и/или лечения заболевания или нарушения, связанного с CDH6.

[00063] Согласно некоторым вариантам реализации заболевание или нарушение, связанное с CDH6, включает опухоль.

[00064] Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль включает CDH6-экспрессирующую опухоль.

[00065] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак печени, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

[00066] Согласно некоторым вариантам реализации указанный медикамент также содержит дополнительный терапевтический агент.

[00067] Согласно другому аспекту настоящего изобретения предложен иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, содержащие антигенсвязывающий белок, описанный выше.

[00068] Согласно некоторым вариантам реализации указанные иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват дополнительно содержат активный фрагмент, конъюгированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[00069] Согласно некоторым вариантам реализации указанный активный фрагмент содержит лекарственный фрагмент и/или метку.

[00070] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный лекарственный фрагмент выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, цитокина, нуклеиновой кислоты, молекулы, ассоциированной с нуклеиновой кислотой, радионуклида, хемокина, иммуно(ко)стимулирующей молекулы, иммуносупрессивной молекулы, лиганда смерти, белка, индуцирующего апоптоз, киназы, пролекарство-превращающего фермента, РНКазы, агонистического антитела или фрагмента антитела, антагонистического антитела или

фрагмента антитела, фактора роста, гормона, фактора коагуляции, фибринолитического белка, пептидов, имитирующих их, и их фрагментов, слитых белков или их производных.

[00071] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанная метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, агента для визуализации и иона металла.

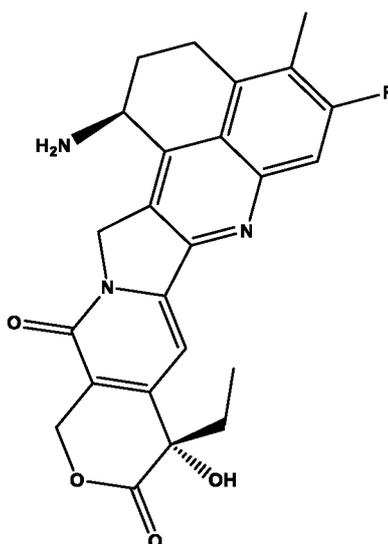
[00072] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный цитотоксический агент содержит лекарственное средство, разрушающее микротрубочки, и/или агент, повреждающий ДНК.

[00073] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный цитотоксический агент содержит ингибитор тубулина и/или ингибитор топоизомеразы.

[00074] Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент содержит ингибитор топоизомеразы I.

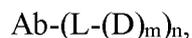
[00075] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный цитотоксический агент содержит камптотецин (СРТ) или его производное.

[00076] Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент содержит представленную ниже структуру формулы II или ее таутомер, мезомер, рацемат, энантиомер или диастереомер, или их смеси, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват:



(II)

[00077] Согласно некоторым вариантам реализации иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват содержат конъюгат антитело – лекарственное средство (ADC) формулы (I):



(I)

или его фармацевтически приемлемую соль; где:

Ab представляет собой антигенсвязывающий белок, описанный выше;

L представляет собой линкер;

D представляет собой лекарственный фрагмент;

m представляет собой целое число от 1 до 8; и

n представляет собой любое число от 1 до 10.

[00078] Согласно некоторым вариантам реализации L выбран из: расщепляемого линкера и нерасщепляемого линкера.

[00079] Согласно некоторым вариантам реализации L содержит расщепляемый пептид.

[00080] Согласно некоторым вариантам реализации расщепляемый пептид может быть расщеплен ферментом.

[00081] Согласно некоторым вариантам реализации указанный фермент содержит катепсин B.

[00082] Согласно некоторым вариантам реализации расщепляемый пептид или L содержит аминокислотную единицу.

[00083] Согласно некоторым вариантам реализации указанная аминокислотная единица содержит дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид.

[00084] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанная аминокислотная единица выбрана из: Val-Cit, Val-Ala (VA), Glu-Val-Cit, Ala-Ala-Asn (AAN), Gly-Val-Cit, Gly-Gly-Gly(GGG) и Gly-Gly-Phe-Gly(GGFG).

[00085] Согласно некоторым вариантам реализации L содержит спейсер.

[00086] Согласно некоторым вариантам реализации указанный спейсер включает саморасщепляющиеся спейсеры.

[00087] Согласно некоторым вариантам реализации указанный саморасщепляющийся спейсер содержит п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB).

[00088] Согласно некоторым вариантам реализации указанный расщепляемый пептид прямо присоединяется к спейсеру при сплайсинге.

[00089] Согласно некоторым вариантам реализации L содержит: -Val-Cit-PABC-, -Val-Ala-PABC-, -Glu-Val-Cit-PABC-, -Ala-Ala-Asn-PABC-, -Gly-Val-Cit-PABC-, -Gly-Gly-Gly-PABC-, -Gly-Gly-Phe-Gly-PABC-, -Val-Cit-PAB-, -Val-Ala-PAB-, -Glu-Val-Cit-PAB-, -Ala-Ala-Asn-PAB-, -Gly-Val-Cit-PAB-, -Gly-Gly-Gly-PAB- или -Gly-Gly-Phe-Gly-PAB-.

[00090] Согласно некоторым вариантам реализации спейсер содержит структуру, представленную $\text{-NH-(CH}_2\text{)}^{n^1}\text{-La-Lb-Lc-}$, где La представляет собой -O- или одинарную связь; Lb представляет собой $\text{-CR}^2\text{(-CR}^3\text{)-}$ или одинарную связь, где R^2 и R^3 каждый независимо представляет собой $\text{C}_1\text{-C}_6$ алкил, $\text{-(CH}_2\text{)}^{n^a}\text{-NH}_2$, $\text{-(CH}_2\text{)}^{n^b}\text{-COOH}$ или $\text{-(CH}_2\text{)}^{n^c}\text{-OH}$, n^1 представляет собой целое число от 0 до 6, n^a , n^b и n^c каждый независимо представляет собой целое число от 1 до 4, при этом R^2 и R^3 не являются одинаковыми, когда n^a равен 0, и Lc представляет собой -C(=O)- .

[00091] Согласно некоторым вариантам реализации спейсер содержит $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_3\text{-C(=O)-}$, $\text{-NH-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$ или $\text{-NH-(CH}_2\text{)}_2\text{-O-CH}_2\text{-C(=O)-}$.

[00092] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения L содержит структуру, представленную в $\text{-L}_1\text{-L}_2\text{-L}_3\text{-}$, где L_1 обозначает $\text{-(сукцинимидил-3-ил-N)-(CH}_2\text{)}^{n^2}\text{-C(=O)-}$, $\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-(CH}_2\text{)}^{n^3}\text{-C(=O)-}$ или $\text{-C(=O)-(CH}_2\text{)}^{n^4}\text{-C(=O)-}$, где n^2 обозначает целое число от 2 до 8, n^3 обозначает целое число от 1 до 8, и n^4 обозначает целое число от 1 до 8; L_2 обозначает аминокислотное звено; L_3 обозначает саморазлагающийся спейсер.

[00093] Согласно некоторым вариантам реализации L выбран из:

- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-PABC-}$;
- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-PABC-}$;
- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-PABC-}$;
- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-PABC-}$;
- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-PABC-}$;
- $\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-PABC-}$;
- $\text{C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-PABC-}$;
- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$;
- $\text{(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-GGFG-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-
 PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

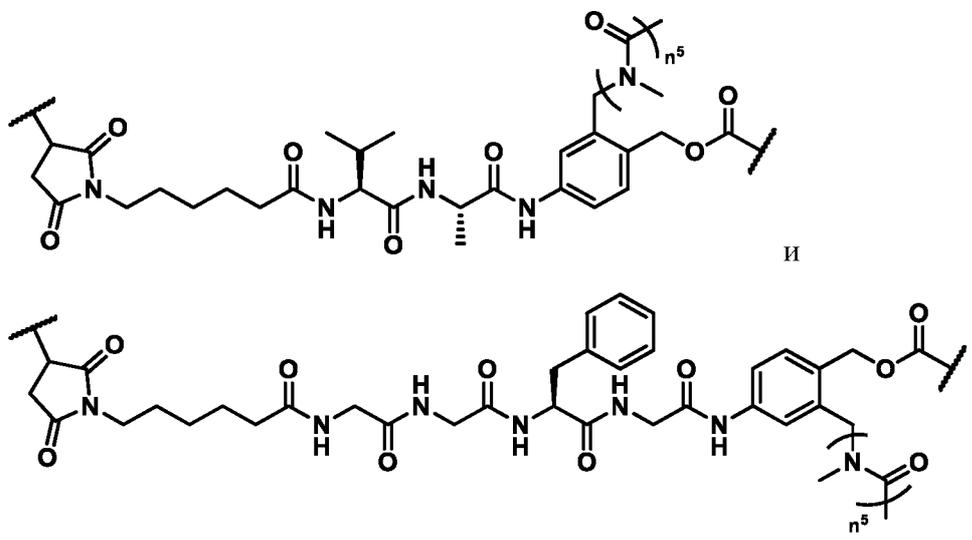
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-; и

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[00094] Согласно некоторым вариантам реализации п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB) содержит остаток полисаркозина (поли-N-метилглицина).

[00095] Согласно некоторым вариантам реализации L выбран из следующей структуры:



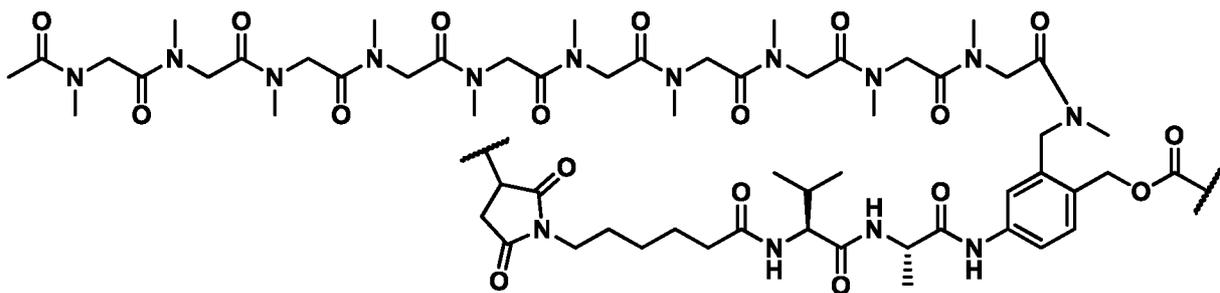
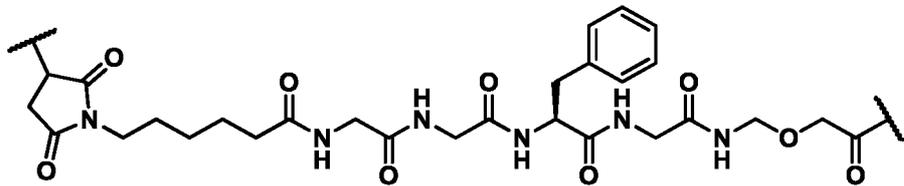
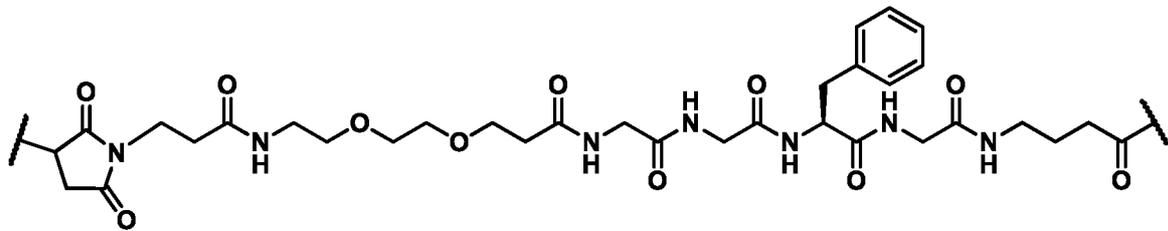
где n^5 обозначает целое число от 0 до 20.

[00096] Согласно некоторым вариантам реализации n^5 обозначает целое число от 1 до 15.

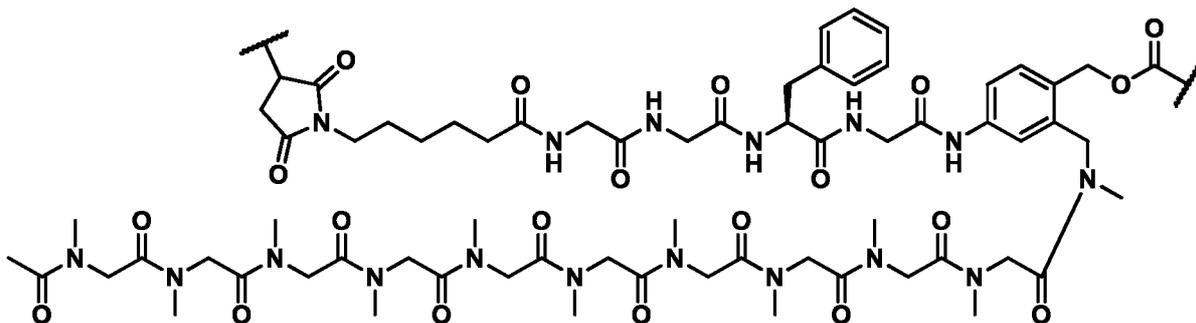
[00097] Согласно некоторым вариантам реализации n^5 обозначает целое число от 1 до 7.

[00098] Согласно некоторым вариантам реализации n^5 обозначает целое число от 8 до 15.

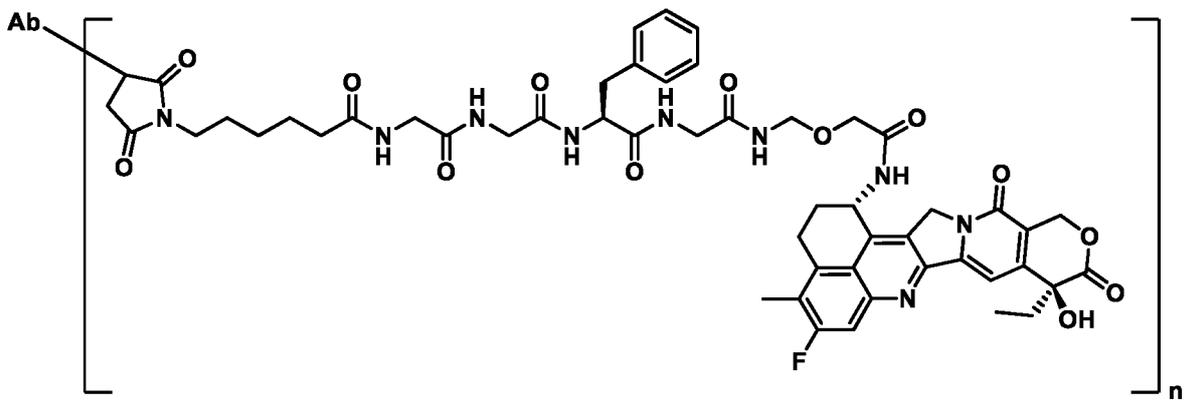
[00099] Согласно некоторым вариантам реализации L выбран из следующей структуры:

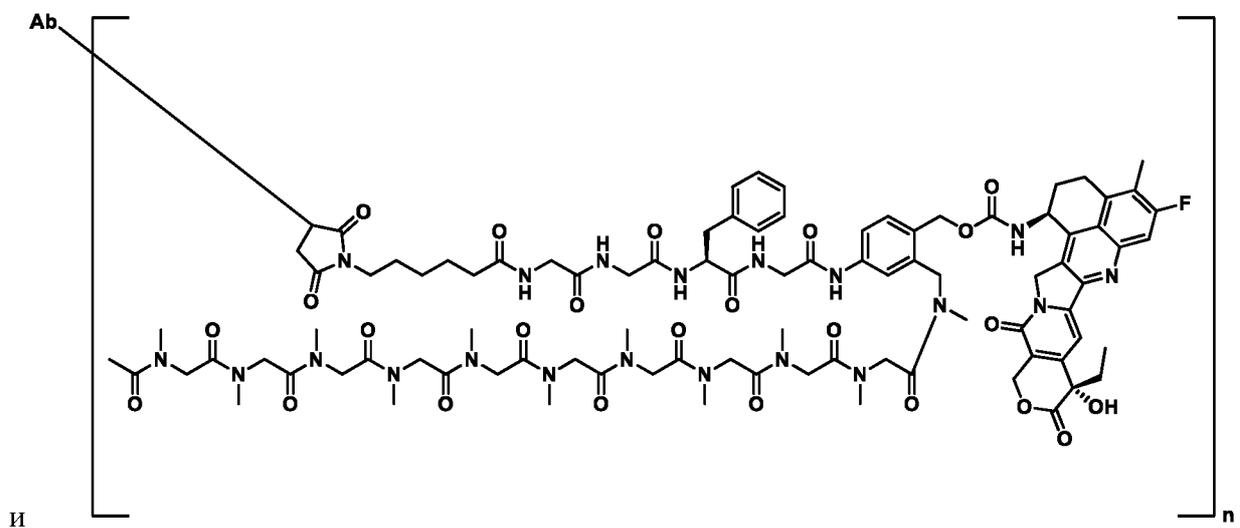
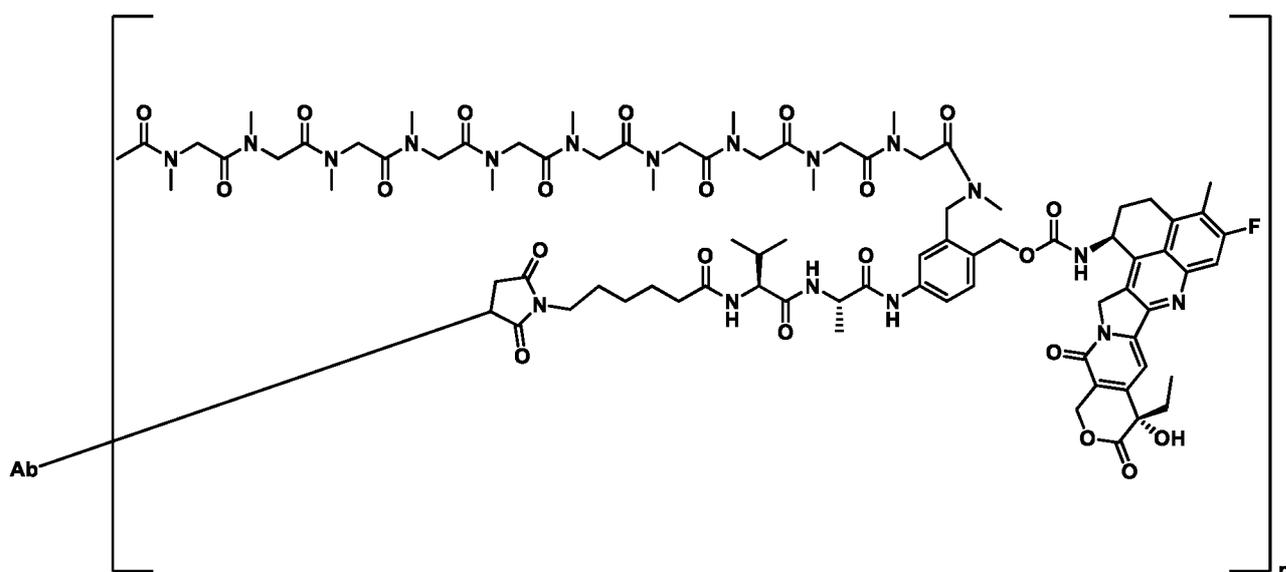
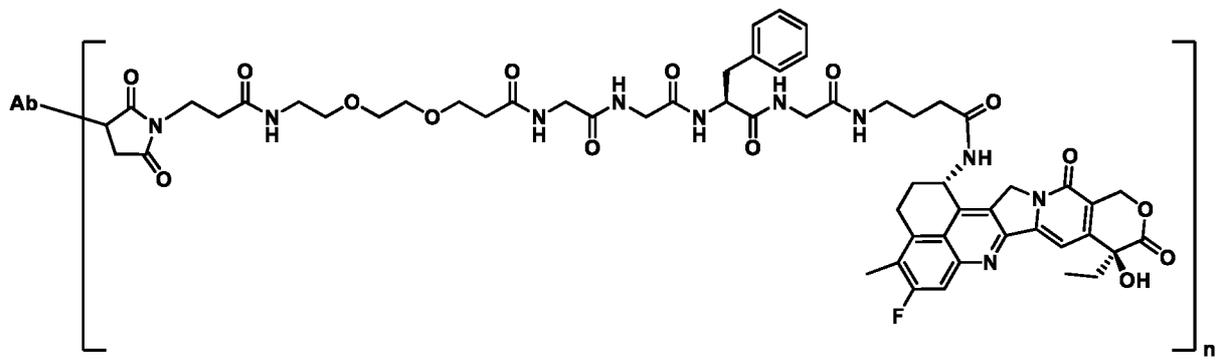


И



[000100] Согласно некоторым вариантам реализации конъюгат антитело – лекарственное средство выбран из следующей структуры:





где n представляет собой любое число от 1 до 10.

[000101] Согласно некоторым вариантам реализации n представляет собой любое число от 2 до 9.

[000102] Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ получения иммуноконъюгата по настоящему изобретению, включающий этап проведения реакции

антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению с промежуточным соединением лекарственное средство – линкер.

[000103] Согласно настоящему изобретению дополнительно предложена фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат по настоящему изобретению, его соль, или гидрат указанных конъюгата или соли.

[000104] Согласно некоторым вариантам реализации указанная фармацевтическая композиция дополнительно содержит фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[000105] Согласно настоящему изобретению дополнительно предложено применение иммуноконъюгата по настоящему изобретению или фармацевтической композиции по настоящему изобретению для изготовления лекарственного средства для лечения опухолей.

[000106] Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CDH6.

[000107] Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичников, серозную аденокарциному яичников, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легких, мелкоклеточный рак легких, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

[000108] Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ лечения опухоли, который включает введение субъекту иммуноконъюгата по настоящему изобретению, его соли, и/или гидрата указанных конъюгата или соли.

[000109] Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CDH6.

[000110] Согласно некоторым вариантам реализации указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичников, серозную аденокарциному яичников, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легких, мелкоклеточный рак легких, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

[000111] Согласно настоящему изобретению дополнительно предложен способ лечения опухоли, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей по

меньшей мере один компонент, выбранный из иммуноконъюгата по настоящему изобретению, его соли, и гидрата указанных конъюгата или соли, и по меньшей мере одного противоопухолевого лекарственного средства, одновременно, отдельно или последовательно.

Благоприятные эффекты, обеспечиваемые раскрытым изобретением

[000112] Можно ожидать, что конъюгат лекарственного средства с антителом к CDH6, содержащий антитело к CDH6 согласно настоящему изобретению, конъюгированное с лекарственным средством, проявляющим токсичность в клетках, посредством линкера, имеющего определенную структуру, обеспечит превосходный противоопухолевый эффект и безопасность при введении пациентам, имеющим раковые клетки, экспрессирующие CDH6. В частности, конъюгат антитела – лекарственное средство против CDH6 согласно настоящему изобретению подходит для применения в качестве противоопухолевого агента.

[000113] Дополнительные аспекты и преимущества настоящего изобретения будут совершенно очевидны специалистам в данной области техники после ознакомления с приведенным ниже подробным описанием, в котором представлены и описаны исключительно иллюстративные варианты реализации настоящего изобретения. Понятно, что настоящее изобретение предусматривает возможность других и отличающихся вариантов реализации, и некоторые его характеристики могут быть модифицированы в различных очевидных отношениях, во всех случаях без какого-либо отступления от настоящего изобретения. Соответственно, чертежи и описание следует рассматривать как иллюстративные, а не как ограничивающие.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

[000114] Все публикации, патенты и патентные заявки, упомянутые в настоящем документе, включены в него посредством ссылки в той же мере, как если бы каждая отдельная публикация, патент или патентная заявка на патент была конкретным образом отдельно указана как включенная посредством ссылки.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[000115] Новые признаки настоящего изобретения подробно описаны в прилагаемой формуле изобретения. Лучшего понимания признаков и преимуществ настоящего

изобретения можно достичь при обращении к подробному описанию ниже, в котором изложены иллюстративные варианты реализации, действующие принципы настоящего изобретения, и прилагаемым чертежам (также обозначенных как «фигуры» и «фиг.» в настоящем документе), где:

[000116] На фиг. 1А–1В приведены результаты проточно-цитометрического исследования связывания химерного антитела к CDH6 (Ch069707) и его гуманизированных вариантов (CL069707-H1L1, CL069707-H1L2, CL069707-H2L1, CL069707-H2L2) с линией клеток рака яичников OVCAR-3.

[000117] На фиг. 2 приведены результаты проточно-цитометрического исследования связывания химерного антитела против CDH6 (Ch069463) и его гуманизированных вариантов (CL069463-H1L1, CL069463-H2L2, CL069463-H2L3) с линией клеток рака яичников OVCAR-3.

[000118] На фиг. 3 показаны результаты ИФА ELISA для изучения связывания CL069707-H1L1 с рекомбинантным белком человека CDH6-ECD-His, CDH9-ECD-His и CDH10-ECD-His.

[000119] На фиг. 4 показаны результаты ИФА ELISA для изучения связывания CL069707-H1L1 с рекомбинантным белком CDH6-ECD-His человека, яванского макака, мыши и крысы.

[000120] На фиг. 5А приведена ЭХ-хроматограмма CL069707-H1L1, полученная по общей методике G.

[000121] На фиг. 5В приведена ГХ-хроматограмма CL069707-H1L1, полученная с применением общей методики H.

[000122] На фиг. 6А приведена ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-LP1, полученная по общей методике G.

[000123] На фиг. 6В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-LP1, полученная с применением общей методики H.

[000124] На фиг. 7А приведена ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-LP2, полученная по общей методике G.

[000125] На фиг. 7В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-LP2, полученная с применением общей методики H.

[000126] На фиг. 8А приведена ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-GGFG-DXd, полученная по общей методике G.

[000127] На фиг. 8В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-GGFG-DXd, полученная с применением общей методики Н.

[000128] На фиг. 9А приведена ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство DS-6000a, полученная по общей методике G.

[000129] На фиг. 9В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство DS-6000a, полученная с применением общей методики Н.

[000130] На фиг. 10А приведена ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство, референсного антитела-LP1, полученная с помощью общей методики G.

[000131] На фиг. 10В показана ГХ-хроматограмма референсного конъюгата антитело – лекарственное средство-LP1, полученная с применением общей методики Н.

[000132] На фиг. 11А приведена ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-LP1 человека, полученная с применением общей методики G.

[000133] На фиг. 11В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-LP1 человека, полученная с применением общей методики Н.

[000134] На фиг. 12А показана ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство, IgG-LP2 человека, полученная с помощью общей методики G.

[000135] На фиг. 12В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-LP2 человека, полученная с применением общей методики Н.

[000136] На фиг. 13А показана ЭХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство, IgG-GGFG-DXd человека, полученная с помощью общей методики G.

[000137] На фиг. 13В показана ГХ-хроматограмма конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-GGFG-DXd человека, полученная с применением общей методики Н.

[000138] На фиг. 14 показана интернализация CL069707-H1L1-LP1 клетками PA-1, OVCAR-3 и 786-О.

[000139] На фиг. 15А–15D представлены результаты оценки активности ингибирования роста клеток *in vitro* конъюгатами антитело к CDH6 – лекарственное средство (CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2, CL069707-H1L1-GGFG-DXd, CL069707-H1L2-GGFG-

DXd, CL069707-H2L1-GGFG-DXd, CL069707-H2L2-GGFG-DXd) в отношении линии CDH6-положительных опухолевых клеток OVCAR-3 и PA-1.

[000140] На фиг. 16А показаны результаты киллинговой активности *in vitro* в отношении клеток для антител против CDH6 (CL069707, CL069439, CL069066), конъюгированных с vs-MMAE.

[000141] На фиг. 16В показаны результаты киллинговой активности *in vitro* в отношении клеток для антител к CDH6 (CL069707, CL069439, CL069066), конъюгированных с GGFG-DXd.

[000142] На фиг. 17А показаны противоопухолевые эффекты *in vivo* 3 конъюгатов гуманизированных антител против CDH6 с лекарственным средством (CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2, CL069707-H1L1-GGFG-DXd).

[000143] На фиг. 17В показан эффект в отношении массы тела мышей 3 конъюгатов гуманизированных антител против CDH6 с лекарственным средством (CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2, CL069707-H1L1-GGFG-DXd). Оценку проводили с использованием моделей на животных, в которых CDH6-положительную клеточную линию тератомы яичников человека PA-1 инокулировали мышам с иммунодефицитом.

[000144] На фиг. 18А показано, что CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2 вызывали дозозависимую регрессию опухоли после введения однократной дозы. На фиг. 18В показан эффект различных доз CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2 в отношении массы тела мышей. Оценку проводили с использованием моделей на животных, в которых CDH6-положительную клеточную линию тератомы яичников человека PA-1 инокулировали мышам с иммунодефицитом.

[000145] На фиг. 19А показаны противоопухолевые эффекты CL069707-H1L1-LP1 *in vivo*. На фиг. 19В показан эффект однократной дозы CL069707-H1L1-LP1 в отношении массы тела мышей. Оценку проводили с использованием моделей на животных, в которых CDH6-положительную линию опухолевых клеток OVCAR-3 инокулировали мышам с иммунодефицитом.

[000146] На фиг. 20А показаны противоопухолевые эффекты CL069707-H1L1-LP1 *in vivo*. На фиг. 20В показан эффект CL069707-H1L1-LP1 в отношении массы тела мышей. Оценку

проводили с использованием моделей на животных, в которых CDH6-положительную линию опухолевых клеток 786-О инокулировали мышам с иммунодефицитом.

[000147] На фиг. 21А показаны противоопухолевые эффекты CL069707-H1L1-LP1 in vivo. На фиг. 21В показан эффект CL069707-H1L1-LP1 в отношении массы тела мышей. Оценку проводили с использованием модели ксенотрансплантата, происходящего от пациента с карциномой почки (PDX).

[000148] На фиг. 22А–22С показана структура CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2 и CL069707-H1L1-GGFG-DXd.

[000149] На фиг. 23 представлена чувствительность детекции для связывания антитела, описанного в настоящем документе, с антигеном CDH6.

[000150] На фиг. 24 показано специфическое распознавание антигена CDH6, экспрессируемого на поверхности клетки, антителом, описанным в настоящем документе.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[000151] Хотя в настоящем документе были показаны и описаны различные варианты реализации настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты реализации представлены исключительно в качестве примеров. Специалисты в данной области техники смогут представить многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от сути настоящего изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы вариантам реализации изобретения, описанным в настоящем документе.

Определения

[000152] Если не указано иное, следующие термины и фразы в настоящем документе имеют следующие значения:

[000153] В настоящем документе термин «алкил» относится в общем к одновалентной насыщенной углеводородной цепи, имеющей указанное количество атомов углерода.

Например, C1-C6 алкил относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 6 атомов углерода. Алкильные группы могут быть линейными или разветвленными.

Репрезентативные разветвленные алкильные группы имеют одну, две или три боковых цепи. Примеры алкильных групп включают, не ограничиваясь перечисленными: метил,

этил, пропил (н-пропил и изопропил), бутил (н-бутил, изобутил, втор -бутил и трет-бутил), пентил (н-пентил, изопентил и неопентил) и гексил.

[000154] В настоящем документе термин «антитело» используется в общем для обозначения полипептида семейства иммуноглобулинов, который способен нековалентно, обратимо и специфическим образом связывать соответствующий антиген. Например, встречающееся в природе антитело IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменную область тяжелой цепи (сокращенно VH) и константную область тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи содержит три домена, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (сокращенно VL) и константную область легкой цепи. Константная область легкой цепи содержит один домен, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на области гипервариабельности, называемые определяющими комплементарность областями (CDR), перемежающиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от аминоконца к карбоксильному концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3 и FR4. Вариабельные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[000155] Термин «антитело» включает, не ограничиваясь перечисленными, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, антитела верблюдовых и химерные антитела. Антитела могут относиться к любому изотипу/классу (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подклассу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

[000156] В настоящем документе термин «определяющие комплементарность домены» используется взаимозаменяемо с термином «определяющие комплементарность области» («CDR») и в общем относится к гипервариабельным областям VL и VH. CDR

представляют собой сайт связывания целевого белка с цепями антител, который обладает специфичностью к такому целевому белку. В каждой VL или VH человека имеется три CDR (CDR1-3, пронумерованные последовательно от N-конца), составляющие около 15–20% вариабельных доменов. CDR могут называться исходя из области и порядка расположения. Например, и «VH CDR1», и «HCDR1» относятся к первой CDR вариабельной области тяжелой цепи. CDR структурно комплементарны эпитопу целевого белка и, таким образом, непосредственно отвечают за специфичность связывания. Остальные отрезки VL или VH, так называемые каркасные области, демонстрируют меньшую вариативность аминокислотной последовательности (Kuby, Immunology, 4th ed., Chapter 4. W.H. Freeman & Co., New York, 2000). В данной области техники CDR антитела может быть определена различными способами, такими как правило определения по Kabat, основанное на вариабельности последовательности (см. Kabat et al., protein sequence in immunology, 5th edition, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland (1991), правило определения по Chothia, основанное на положении области структурной петли (см. Al-Lazikani et al., JMol Biol 273:927-48, 1997) и правило определения IMGT, основанное на концепции IMGT-ONTOLOGY и правилах IMGT Scientific chart. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения для определения CDR антитела используются правила IMGT. В эту заявку также включены правила по Martin, PyIgClassify и объединенные правила определения по Kabat, Chothia, IMGT, Martin и PyIgClassify. (см. Mark L. Chiu et al., Antibodies 8(4), 55, 2019).

[000157] Таблица А. Системы нумерации аминокислот для каждой области (согласно нумерации Chothia)

CDR	Kabat	Chothia	IMGT	Martin	PyIgClassify	Комбинированная
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L27-L32	L24-L34	L24-L34	L24-L34
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L50-L56	L49-L56	L49-L56
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L97
HCDR1	H31-H35	H26-H32	H26-H33	H26-H35	H23-H35	H23-H35
HCDR2	H50-H65	H52-H56	H51-H57	H50-H58	H50-H58	H50-H65

HCDR3	H95- H102	H95-H102	H93-H102	H95- H102	H93-H102	H93-H102
-------	--------------	----------	----------	--------------	----------	----------

[000158] При этом Laa-Lbb или Naa-Hbb может относиться, при нумерации с N-конца, к аминокислотной последовательности от №«aa» до №«bb» легкой цепи или тяжелой цепи, соответственно. Например, L24-L34 относится к аминокислотной последовательности от положения №24 до положения №34 легкой цепи.

[000159] Как легкие, так и тяжелые цепи делят на области структурной и функциональной гомологии. Используют термины «константная» и «вариабельная» в функциональном смысле. В этой связи следует понимать, что вариабельные домены частей как легких (VL), так и тяжелых (VH) цепей определяют распознавание антигена и специфичность. Напротив, константные домены легкой цепи (CL) и тяжелой цепи (CH1, CH2 или CH3) обеспечивают важные биологические свойства, такие как секреция, трансплацентарная мобильность, связывание Fc-рецептора, связывание комплемента и т.п. По принятому соглашению нумерация доменов константной области увеличивается по мере отдаления от антигенсвязывающего сайта или аминоконца антитела. N-конец является вариабельной областью, а C-конец является константной областью; домены CH3 и CL фактически содержат карбоксиконцевые домены тяжелых и легких цепей, соответственно.

[000160] В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» в общем используется для обозначения полипептида, включающего одну или более частей антитела, которые сохраняют способность специфически взаимодействовать (например, посредством связывания, стерического затруднения, стабилизации/дестабилизации, пространственного распределения) с эпитопом антигена. Примеры связывающих фрагментов включают, не ограничиваясь перечисленными, одноцепочечные Fv (scFv), связанные дисульфидной связью Fv (sdFv), Fab-фрагменты, F(ab')-фрагменты, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов VL, VH, CL и CH1; F(ab')₂-фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов VH и CH1; Fv-фрагмент, состоящий из доменов VL и VH одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989), который состоит из домена VH; и выделенной

определяющей комплементарность области (CDR) или других связывающих эпитопы фрагментов антитела.

[000161] Антигенсвязывающие фрагменты также включают однодоменные антитела, макситела, минитела, нанотела, интратела, диатела, триатела, тетратела и бис-scFv (см., например, Hollinger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23: 1126-1136, 2005).

Антигенсвязывающие фрагменты также могут содержать одноцепочечные молекулы, содержащие пару тандемных Fv-сегментов (VH-CH1-VH-CH1), которые вместе с комплементарными полипептидами легкой цепи образуют пару антигенсвязывающих областей (Zapata et al, *Protein Eng.* 8: 1057-1062, 1995). Фрагмент обычного антитела также может представлять собой однодоменное антитело, такое как антитело из тяжелой цепи или VHH.

[000162] В настоящем документе термин «моноклональное антитело» используется в общем для обозначения полипептидов, в том числе антител и антигенсвязывающих фрагментов, которые имеют по существу идентичную аминокислотную последовательность или происходят из одного и того же генетического источника.

Указанный термин также включает мономолекулярные составы с молекулами антител. Композиция моноклонального антитела проявляет моноспецифичность связывания и аффинность в отношении конкретного эпитопа.

[000163] В настоящем документе термин «гуманизованное антитело» относится в общем к антителу, которое включает последовательности переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, происходящие из видов, не являющихся человеком (например, мышей), но по меньшей мере часть последовательностей VH и/или VL в нем изменена для сходства с переменными последовательностями зародышевой линии человека. Например, термин «гуманизованное антитело» относится к антителу или его варианту, производному, аналогу или фрагменту, которые могут связываться с родственным антигеном с иммунной специфичностью и включают каркасную область (FR), которая по существу включает последовательность аминокислот антитела человека, и определяющую комплементарность область (CDR), которая по существу включает последовательность аминокислот антитела, не являющегося антителом человека.

Применительно к CDR термин «по существу» означает, что аминокислотная

последовательность CDR по меньшей мере на 80%, например, по меньшей мере на 85%, по меньшей мере на 90%, по меньшей мере на 95%, по меньшей мере на 98% или по меньшей мере на 99% идентична аминокислотной последовательности CDR антитела, не являющегося антителом человека. Гуманизированные антитела включают по существу один, обычно два переменных домена (Fab, Fab', F(ab')₂, Fab, Fv), где все или по существу все области CDR соответствуют областям CDR иммуноглобулина, не являющегося Ig человека, и все или по существу все каркасные области представляют собой каркасные области с консенсусной последовательностью иммуноглобулина человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанное гуманизированное антитело может дополнительно включать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), как правило, константной области иммуноглобулина человека.

[000164] В настоящем документе термин «антитело человека» в общем относится к антителу с переменными и константными областями, происходящими из последовательности иммуноглобулина зародышевой линии человека. Антитела человека хорошо известны на существующем уровне техники (например, см. источник: van Dijk, M.A., van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5 (2001)368-374). Антитела человека также могут быть продуцированы в трансгенных животных (например, мышах), которые могут продуцировать полный или выбранный набор антител человека при отсутствии продуцируемого эндогенного иммуноглобулина после иммунизации (например, см. источники: Jakobovits, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90(1993)2551-2555; Jakobovits, A. et al., *Nature* 362(1993)255-258; Brueggemann, M. et al., *Year Immunol.* 7(1993)33-40). Антитела человека также могут быть получены в библиотеке фагового дисплея (например, см. источники: Hoogenboom, H.R. and Winter, G., *J. Mol. Biol.* 227(1992)381-388; Marks, J.D. et al., *J. Mol. Biol.* 222(1991)581-597). Термин «антитело человека» также может включать антитела, модифицированные в константных областях.

[000165] В настоящем документе термин «химерное антитело» в общем относится к сконструированному антителу, которое в самом широком смысле содержит одну или более областей из одного антитела и одну или более областей из одного или более других антител. В частности, химерное антитело содержит домен VH и домен VL антитела, происходящего от животного, не являющегося человеком, в сочетании с доменом CH и

доменом CL другого антитела, в частности, антитела человека. В качестве животного, не являющегося человеком, можно использовать любое животное, такое как мышь, крыса, хомяк, кролик или т.п. Химерное антитело также может представлять собой мультиспецифическое антитело, обладающее специфичностью по меньшей мере к двум разным антигенам.

[000166] Под терминами «очищенный» и «выделенный» применительно к полипептиду (т.е. антителу по изобретению) или нуклеотидной последовательности подразумевается присутствие указанной молекулы при отсутствии по существу других биологических макромолекул того же типа. В настоящем документе термин «очищенный», в частности, означает наличие по меньшей мере 75%, 85%, 95% или 98% по массе биологических макромолекул одного и того же типа. «Выделенная» молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует конкретный полипептид, относится к молекуле нуклеиновой кислоты, которая по существу не содержит других молекул нуклеиновой кислоты, которые не кодируют рассматриваемый полипептид; однако указанная молекула может включать некоторые дополнительные основания или фрагменты, которые не оказывают пагубного воздействия на основные характеристики композиции. Настоящее изобретение может включать, например, выделенный антигенсвязывающий белок, выделенное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выделенный полипептид, выделенную молекулу/молекулы нуклеиновой кислоты.

[000167] В настоящем документе термин «аффинность» в общем определяется равновесным связыванием между целым антителом и антигеном. Аффинность может быть выражена, например, в виде полумаксимальной эффективной концентрации (EC50) или равновесной константы диссоциации (KD). Аффинность можно экспериментально оценить различными известными способами, такими как измерение скорости связывания и диссоциации методом поверхностного плазмонного резонанса, или измерение EC50 в иммунохимическом анализе (ELISA, FACS).

[000168] «Полумаксимальная эффективная концентрация» или «EC50» в общем относится к концентрации лекарственного средства, антитела или токсина, которая индуцирует промежуточный ответ между базовым уровнем и максимумом после

определенного времени воздействия. EC50 и аффинность находятся в обратной зависимости, чем ниже значение EC50, тем выше аффинность антитела.

[000169] «KD» представляет собой равновесную константу диссоциации, отношение koff/кон, для антитела и его антигена. KD и аффинность обратно пропорциональны. Значение KD относится к концентрации антитела; чем ниже значение KD, тем выше аффинность антитела. Антитела согласно настоящему изобретению, как правило, имеют равновесную константу диссоциации менее чем приблизительно 10^{-7} М или 10^{-8} М, например, менее чем приблизительно 10^{-9} М или 10^{-10} М, согласно некоторым аспектам менее чем приблизительно 10^{-11} М, 10^{-12} М или 10^{-13} М.

[000170] Термин «консервативно модифицированный вариант» относится как к аминокислотным, так и к нуклеотидным последовательностям. Применительно к конкретным последовательностям нуклеиновых кислот консервативно модифицированный вариант относится к таким нуклеиновым кислотам, которые кодируют идентичные или по существу идентичные аминокислотные последовательности, или, в случаях, когда нуклеиновая кислота не кодирует аминокислотную последовательность, к по существу идентичным последовательностям. Из-за вырожденности генетического кода любой заданный белок кодируют значительное число функционально идентичных нуклеиновых кислот. Например, все из кодонов GCA, GCC, GCG и GCU кодируют аминокислоту аланин. Таким образом, в каждом из положений, где кодон определяет аланин, указанный кодон может быть изменен на любой из соответствующих описанных кодонов без изменения кодируемого полипептида. Такие варианты нуклеиновых кислот представляют собой «молчащие варианты», которые представляют собой один из видов консервативно модифицированных вариантов. Каждая последовательность нуклеиновой кислоты в настоящем документе, которая кодирует полипептид, также описывает все возможные молчащие варианты нуклеиновой кислоты. Специалистам в данной области техники будет понятно, что каждый кодон в нуклеиновой кислоте (за исключением AUG, который обычно является единственным кодоном для метионина, и TGG, который обычно является единственным кодоном для триптофана) может быть модифицирован с получением функционально идентичной молекулы. Соответственно, каждая описанная

последовательность подразумевает и наличие всех молчащих вариантов нуклеиновой кислоты, которая кодирует полипептид.

[000171] Для полипептидных последовательностей «консервативно модифицированные варианты» включают индивидуальные замены, делеции или добавления в полипептидную последовательность, которые приводят к замене аминокислоты химически аналогичной аминокислотой. Таблицы консервативных замен, обеспечивающих функционально аналогичные аминокислоты, хорошо известны в данной области техники. Такие консервативно модифицированные варианты дополняют, а не исключают полиморфные варианты, межвидовые гомологи и аллели. Указанные ниже восемь групп содержат аминокислоты, которые являются консервативными заменами друг для друга: 1) аланин (A), глицин (G); 2) аспарагиновая кислота (D), глутаминовая кислота (E); 3) аспарагин (N), глутамин (Q); 4) аргинин (R), лизин (K); 5) изолейцин (I), лейцин (L), метионин (M), валин (V); 6) фенилаланин (F), тирозин (Y), триптофан (W); 7) серин (S), треонин (T); и 8) цистеин (C), метионин (M) (см., например, Creighton, Proteins (1984)). В некоторых аспектах термин «консервативные модификации последовательности» используется для обозначения модификаций аминокислот, которые значимо не изменяют или не влияют на характеристики связывания антитела, содержащего указанную последовательность аминокислот.

[000172] В настоящем документе термин «процент идентичности» или «процентная идентичность» в контексте двух или нескольких нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей относится к тому, в какой степени сходны две или более из последовательностей или подпоследовательностей. Две последовательности являются «идентичными», если они имеют одинаковую последовательность аминокислот или нуклеотидов на протяжении сравниваемой области. Две последовательности являются «по существу идентичными», если указанные две последовательности имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми (то есть идентичны на 60%, необязательно на 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% или 99% на протяжении указанной области или, если область не указана, на протяжении всей последовательности), при сравнении и выравнивании для максимального соответствия в окне сравнения или указанной области, по результатам измерений с использованием

одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей или выравнивания вручную и визуального анализа. Необязательно, идентичность существует на протяжении области, длина которой составляет по меньшей мере около 30 нуклеотидов (или 10 аминокислот), или более предпочтительно на протяжении области, длина которой составляет от 100 до 500 или 1000 или более нуклеотидов (или 20, 50, 200 или более аминокислот). Два примера алгоритмов, которые подходят для определения процента идентичности последовательностей и сходства последовательностей, представлены алгоритмами BLAST и BLAST 2.0, которые описаны в источниках: Altschul et al, *Nuc. Acids Res.* 25:3389-3402, 1977; и Altschul et al, *J. Mol. Biol.* 215:403-410, 1990, соответственно.

[000173] Помимо процента идентичности последовательностей, описанного выше, еще один признак того, что две последовательности нуклеиновых кислот или два полипептида по существу идентичны, заключается в том, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, вступает в перекрестную иммунную реакцию с антителами, выработанными против полипептида, кодируемого второй нуклеиновой кислотой. Таким образом, полипептид, как правило, по существу идентичен второму полипептиду, например, если два указанных пептида отличаются только консервативными заменами. Другим признаком того, что две последовательности нуклеиновой кислоты по существу идентичны, является то, что две молекулы или их комплементарные последовательности гибридизуются друг с другом в жестких условиях. Еще одним признаком того, что две последовательности нуклеиновых кислот по существу идентичны, является то, что для амплификации последовательности могут быть использованы одни и те же праймеры.

[000174] В настоящем документе термин «нуклеиновая кислота» используется взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и в общем относится к дезоксирибонуклеотидам или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные аналоги нуклеотидов или модифицированные остатки или связи остова, которые являются синтетическими, встречающимися в природе и не встречающимися в природе, которые имеют аналогичные связывающие свойства, что и референсная нуклеиновая кислота, и которые метаболизируются способом, аналогичным референсным нуклеотидам. Примеры

таких аналогов включают, без ограничения, тиофосфаты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA).

[000175] В настоящем документе термин «полипептид» используется взаимозаменяемо с термином «белок» и относится к полимеру из остатков аминокислот. Указанные термины относятся к полимерам аминокислот, в которых один или более остатков аминокислот являются искусственными химическими миметиками соответствующей встречающейся в природе аминокислоты, а также к встречающимся в природе полимерам аминокислот и не встречающимся в природе полимерам аминокислот. Если не указано иное, конкретная полипептидная последовательность также подразумевает ее консервативно модифицированные варианты.

[000176] В настоящем документе термин «иммуноконъюгат» в общем относится к связи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с другим агентом, таким как рабочее вещество, лекарственный фрагмент, химиотерапевтический агент, токсин, иммунотерапевтический агент, зонд для визуализации и т.п. Указанная связь может представлять собой ковалентную связь или нековалентные взаимодействия, например, за счет сил электростатического взаимодействия. Для получения иммуноконъюгата могут быть использованы различные линкеры, известные в данной области техники. Кроме того, иммуноконъюгат может быть предложен в форме слитого белка, который может быть экспрессирован с полинуклеотида, кодирующего указанный иммуноконъюгат. В настоящем документе «слитый белок» обозначает белок, созданный путем соединения двух или более генов или фрагментов генов, которые первоначально кодировали отдельные белки (в том числе пептиды и полипептиды). Трансляция слитого гена приводит к образованию одного белка с функциональными свойствами, происходящими от каждого из исходных белков.

[000177] Термин «активный фрагмент» или «рабочее вещество» в настоящем документе в целом относится к части конъюгированного соединения, которая представляет собой активный агент, опосредующий фармацевтический эффект, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, профилактические, терапевтические и/или диагностические эффекты, например, противораковый, противовоспалительный,

противоинфекционный (например, антимикотический, антибактериальный, противопаразитарный, противовирусный) или анестезирующий агент. Способы присоединения каждого из них к линкеру, совместимому с антителами и способом согласно настоящему описанию, известны в данной области техники. См., например, Singh et al., (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, vol. 525, 445-457. Кроме того, «активный фрагмент» или «рабочее вещество» может представлять собой биофизический зонд, флуорофор, спиновую метку, инфракрасный зонд, аффинный зонд, хелатор, спектроскопический зонд, радиоактивный зонд, липидную молекулу, полиэтиленгликоль, полимер, ДНК, РНК, белок, пептид, поверхность, антитело, фрагмент антитела, наночастицу, квантовую точку, липосому, частицу ПЛГА, сахарид или полисахарид.

[000178] В настоящем документе термин «лекарственный фрагмент» или «D» в общем относится к любому соединению, обладающему требуемой биологической активностью и реакционноспособной функциональной группой, которое может быть использовано для включения лекарственного средства в конъюгат согласно настоящему изобретению.

Согласно некоторым вариантам реализации лекарственный фрагмент означает цитотоксическое лекарственное средство, подходящее для терапии рака; белок или полипептид, обладающий требуемой биологической активностью, такой как токсин, например, абрин, ризин А, экзотоксин псевдомонады и дифтерийный токсин; другие подходящие белки включают фактор некроза опухоли, α -интерферон, β -интерферон, фактор роста нервов, фактор роста тромбоцитов, активатор тканевого плазминогена и модификаторы биологического ответа, например, лимфокины, интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-2 (ИЛ-2), интерлейкин-6 (ИЛ-6), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ), или другие факторы роста. Согласно некоторым вариантам реализации термин «лекарственный фрагмент» может представлять собой химический фрагмент. Согласно некоторым аспектам лекарственный фрагмент выбран из ингибитора V-АТФазы, ингибитора HSP90, ингибитора IAP, ингибитора mTog, стабилизатора микротрубочек, дестабилизатора микротрубочек, ауристатины, доластатины, майтанзиноида, MetAP (метионин-аминопептидазы), ингибитора ядерного экспорта белков CRM1, ингибитора DPPIV, ингибитора реакций переноса фосфорила в митохондриях, ингибитора синтеза

белка, ингибитора киназы, ингибитора CDK2, ингибитора CDK9, ингибитора протеасомы, ингибитора кинезина, ингибитора HDAC, агента, повреждающего ДНК, алкилирующего агента ДНК, интеркалятора ДНК, связывающего малую бороздку ДНК агента и ингибитора DHFR.

[000179] Согласно одному варианту реализации изобретения лекарственный фрагмент может представлять собой лекарственные средства, разрушающие микротрубочки, такие как ауристин, например, метометил ауристин Е (ММАЕ), метометил ауристин F (ММАF) и ауристин F (AF). Согласно другому варианту реализации изобретения лекарственный фрагмент может представлять собой лекарственные средства, разрушающие микротрубочки, такие как майтанзиноиды, например, DM1, DM3 и DM4. Согласно другому варианту реализации изобретения лекарственный фрагмент может представлять собой агенты, повреждающие ДНК, такие как калихеамицины, дуокармицины, SN-38 и пирроло[2,1-с][1,4]бензодиазепины (PBD). Согласно другим вариантам реализации изобретения лекарственный фрагмент может представлять собой аманитины, антрациклины, баккатины, камптотецины, цемадотины, колхицины, колцимиды, комбретастины, криптофицины, дискодермолиды, доцетаксел, доксорубин, эхиномицины, элеутеробины, эпотилоны, эстрамустины, лекситропсины, майтанзины, метотрексат, нетропсины, пурамицины, ризоксины, таксаны, тубулизины или алкалоиды барвинка.

[000180] В настоящем документе термин «ингибитор топоизомеразы», как правило, относится к соединению, которое ингибирует активность топоизомеразы. Соединения, известные как ингибиторы топоизомеразы I, обладают активностью в отношении топоизомеразы I, а ингибиторы топоизомеразы II обладают активностью в отношении топоизомеразы II. Некоторые соединения обладают активностью в отношении как топоизомеразы I, так и топоизомеразы II и известны как ингибиторы топоизомеразы I/II. Предпочтительными ингибиторами топоизомеразы I для применения согласно настоящему изобретению являются камптотексин и аналоги камптотецина. Камптотексин представляет собой пентациклический алкалоид, первоначально выделенный из древесины и коры *Camptotheca acuminata*, дерева, происходящего из Китая (Wall, M.E. et al, J. Am. Chem. Soc, 94:388 (1966)). Камптотексин оказывает фармакологический эффект за счет необратимого

ингибирования топоизомеразы I. Способы синтеза камптотецина и аналогов или производных камптотецина известны и обобщены и изложены в патенте США № 5244903, который полностью включен в настоящий документ посредством ссылки.

[000181] В настоящем документе термин «камптотетин» в общем включает камптотетин и производные камптотецина, включая иринотекан, топотекан, люртотекан, силатекан, этиринотекан пегол, TAS 103, 9-аминокамптотетин, 7-этилкамптотетин, 10-гидроксикамптотетин, 9-нитрокамптотетин, 10,11-метилендиоксикамптотетин, 9-амино-10,11-метилендиоксикамптотетин, 9-хлор-10,11-метилендиоксикамптотетин, 7-(4-метилпиперазинометилен)-10, 11-этилендиокси-20(S)-камптотетин, 7-(4-метилпиперазинометилен)-10, 11-метилендиокси-20(S)-камптотетин и 7-(2-(N-изопропиламино)этил)-(20S)-камптотетин и их стереоизомеры, соли и сложные эфиры.

[000182] Следует отметить, что лекарственные средства не ограничены вышеупомянутыми категориями и включают все лекарственные средства, которые могут быть использованы в ADC.

[000183] В настоящем документе термин «линкер», раскрытый в настоящем описании, включает расщепляемый линкер или нерасщепляемый линкер. Расщепляемые линкеры могут быть химически лабильными и ферментативно-лабильными линкерами. Из-за высокой стабильности в плазме и хорошей селективности и эффективности внутриклеточного расщепления ферментативно-лабильные линкеры часто выбирают в качестве расщепляемых кандидатных линкеров для ADC. Согласно некоторым вариантам реализации ферментативно-лабильные линкеры могут включать пептидную единицу (-AA-), выбранную из группы, состоящей из -валина-цитрулина- (-Val-Cit-), -валина-лизина- (-Val-Lys-), -валина-аргинина- (-Val-Arg-), -фенилаланина-цитрулина- (-Phe-Cit-), -фенилаланина-лизина- (-Phe-Lys-) и -фенилаланина-аргинина- (-Phe-Arg-). Типичные ферментативно-лабильные линкеры включают -Val-Cit- и -Phe-Lys-, которые могут распознаваться катепсином В. Согласно некоторым вариантам реализации указанный нерасщепляемый линкер может представлять собой линкеры, которые способны повышать гидрофильность полученного ADC. Согласно одному варианту реализации нерасщепляемый линкер может содержать один или более полиэтиленгликолей (ПЭГ). Согласно другому варианту реализации нерасщепляемый линкер может представлять

собой ПЭГ, ПЭГ-диамин (NH₂-ПЭГ-NH₂), амин-ПЭГ-гидроксил (NH₂-ПЭГ-OH), амин-ПЭГ-СООН (NH₂-ПЭГ-СООН), диэтилентриамин или их комбинацию. Согласно некоторым вариантам реализации ПЭГ может быть представлен -(СН₂СН₂О)_х-, где х может представлять собой целое число в диапазоне от 1 до 20.

[000184] В настоящем документе термин «токсин», «цитотоксин» или «цитотоксический агент» в общем относится к любому агенту, который пагубно действует на рост и пролиферацию клеток и может вызывать снижение, ингибирование или уничтожение клетки или злокачественного новообразования.

[000185] В настоящем документе термин «противоопухолевый агент» или «противоопухолевое лекарственное средство» в общем относится к любому агенту, который можно применять для лечения клеточного пролиферативного нарушения, такого как рак, включая, но не ограничиваясь перечисленными, цитотоксические агенты, химиотерапевтические агенты, радиотерапию и радиотерапевтические агенты, нацеленные противораковые агенты и иммунотерапевтические агенты.

[000186] В настоящем документе термин «опухоль» или «рак» в общем относится к росту и пролиферации неопластических клеток, злокачественных или доброкачественных, и всех предраковых и раковых клеток и тканей.

[000187] В настоящем документе термин «противоопухолевая активность» означает снижение скорости пролиферации, жизнеспособности или метастатической активности опухолевых клеток. Возможным способом демонстрации противоопухолевой активности является демонстрация снижения скорости роста опухолевых клеток, стабилизация размеров опухоли или уменьшение размеров опухоли. Такая активность может быть оценена с использованием принятых моделей опухолей *in vitro* или *in vivo*, включая, но не ограничиваясь перечисленными, модели ксенотрансплантатов, модели аллотрансплантатов, модели ММТV и другие известные в данной области техники модели для исследования противоопухолевой активности.

[000188] В настоящем документе термин «кадгерин б», или «CDH6» в общем относится к проходящему через мембрану один раз трансмембранному белку, состоящему из 790 аминокислот, который классифицирован как член семейства кадгеринов типа II, и указанный белок имеет N-концевые внеклеточные и C-концевые внутриклеточные домены.

Ген CDH6 человека был впервые клонирован в 1995 году, и его последовательность может быть обозначена, например, номерами доступа NM_004932 и NP_004923 (NCBI). Кроме того, белок, который состоит из аминокислотной последовательности, содержащей замену, делецию и/или добавление одной или нескольких аминокислот относительно описанной выше аминокислотной последовательности CDH6, и имеет биологическую активность, эквивалентную активности белка CDH6, также охвачен термином «CDH6».

[000189] В настоящем описании термин «эпитоп» обычно используется для обозначения части пептида или части трехмерной структуры CDH6, с которой связывается специфическое антитело против CDH6.

[000190] Термины «опухоль, экспрессирующая CDH6» или «CDH6-положительная опухоль» в общем относятся к опухоли, которая экспрессирует CDH6 и/или мутантную форму CDH6 на поверхности опухолевых клеток.

[000191] В настоящем документе термин «субъект» включает человека и животных, не являющихся человеком. Животные, не являющиеся человеком, включают всех позвоночных, например, млекопитающих и не млекопитающих, таких как приматы, не являющиеся человеком, овцы, собаки, коровы, куры, амфибии и рептилии. За исключением случаев, когда указано иное, термины «пациент» или «субъект» используются в настоящем документе взаимозаменяемо.

[000192] В настоящем документе термин «фармацевтически приемлемый» в общем относится к одному или более нетоксичным веществам, которые не влияют на эффективность биологической активности активного ингредиента. Такие составы обычно могут содержать соли, буферы, консерванты, совместимые носители и необязательно другие терапевтические агенты. Такие фармацевтически приемлемые составы могут также обычно содержать совместимые твердые или жидкие наполнители, разбавители или инкапсулирующие материалы, подходящие для введения человеку. Для использования в медицинских целях соль должна представлять собой фармацевтически приемлемую соль, однако не являющиеся фармацевтически приемлемыми соли могут быть легко использованы для получения фармацевтически приемлемых солей и не могут быть исключены из объема настоящего изобретения. Такие фармакологически и фармацевтически приемлемые соли включают, не ограничиваясь перечисленными, соли,

полученные из следующих кислот: хлористоводородной кислоты, бромистоводородной кислоты, серной кислоты, азотной кислоты, фосфорной кислоты, малеиновой кислоты, уксусной кислоты, салициловой кислоты, лимонной кислоты, борной кислоты, муравьиной кислоты, малоновой кислоты, янтарной кислоты и т. д. Фармакологически приемлемые соли также могут быть получены в виде солей щелочных металлов или солей щелочноземельных металлов, таких как соли натрия, калия или кальция. Термин «сольват» в настоящем документе используется в общепринятом смысле для обозначения комплекса растворенного вещества (например, активного соединения, соли активного соединения) и растворителя. Сольваты обычно существенно не изменяют физиологическую активность или токсичность соединения и, следовательно, могут действовать как фармакологические эквиваленты. Если растворитель представляет собой воду, соединение – растворитель можно для удобства называть гидратом, например, моногидратом, дигидратом, тригидратом и т. д.

[000193] В настоящем документе термины «лечить» или «лечение» любого заболевания или нарушения в общем относятся в одном аспекте к облегчению заболевания или нарушения (то есть замедлению или остановке, или снижению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). Согласно другому аспекту «лечить» или «лечение» относится к ослаблению или облегчению применительно по меньшей мере к одному физическому параметру, включая параметры, которые могут быть не ощутимыми для пациента. Согласно еще одному аспекту «лечить» или «лечение» относится к модулированию заболевания или нарушения либо физически (например, стабилизация выраженного симптома), либо физиологически (например, стабилизация физического параметра), либо и к первому, и ко второму. Согласно еще одному аспекту «лечить» или «лечение» относится к предотвращению или задержке начала, развития или прогрессирования заболевания или нарушения.

[000194] В настоящем документе термины «терапевтически приемлемое количество» или «терапевтически эффективная доза» взаимозаменяемо относятся к количеству, достаточному для достижения требуемого результата (т.е. уменьшения размера опухоли, ингибирования роста опухоли, предотвращения метастазирования, ингибирования или предотвращения вирусной, бактериальной, микотической или паразитарной инфекции).

Согласно некоторым аспектам терапевтически приемлемое количество не индуцирует или не вызывает нежелательных побочных эффектов. Терапевтически приемлемое количество может быть определено путем введения низкой дозы вначале с постепенным последующим увеличением этой дозы до достижения требуемого эффекта.

«Профилактически эффективная дозировка» и «терапевтически эффективная дозировка» молекул согласно настоящему изобретению могут, соответственно, предотвращать возникновение или приводить к уменьшению тяжести симптомов заболевания, включая симптомы, ассоциированные с раком.

[000195] В настоящем документе термин «совместное введение» в общем относится к одновременному присутствию двух активных агентов в крови индивидуума. Активные агенты, которые вводят совместно, могут быть доставлены одновременно или последовательно.

[000196] В настоящем документе термины «содержащий», «имеющий», «включать», «включающий» и «включая» следует понимать как «включающий, но не ограниченный перечисленным», если не указано иное. Формы единственного числа в контексте описания настоящего изобретения и, в частности, в контексте прилагаемой формулы изобретения следует толковать как охватывающие и формы единственного числа, и формы множественного числа, если не указано иное. Использование любых примеров или выражений, связанных с примерами («к примеру», «например», «такие как») предназначено исключительно для иллюстрации аспектов или вариантов реализации настоящего изобретения и не должно быть истолковано как ограничивающее объем настоящего изобретения, если не заявлено иное.

[000197] В настоящем документе термин «приблизительно», когда он относится к измеряемому значению, такому как количество, продолжительность периода времени и т.п., охватывает отклонения $\pm 20\%$, или, в некоторых случаях, $\pm 10\%$, или, в некоторых случаях, $\pm 5\%$, или, в некоторых случаях, $\pm 1\%$, или, в некоторых случаях, $\pm 0,1\%$ от указанного значения, поскольку такие отклонения допустимы при реализации раскрытых способов.

Антитело к CDH6

[000198] Хотя в настоящем документе были показаны и описаны различные варианты реализации настоящего изобретения, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты реализации представлены исключительно в качестве примеров. Специалисты в данной области техники смогут представить многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от сути настоящего изобретения. Следует понимать, что могут быть использованы различные альтернативы вариантам реализации изобретения, описанным в настоящем документе.

[000199] Антитело против CDH6 согласно настоящему изобретению может происходить из любых видов. Предпочтительные примеры видов могут включать людей, обезьян, крыс, мышей и кроликов. Если антитело против CDH6 согласно настоящему изобретению происходит из вида, отличного от человека, предпочтительно химеризация или гуманизация антитела против CDH6 с применением хорошо известной методики. Антитело согласно настоящему изобретению может представлять собой поликлональное антитело или может представлять собой моноклональное антитело; моноклональное антитело является предпочтительным.

[000200] Антитело против CDH6 согласно настоящему изобретению представляет собой антитело, которое может быть нацелено на опухолевые клетки. В частности, антитело против CDH6 согласно настоящему изобретению обладает свойством, заключающимся в способности распознавать опухолевые клетки, свойством, заключающимся в способности связываться с опухолевыми клетками и/или свойством, заключающимся в интернализации в опухолевые клетки путем клеточного захвата и т.п. Соответственно, антитело к CDH6 согласно настоящему изобретению может быть конъюгировано с активным фрагментом посредством линкера для получения иммуноконъюгата (например, антитело к CDH6 согласно настоящему изобретению может быть конъюгировано с соединением, обладающим противоопухолевой активностью, посредством линкера, с получением конъюгата антитело – лекарственное средство).

[000201] Антитело против CDH6 может быть получено путем иммунизации животного полипептидом, служащим в качестве антигена, способом, обычно применяемым в данной области техники, с последующим сбором и очищением антитела, продуцированного в

организме живого животного. Происхождение антигена не ограничивается человеком, и, таким образом, животное также может быть иммунизировано антигеном, происходящим от животного, не являющегося человеком, такого как мышь или крыса. В этом случае антитело, которое может применяться при заболевании человека, может быть выбрано путем изучения перекрестной реактивности полученного антитела, связывающегося с гетерологичным антигеном, с антигеном человека.

[000202] Кроме того, продуцирующие антитела клетки, которые продуцируют антитела против антигена, могут быть слиты с клетками миеломы в соответствии с известным способом (например, Kohler and Milstein, *Nature* (1975) 256, 495-497; и Kennet, R. ed., *Monoclonal Antibodies*, 365-367, Plenum Press, N.Y. (1980)) с образованием гибридом для получения моноклонального антитела.

[000203] Антитело против CDH6, применяемое согласно настоящему изобретению, конкретно не ограничено. Например, может быть подходящим образом использовано антитело, выбранное из аминокислотной последовательности, представленной в перечне последовательностей в настоящей заявке. Антитело к CDH6, используемое согласно настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой антитело, обладающее следующими свойствами: (a) специфическое связывание с CDH6 и (b) наличие активности, состоящей в интернализации в клетки, экспрессирующие CDH6, путем связывания с CDH6; причем CDH6 может представлять собой CDH6 человека.

[000204] Далее будет конкретно описан способ получения антитела против CDH6.

(a) внеклеточную область CDH6 (Ser 54-Ala 615) можно применять в качестве иммуногена (ACRO Biosystems, CA6-H5229) и непосредственно вводить антиген животному (например, крысе или мышь), подлежащему иммунизации. Введение антигена можно осуществлять один или более раз, предпочтительно несколько раз, если это необходимо для увеличения титра антител;

(b) взятие ткани (например, лимфатического узла), содержащей клетки, продуцирующие антитела, у вышеупомянутого животного, у которого был индуцирован иммунный ответ;

(c) получение клеток миеломы (далее именуемых «миеломы») (например, клеток миеломы мыши SP2/0-ag14);

(d) слияние антитело-продуцирующих клеток и миелом;

- (e) отбор гибридной группы, продуцирующей представляющее интерес антитело;
- (f) разделение на клоны одиночных клеток (клонирование);
- (g) необязательно культивирование гибридом для массового получения моноклональных антител, или размножение животных, которым инокулированы гибридомы; и/или
- (h) изучение физиологической активности (активности интернализации) и специфичности связывания полученного таким образом моноклонального антитела или изучение свойств антитела в качестве реагента для мечения.

[000205] Примеры способа измерения титра антитела, используемого согласно настоящему изобретению, могут включать, не ограничиваясь перечисленными, проточную цитометрию и клеточный ИФА ELISA («Cell-ELISA»).

[000206] Конкретные последовательности CDR, определенные в настоящем документе, обычно основаны на определении IMGT. Однако следует понимать, что ссылка на CDR или CDR тяжелой цепи и/или CDR или CDR легкой цепи конкретного антитела охватывает все определения CDR, известные специалистам в данной области техники.

[000207] Согласно некоторым вариантам реализации антитела против CDH6 или их антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе, содержат одну, две, три, четыре, пять и/или шесть CDR любого из антител, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела против CDH6 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению содержат VL, содержащую одну, две и/или три VL CDR из таблицы 1. Согласно некоторым вариантам реализации антитела против CDH6 или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению содержат VH, содержащую одну, две и/или три CDR VH из таблицы 1. Согласно некоторым вариантам реализации антитела против CDH6 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению содержат одну, две и/или три CDR VL из таблицы 1 и одну, две и/или три CDR VH из таблицы 1.

[000208] Согласно некоторым вариантам реализации антитело к CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент содержат CDR1 VL, CDR2 VL, CDR3 VL, CDR1 VH, CDR2 VH и/или CDR3 VH антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации антитело к CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент включает вариант антитела к CDH6 или его

антигенсвязывающего фрагмента, описанный в настоящем документе. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела к CDH6 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит от одной до 30 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в антителе к CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела к CDH6 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит от одной до 25 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в антителе к CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела или антигенсвязывающего фрагмента к CDH6 содержит от одной до 20 замен, добавлений и/или делеций в указанном антителе против CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела или антигенсвязывающего фрагмента к CDH6 содержит от одной до 15 замен, добавлений и/или делеций в указанном антителе против CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела против CDH6 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит от одной до 10 замен, добавлений и/или делеций в указанном антителе против CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела против CDH6 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит от одной до пяти консервативных замен, добавлений и/или делеций аминокислот в антителе к CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации вариант антитела к CDH6 или его антигенсвязывающего фрагмента содержит от одной до трех замен, добавлений и/или делеций аминокислот в антителе к CDH6 или его антигенсвязывающем фрагменте. Согласно некоторым вариантам реализации замены, инсерции и/или делеции аминокислот представляют собой консервативные замены аминокислот. Согласно некоторым вариантам реализации изобретения консервативная замена (замены) аминокислоты находится (находятся) в CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации консервативная замена (или замены) аминокислоты не находят(ят)ся в CDR антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Согласно некоторым вариантам реализации консервативная замена (или замены) аминокислоты находят(ят)ся в каркасной области антитела или антигенсвязывающего фрагмента.

[000209] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (2) CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; или (3) CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; или ее вариант, содержащий до около 3, около 5, около 8, около 10, около 12 или около 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR;

и/или б) переменную область легкой цепи (VL), содержащую (1) CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (2) CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; или (3) CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; или ее вариант, содержащий до около 3, около 5, около 8, около 10, около 12 или около 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000210] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR, и/или указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000211] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие: а) VH, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 18; и/или б) VL, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере

95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 23.

[000212] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие:

а) вариабельную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; или (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или ее вариант, содержащий приблизительно до 3, приблизительно до 5, приблизительно до 8, приблизительно до 10, приблизительно до 12 или приблизительно до 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR;

и/или б) вариабельную область легкой цепи (VL), содержащую (1) CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (2) CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; или (3) CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; или ее вариант, содержащий до около 3, около 5, около 8, около 10, около 12 или около 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000213] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR, и/или указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000214] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие: а) VH, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 41; и/или б) VL,

обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 46.

[000215] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; или (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91; или ее вариант, содержащий до около 3, около 5, около 8, около 10, около 12 или около 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR; и/или б) переменную область легкой цепи (VL), содержащую (1) CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; (2) CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; или (3) CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; или ее вариант, содержащий до около 3, около 5, около 8, около 10, около 12 или около 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000216] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR, и/или указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000217] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие: а) VH, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%,

по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 95; и/или b) VL, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 96.

[000218] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие:

а) переменную область тяжелой цепи (VH), которая содержит (1) CDR1 (HCDR1) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; (2) CDR2 (HCDR2) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; или (3) CDR3 (HCDR3) тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99; или ее вариант, содержащий приблизительно до 3, приблизительно до 5, приблизительно до 8, приблизительно до 10, приблизительно до 12 или приблизительно до 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR;

и/или b) переменную область легкой цепи (VL), содержащую (1) CDR1 (LCDR1) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (2) CDR2 (LCDR2) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; или (3) CDR3 (LCDR3) легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; или ее вариант, содержащий до около 3, около 5, около 8, около 10, около 12 или около 15 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000219] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в HCDR, и/или указанный вариант содержит приблизительно до 5 замен, добавлений и/или делеций аминокислот в LCDR.

[000220] Согласно некоторым вариантам реализации в настоящем документе предложены антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связывают CDH6 (*например*, CDH6 человека), содержащие: а) VH, обладающую по меньшей мере

85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 103; и/или b) VL, обладающую по меньшей мере 85%, по меньшей мере 86%, по меньшей мере 87%, по меньшей мере 88%, по меньшей мере 89%, по меньшей мере 90%, по меньшей мере 91%, по меньшей мере 92%, по меньшей мере 93%, по меньшей мере 94%, по меньшей мере 95%, по меньшей мере 96%, по меньшей мере 97%, по меньшей мере 98%, по меньшей мере 99% или 100% идентичностью аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 104.

[000221] Созданный таким образом штамм гибридомы может включать гибридомы 707 и 463, продуцирующие антитела против CDH6. Следует отметить, что в настоящем описании антитело, продуцируемое гибридомой 707, продуцирующей антитело к CDH6, называют «антителом 707» или просто «707», антитело, продуцируемое гибридомой 463, называют «антителом 463» или просто «463», антитело, продуцируемое гибридомой 066, называют «антителом 066» или просто «066», а антитело, продуцируемое гибридомой 439, называют «антителом 439» или просто «439».

[000222] Вариабельная область тяжелой цепи антитела 707 имеет HCDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 2, HCDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 3, и HCDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 4. Вариабельная область легкой цепи антитела 707 имеет LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7.

[000223] Далее, вариабельная область тяжелой цепи антитела 707 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 18. Вариабельная область легкой цепи антитела 707 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 23.

[000224] Вариабельная область тяжелой цепи антитела 463 имеет HCDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 8, HCDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 9, и HCDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 10. Вариабельная область легкой цепи антитела 463 имеет LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[000225] Далее, вариабельная область тяжелой цепи антитела 463 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 41. Вариабельная область легкой цепи антитела 463 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 46.

[000226] Вариабельная область тяжелой цепи антитела 066 имеет HCDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 89, HCDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 90, и HCDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 91. Вариабельная область легкой цепи антитела 066 имеет LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94.

[000227] Кроме того, вариабельная область тяжелой цепи антитела 066 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 95. Вариабельная область легкой цепи антитела 066 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 96.

[000228] Вариабельная область тяжелой цепи антитела 439 имеет HCDR1, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 97, HCDR2, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 98, и HCDR3, состоящую из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO:

99. Вариабельная область легкой цепи антитела 439 имеет LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

[000229] Далее, вариабельная область тяжелой цепи антитела 439 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 103. Вариабельная область легкой цепи антитела 439 состоит из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 104.

[000230] Другие антитела

[000231] Антитело согласно настоящему изобретению также включает генетически рекомбинантные антитела, которые были искусственно модифицированы с целью снижения гетерогенной антигенности к человеку, такие как химерное антитело, гуманизированное антитело и антитело человека, а также вышеописанное моноклональное антитело против CDH6. Эти антитела могут быть получены известными способами.

[000232] Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой антитело или антигенсвязывающий фрагмент человека. Антитела человека могут быть получены с использованием различных методик, известных в данной области техники. Согласно некоторым вариантам реализации антитела человека получают из иммортализованных В-лимфоцитов человека, иммунизированных *in vitro*. Согласно некоторым вариантам реализации антитела человека получают из лимфоцитов, выделенных из организма иммунизированного индивидуума. В любом случае клетки, которые продуцируют антитело, направленное против целевого антигена, могут быть получены и выделены. Согласно некоторым вариантам реализации указанное антитело человека выбрано из фаговой библиотеки, причем указанная фаговая библиотека экспрессирует антитела человека. В альтернативном варианте технология фагового дисплея может быть использована для получения антител человека и фрагментов антител *in vitro* из репертуаров генов вариабельной области иммуноглобулина от неиммунизированных доноров. Методики получения и применения фаговых библиотек антител хорошо известны в данной области техники. После идентификации антител для

получения антител человека с более высокой аффинностью могут быть использованы стратегии созревания аффинности, известные в данной области техники, включая, но не ограничиваясь перечисленными, перестановку цепей и сайт-специфический мутагенез. Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения антитела человека продуцируют в трансгенных мышцах, организм которых содержит иммуноглобулиновые локусы человека. При иммунизации эти мыши способны продуцировать полный репертуар антител человека в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина.

[000233] Пример химерного антитела может включать антитела, в которых переменная область и константная область гетерологичны друг другу, такие как химерное антитело, образованное путем конъюгирования переменной области антитела, происходящего от мыши или крысы, с константной областью, происходящей от человека (см. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81, 6851-6855, (1984)).

[000234] Примеры химерного антитела, полученного из антитела мыши к CDH6 человека, включают антитело, состоящее из легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи каждого антитела мыши к CDH6 человека, описанного в настоящем документе (например, антитела 707 или антитела 463), и константной области, происходящей от человека, а также тяжелой цепи, содержащей собственную переменную область тяжелой цепи и константную область, происходящую от человека.

[000235] Другие примеры химерного антитела, полученного из антитела мыши к CDH6 человека, включают антитело, состоящее из легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, имеющую замену от одного до нескольких остатков, от 1 до 3 остатков, 1 или 2 остатков, предпочтительно 1 остатка аминокислот в переменной области легкой цепи каждого антитела мыши к CDH6 человека, описанного в настоящем описании (например, антитела 707 или антитела 463), на другие аминокислотные остатки, и тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, имеющую замену от одного до нескольких остатков, от 1 до 3 остатков, 1 или 2 остатков, предпочтительно 1 остатка аминокислот в переменной области тяжелой цепи на другие аминокислотные остатки. Указанное антитело может иметь любую заданную константную область, происходящую от человека.

[000236] Другие примеры химерного антитела, происходящего из антитела мыши к CDH6 человека, включают антитело, состоящее из легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, имеющую замену 1 или 2 остатков, предпочтительно 1 остатка аминокислот в любых 1–3 CDR в переменной области легкой цепи каждого антитела мыши к CDH6 человека, описанного в настоящем описании (например, антитела 707 или антитела 463), на другие аминокислотные остатки, и тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, имеющую замену 1 или 2 остатков, предпочтительно 1 остатка аминокислот в любых 1–3 CDR в переменной области тяжелой цепи указанных антител на другие остатки аминокислот. Указанное антитело может иметь любую заданную константную область, происходящую от человека.

[000237] В данной области техники известно, что константная область или области антитела опосредуют несколько эффекторных функций, и эти эффекторные функции могут варьировать в зависимости от изотипа антитела. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgA человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgD человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgE человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgG человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgM человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgG1 человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела

IgG2 человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgG3 человека. Согласно некоторым вариантам реализации антитело против CDH6 или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в настоящем документе, содержат по меньшей мере одну константную область антитела IgG4 человека. Согласно некоторым вариантам реализации указанная Fc-область слита посредством шарнира. Шарнир может представлять собой шарнир IgG1, шарнир IgG2 или шарнир IgG3. Аминокислотные последовательности Fc-области IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 человека известны специалистам в данной области техники. В некоторых случаях Fc-области с вариациями аминокислот были идентифицированы в нативных антителах.

[000238] Примеры химерного антитела, происходящего из антитела 707, включают антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. Указанное антитело может иметь любую заданную константную область, происходящую от человека. В некоторых случаях константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1 человека, а константная область легкой цепи может представлять собой константную область Igk человека.

[000239] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, и химерное антитело называется Ch069707.

[000240] Примеры химерного антитела, полученного из антитела 463, включают антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Указанное антитело может иметь любую заданную константную область, происходящую от человека. Необязательно, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1

человека (SEQ ID NO: 70), а константная область легкой цепи может представлять собой константную область IgG человека (SEQ ID NO: 71).

[000241] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81, и указанное химерное антитело называется Ch069463.

[000242] Примеры гуманизированного антитела могут включать антитело, образованное путем включения только определяющих комплементарность областей (CDR) в антитело, происходящее от человека (см. Nature (1986) 321, p. 522-525), антитело, образованное путем включения аминокислотных остатков из некоторых каркасных областей, а также последовательностей CDR в антитело человека в соответствии со способом прививки CDR (международная публикация № WO90/07861); и антитело, образованное путем модификации аминокислотных последовательностей некоторых CDR при сохранении антигенсвязывающей способности.

[000243] В настоящем описании гуманизированное антитело, полученное из антитела 707, антитела Ch069707, антитела 463 или антитела Ch069463, не ограничено конкретным гуманизированным антителом, если гуманизированное антитело сохраняет все 6 последовательностей CDR, уникальных для антитела 707, антитела Ch069707, антитела 463 или антитела Ch069463, и обладает активностью интернализации. Аминокислотные последовательности некоторых CDR этого гуманизированного антитела могут быть дополнительно модифицированы при условии сохранения у него активности интернализации.

[000244] Конкретные примеры гуманизированного антитела на основе Ch069707 могут включать любую заданную комбинацию: тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, состоящую из любой одной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (1) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 66, (2) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более (предпочтительно аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более последовательности каркасной области, отличной от последовательности у каждой CDR) вышеуказанной аминокислотной последовательности

(1) и (3) аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или добавление одной или нескольких аминокислот в вышеуказанной аминокислотной последовательности (1); и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из любой одной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (4) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 68, (5) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более (предпочтительно аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более последовательности каркасной области, отличной от последовательности у каждой CDR), описанной выше аминокислотной последовательности (4), и (6) аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или добавление одной или нескольких аминокислот в описанной выше аминокислотной последовательности (4). Необязательно константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 70), а константная область легкой цепи может представлять собой константную область Igk человека (SEQ ID NO: 71); некоторые гуманизированные антитела названы CL069707-H1L1, CL069707-H1L2, CL069707-H2L1 и CL069707-H2L2, соответственно, как дополнительно описано ниже.

[000245] Согласно некоторым вариантам реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85, или аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 85 по меньшей мере на 95% или более, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86, или аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 86 по меньшей мере на 95% или более.

[000246] Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированное антитело Ch069707 может содержать любую заданную комбинацию: тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, состоящую из любой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 27 и 29; и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, состоящую из любой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 34 и 36.

[000247] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, и указанное гуманизированное антитело называется CL069707-H1L1.

[000248] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77, и указанное гуманизированное антитело называется CL069707-H1L2.

[000249] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76, и указанное гуманизированное антитело называется CL069707-H2L1.

[000250] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77, и указанное гуманизированное антитело называется CL069707-H2L2.

[000251] Конкретные примеры гуманизированного антитела против антитела Ch069463 могут включать любую заданную комбинацию: тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, состоящую из любой одной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (1) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 67, (2) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более (предпочтительно аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более последовательности каркасной области, отличной от последовательности у каждой CDR) вышеуказанной аминокислотной последовательности (1) и (3) аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или добавление одной или нескольких аминокислот в вышеуказанной аминокислотной последовательности (1); и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, состоящую из любой одной аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из (4) аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 69, (5) аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95%

или более (предпочтительно аминокислотной последовательности, идентичной по меньшей мере на 95% или более последовательности каркасной области, отличной от последовательности у каждой CDR), описанной выше аминокислотной последовательности (4), и (6) аминокислотной последовательности, содержащей делецию, замену или добавление одной или нескольких аминокислот в описанной выше аминокислотной последовательности (4). Необязательно, константная область тяжелой цепи может представлять собой константную область IgG1 человека (SEQ ID NO: 70), а константная область легкой цепи может представлять собой константную область Igk человека (SEQ ID NO: 71); и гуманизированные антитела названы CL069463-H1L1, CL069463-H1L2, CL069463-H1L3, CL069463-H2L1, CL069463-H2L2 и CL069463-H2L3.

[000252] Согласно некоторым вариантам реализации гуманизированное антитело Ch069463 может содержать любую заданную комбинацию: тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, состоящую из любой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 51 и 54; и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи, состоящую из любой аминокислотной последовательности, выбранной из группы, состоящей из аминокислотной последовательности, представленной в SEQ ID NO: 58, 63 и 65.

[000253] Согласно некоторым вариантам реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87, или аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 87 по меньшей мере на 95% или более, и легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88, или аминокислотную последовательность, идентичную SEQ ID NO: 88 по меньшей мере на 95% или более.

[000254] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и указанное гуманизированное антитело называется CL069463-H1L1.

[000255] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, а легкая цепь

может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83, и указанное гуманизированное антитело называется CL069463-H1L2.

[000256] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84, и указанное гуманизированное антитело называется CL069463-H1L3.

[000257] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82, и указанное гуманизированное антитело называется CL069463-H2L1.

[000258] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83, и указанное гуманизированное антитело называется CL069463-H2L2.

[000259] Согласно одному варианту реализации тяжелая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, а легкая цепь может содержать аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84, и указанное гуманизированное антитело называется CL069463-H2L3.

[000260] Таблица 1. Последовательность антитела мыши, химерного антитела и гуманизированного антитела

ID	ПРИМЕЧАНИЕ:	SEQ
1	CL069707 HCDR1; CL069463 HCDR1; Ch069707 HCDR1; Ch069463 HCDR1;	GFTF[NT]TYA
2	CL069707 HCDR1; Ch069707 HCDR1;	GFTFTTYA
3	CL069707 HCDR2; Ch069707 HCDR2;	IRIKNNNYAT
4	CL069707 HCDR3; Ch069707 HCDR3;	VRPDYGNGLAY
5	CL069707 LCDR1; Ch069707 LCDR1;	SSISSHY
6	CL069707 LCDR2; Ch069707 LCDR2;	RSF
7	CL069707 LCDR3; Ch069707 LCDR3;	QQDIVPLT

	LCDR3;	
8	CL069463 HCDR1; Ch069463 HCDR1;	GFIFNTYA
9	CL069463 HCDR2; Ch069463 HCDR2;	IKSKNKDYET
10	CL069463 HCDR3; Ch069463 HCDR3;	VRQNWNYFDY
11	CL069463 LCDR1; Ch069463 LCDR1;	ENIYY5
12	CL069463 LCDR2; Ch069463 LCDR2;	NAN
13	CL069463 LCDR3; Ch069463 LCDR3;	QQAYDVPPT
14	CL069707 HFR1; Ch069707 HFR1;	EVHIVESGGGLVQPKGSLKLSCVAS
15	CL069707 HFR2; Ch069707 HFR2; CL069707-H1 HFR2	MNWVRQAPGKGLEWVAR
16	CL069707 HFR3; Ch069707 HFR3	YYADSVTDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYC
17	CL069707 HFR4; Ch069707 HFR4	WGQGLVTVSA
18	CL069707 VH; Ch069707 VH	EVHIVESGGGLVQPKGSLKLSCVASGFFTTYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYY CVRPDYGNGLAYWGQGLVTVSA
19	CL069707 LFR1; Ch069707 LFR1	EIVLTQSPTTMAASPGKITITCSAS
20	CL069707 LFR2; Ch069707 LFR2	LHWYQKPGFSPKLLIY
21	CL069707 LFR3; Ch069707 LFR3	YLASGVPLRFTGSGSGTSYSLTIGTMEAEVDVATYYC
22	CL069707 LFR4; Ch069707 LFR4	FGAGTKLELK
23	CL069707 VL; Ch069707 VL	EIVLTQSPTTMAASPGKITITCSASSISSHYLHWYQKPGFSPKLLIYRSF YLASGVPLRFTGSGSGTSYSLTIGTMEAEVDVATYYCQQDIVPLTFGAGTKL ELK
24	CL069707-H1 HFR1; CL069707- H2 HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS
25	CL069707-H1 HFR3; CL069707- H2 HFR3	YYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYC
26	CL069707-H1 HFR4; CL069707- H2 HFR4; CL069463-H2 HFR4	WGQGLVTVSS
27	CL069707-H1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFFTTYAMNWVRQAPGKGLEWV ARIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNLSKTEDTAVYYC VRPDYGNGLAYWGQGLVTVSS
28	CL069707-H2 HFR2	MNWVRQAPGKGLEWVGR

29	CL069707-H2 VH	EVQLVESGGGLVQP GGLRLSCAASGFTFTTYAMNWVRQAPGKGLEWV GRIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC VRPDYGNVGLAYWGQGLTLTVSS
30	CL069707-L1 LFR1; CL069707-L2 LFR1	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSAS
31	CL069707-L1 LFR2; CL069707-L2 LFR2	LHWYQQKPGKSPKLLIY
32	CL069707-L1 LFR3	YLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC
33	CL069707-L1 LFR4; CL069707-L2 LFR4	FGQGTKLEIK
34	CL069707-L1 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSISSHYLHWYQQKPGKSPKLLIYRS FYLASGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDIVPLTFGQGTKL EIK
35	CL069707-L2 LFR3	YLASGVPLRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC
36	CL069707-L2 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSISSHYLHWYQQKPGKSPKLLIYRS FYLASGVPLRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQDIVPLTFGQGTKL EIK
37	CL069463 HFR1; Ch069463 HFR1;	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAAS
38	CL069463 HFR2; Ch069463 HFR2; CL069463-H2 HFR2	LTWVRQAPGKGLEWVGR
39	CL069463 HFR3; Ch069463 HFR3	YYADSVKDRFTISRNDQSLLYLQMNLLKTEDTAIYYC
40	CL069463 HFR4; Ch069463 HFR4	WGQGTTLTVSS
41	CL069463 VH; Ch069463 VH	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNITYALTWVRQAPGKGLEWV GRIKSKNKDYETYYADSVKDRFTISRNDQSLLYLQMNLLKTEDTAIYYC VRQNWNYFDYWGQGTTLTVSS
42	CL069463 LFR1; Ch069463 LFR1	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRAS
43	CL069463 LFR2; Ch069463 LFR2	LAWYQQRQGKSPQLLIY
44	CL069463 LFR3; Ch069463 LFR3	SLKDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFC
45	CL069463 LFR4; Ch069463 LFR4 CL069463-L1 LFR4	FGGGTKLEIK
46	CL069463 VL; Ch069463 VL	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQRQGKSPQLLIYN ANSLKDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCQQAYDVPPTFG GGTKLEIK
47	CL069463-H1 HFR1	EVQLVESGGGLVQPSGSLKLSAAS
48	CL069463-H1 HFR2	LTWVRQASGKGLEWVGR
49	CL069463-H1 HFR3	YYADSVKDRFTISRDDISITLYLQMNSLKTEDTALYYC
50	CL069463-H1 HFR4	WGQGTMLTVSS
51	CL069463-H1 VH	EVQLVESGGGLVQPSGSLKLSAASGFTFNITYALTWVRQASGKGLEWV RIKSKNKDYETYYADSVKDRFTISRDDISITLYLQMNSLKTEDTALYYCV

		RQNWNYFDYWGQGTMLTVSS
52	CL069463-H2 HFR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS
53	CL069463-H2 HFR3	YYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYC
54	CL069463-H2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYALTWVRQAPGKGLEWV GRIKSKNKDYETYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRQNWNYFDYWGQGTMLTVSS
55	CL069463-L1 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGQRVTITCRAS
56	CL069463-L1 LFR2	LAWYQQKPGKPPRLLIY
57	CL069463-L1 LFR3	SLKDGVPSRFSGSGSGTQYTMITISMQPEDFATYYC
58	CL069463-L1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGQRVTITCRASENIYYSLAWYQQKPGKPPRLLIYNA NSLKDGVPSRFSGSGSGTQYTMITISMQPEDFATYYCQQAYDVPPTFGGG TKLEIK
59	CL069463-L2 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRAS
60	CL069463-L2 LFR2; CL069463- L3 LFR2	LAWYQQKPGKAPKLLIY
61	CL069463-L2 LFR3; CL069463- L3 LFR3	SLKDGVPSRFSGSGSGTDYTMITISSMQPEDFATYYC
62	CL069463-L2 LFR4; CL069463- L3 LFR4	FGGGTKVEIK
63	CL069463-L2 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYYSLAWYQQKPGKAPKLLIYN ANSLKDGVPSRFSGSGSGTDYTMITISSMQPEDFATYYCQQAYDVPPTFGG GTKVEIK
64	CL069463-L3 LFR1	DIQMTQSPSSLSASVGERVTITCRAS
65	CL069463-L3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGERVTITCRASENIYYSLAWYQQKPGKAPKLLIYN ANSLKDGVPSRFSGSGSGTDYTMITISSMQPEDFATYYCQQAYDVPPTFGG GTKVEIK
66	CL069707-H1 VH; CL069707-H2 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTYAMNWVRQAPGKGLEWV[AG]RIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRPDYGNGLAYWGQGTMLTVSS
67	CL069463-H1 VH; CL069463-H2 VH	EVQLVESGGGLVQP[GS]GSLKLSCAASGFTFNTYALTWVRQA[PS]GKGL EWVGRIKSKNKDYETYADSVKDRFTISRDD[IK][NS]TLYLQMNSLKTE DTA[LV]YYCVRQNWNYFDYWGQGT[LM][LV]TVSS
68	CL069707-L1 VL; CL069707-L2 VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCSASSISSHYLHWYQQKPGKSPKLLIYRS FYLAGVPL[LS]RFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQDIVPLTFGQGT KLEIK
69	CL069463-L1 VL; CL069463-L2 VL; CL069463-L3 VL	DIQMTQSPSSLSASVG[DEQ]RVTITCRASENIYYSLAWYQQKPGK[AP]P[K R]LLIYNANSLKDGVPSRFSGSGSGT[DIQ]YTMII[ST]SMQPEDFATYYCQ QAYDVPPTFGGGTK[LV]EIK
70	константная область тяжелой цепи	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSHE DPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

71	константная область легкой цепи	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	Ch069707 HC	EVHLVESGGGLVQPKGSLKLSVASGFTFTTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRPDYGNGLAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
73	Ch069707 LC	EIVLTQSPSTMAASPGEKITITCSASSISSHYLHWYQKPKGFSKLLIYRSFYLASGVPLRFTGSGSGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQDIVPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
74	CL069707-H1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRPDYGNGLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
75	CL069707-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTTYAMNWVRQAPGKGLEWVGRIIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRPDYGNGLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKLSLSPGK
76	CL069707-L1	DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSISSHYLHWYQKPKGKSPKLLIYRSFYLASGVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQDIVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
77	CL069707-L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRTVITCSASSISSHYLHWYQKPKGKSPKLLIYRSFYLASGVPLRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFATYYCQQDIVPLTFGQGTKL

		EIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVDNAL QSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC
78	CL069463-H1	EVQLVESGGGLVQPSGSLKLSCAASGFTFNTYALTWVRQASGKGLEWVG RIKSKNKDYETYYADSVKDRFTISRDDISITLYLQMNLSKTEDTALYYCV RQNWNYFDYWGGTMLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
79	CL069463-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNTYALTWVRQAPGKGLEWV GRIKSKNKDYETYYADSVKDRFTISRDDSKNTLYLQMNLSKTEDTAVYY CVRQNWNYFDYWGGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSPGK
80	Ch069463 HC	EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTYALTWVRQAPGKGLEWV GRIKSKNKDYETYYADSVKDRFTISRNDQSLLYLQMNLSKTEDTAIYYC VRQNWNYFDYWGGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCL VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQ TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL SPGK
81	Ch069463 LC	DIQMTQSPASLAASVGETVTITCRASENIYYSLAWYQQRQKSPQLLIYN ANSLKDGVPSRFSGSGSGTQYSMKINSMQPEDTATYFCQAYDVPPTFG GGTKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC
82	CL069463-L1	DIQMTQSPSSLSASVGQRVTITCRASENIYYSLAWYQKPKGKPRLLIYNA NSLKDGVPSRFSGSGSGTQYTMITSMQPEDFATYYCQAYDVPPTFGGG TKLEIKRTVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYBREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC
83	CL069463-L2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYYSLAWYQKPKGKAPKLLIYN ANSLKDGVPSRFSGSGSGTDYTMITSMQPEDFATYYCQAYDVPPTFGG

		GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
84	CL069463-L3	DIQMTQSPSSLSASVGERVTITCRASENIYYSLAWYQQKPGKAPKLLIYN ANSLKDGVPSRFSGSGSGTDYTMTISSMQPEDFATYYCQQAYDVPPTFGG GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
85	CL069707-H1; CL069707-H2	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTYAMNWRQAPGKGLEWV[AG]RIRIKNNNYATYYADSVTDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYY CVRPDYGNGLAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF PPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK
86	CL069707-L1; CL069707-L2	DIQLTQSPSSLSASVGDRTITCSASSISSHYLHWYQQKPGKSPKLLIYRS FYLAGSVP[LS]RFSGSGSGTDFLTISSLPEDFATYYCQQDIVPLTFGQGT KLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC
87	CL069463-H1; CL069463-H2	EVQLVESGGGLVQP[GS]GSLKLSCAASGFTFNTYALTWRQA[PS]GKGL EWSGRIKSKNKDYETYYADSVKDRFTISRDDS[IK][NS]TLYLQMNSLKTE DTA[LV]YYCVRQNWNYFDYWGQGT[LM][LV]TVSSASTKGPSVFPLAPS SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHITPAVLQSSGLYS LSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP APIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
88	CL069463-L3; CL069463-L2; CL069463-L1	DIQMTQSPSSLSASVG[DEQ]RVTITCRASENIYYSLAWYQQKPGK[AP]P[K R]LLIYNANSLKDGVPSRFSGSGSGT[DQ]YTMTI[ST]SMQPEDFATYYCQ QAYDVPPTFGGGTK[LV]EIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYK KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
89	CL069066 HCDR1; Ch069066 HCDR1	GFDFSRYW
90	CL069066 HCDR2; Ch069066 HCDR2	INPDSSTI
91	CL069066 HCDR3; Ch069066 HCDR3	TRRPYYGYFDS
92	CL069066 LCDR1; Ch069066	ESVEYYGTTL

	LCDR1	
93	CL069066 LCDR2; Ch069066 LCDR2	AGS
94	CL069066 LCDR3; Ch069066 LCDR3	QQSRKVPWT
95	CL069066 VH; Ch069066 VH	EVKLESGGGLVQPGGSLKLSAASGDFFSRYWMTWVRQAPGKGLEWI GEINPDSSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLYLQMNKVTSEDTALYYCTR PHYHYGYFDSWGQGTTLTVSS
96	CL069066 VL; Ch069066 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEYYGTTLMQWYQQKPGQPQL LIYAGSNVESGVPARFSGSGSGETEFLNIHPVEEDDIGMYFCQQSRKVPWT FGGGTKLEIK
97	CL069439 HCDR1; Ch069439 HCDR1	GYSFTGY
98	CL069439 HCDR2; Ch069439 HCDR2	ISCFNGDT
99	CL069439 HCDR3; Ch069439 HCDR3	VRGRYGNFNFDY
100	CL069439 LCDR1; Ch069439 LCDR1	ESVEFYGTSL
101	CL069439 LCDR2; Ch069439 LCDR2	ATS
102	CL069439 LCDR3; Ch069439 LCDR3	QQSRRIPWT
103	CL069439 VH; Ch069439 VH	EVQLQQSGTELVRTGASVKISCKASGYSFTGYIHWIKQSHGESLEWIGYI SCFNGDTSYNQNFKDRATFNVDTSSTAYMQFISLTSSESAVYYCVRGRY GNFNFDYWGQGTTLTVSS
104	CL069439 VL; Ch069439 VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEFYGTSLMQWFQQKPGHPPQLL IYATSNVDSGVPARFSASGSGTDFSLNIHPVEEADIAMYFCQQSRRIPWTF GGGGTKLEIK
105	H01L02 VH	EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEW MGWIYPGDGETEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RGVYGGFAGGYDFWQGTTLTVSS
106	H01L02 VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPGKAPKLLIYD ANTLQITGVPSTRFSGSGSDFTLTISLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGGGT KVEIK

[000261] Замена аминокислоты в настоящем описании предпочтительно представляет собой консервативную замену аминокислоты. Консервативная замена аминокислоты представляет собой замену, происходящую в аминокислотной группе, связанной с определенными аминокислотными боковыми цепями. Предпочтительными аминокислотными группами являются следующие: кислотная группа = аспарагиновая кислота и глутаминовая кислота; основная группа = лизин, аргинин и гистидин; неполярная группа = аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин и триптофан; и незаряженное полярное

семейство = глицин, аспарагин, глутамин, цистеин, серин, треонин и тирозин. Другими предпочтительными аминокислотными группами являются следующие: алифатическая гидроксигруппа = серин и треонин; амидсодержащая группа = аспарагин и глутамин; алифатическая группа = аланин, валин, лейцин и изолейцин; и ароматическая группа = фенилаланин, триптофан и тирозин. Такая замена аминокислоты предпочтительно осуществляется без ухудшения свойств вещества, имеющего исходную аминокислотную последовательность.

[000262] Комбинируя последовательности, демонстрирующие высокую идентичность вышеописанным аминокислотным последовательностям тяжелой цепи и аминокислотным последовательностям легкой цепи, можно выбрать антитело, имеющее биологическую активность, эквивалентную активности каждого из вышеописанных антител. Такая идентичность составляет обычно 80% или более, предпочтительно 90% или более, более предпочтительно 95% или более; и наиболее предпочтительно 99% или более. Кроме того, также можно путем комбинирования аминокислотных последовательностей тяжелой цепи и легкой цепи, содержащих замену, делецию или добавление одного или нескольких их аминокислотных остатков относительно аминокислотной последовательности тяжелой цепи или легкой цепи, выбрать антитело, имеющее биологическую активность, эквивалентную активности каждого из описанных выше антител.

[000263] Антитело против CDH6 человека также можно получить путем трансформации эукариотических клеток с помощью кДНК, кодирующей каждую из тяжелой цепи и легкой цепи такого антитела человека, или предпочтительно с помощью вектора, содержащего кДНК, в соответствии с методами генетической рекомбинации, а затем культивирования трансформированных клеток, продуцирующих генетически модифицированное моноклональное антитело человека, таким образом, чтобы антитело можно было получить из культурального супернатанта. В этом контексте, например, эукариотические клетки и предпочтительно клетки млекопитающих, такие как клетки CHO, лимфоциты или миеломы, могут быть использованы в качестве хозяев.

[000264] Кроме того, известен способ получения антитела человека, происходящего из фагового дисплея, которое выбрано из библиотеки антител человека (см. источники: Wormstone, I. M. et al., *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. (2002) 43 (7), p. 2301-

2308; Carmen, S. et al., Briefings in Functional Genomics and Proteomics (2002), 1 (2), p. 189-203; Siriwardena, D. et al., Ophthalmology (2002) 109 (3), p. 427-431; и др.).

[000265] Иммуноконъюгат

[000266] Антитело против CDH6 по настоящему изобретению может быть конъюгировано с активным фрагментом, и указанный активный фрагмент может содержать лекарственный фрагмент и/или метку.

[000267] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный лекарственный фрагмент выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, цитокина, нуклеиновой кислоты, молекулы, ассоциированной с нуклеиновой кислотой, радионуклида, хемокина, иммуно(ко)стимулирующей молекулы, иммуносупрессивной молекулы, лиганда смерти, белка, индуцирующего апоптоз, киназы, пролекарство-превращающего фермента, РНКазы, агонистического антитела или фрагмента антитела, антагонистического антитела или фрагмента антитела, фактора роста, гормона, фактора коагуляции, фибринолитического белка, пептидов, имитирующих указанное, и их фрагментов, слитых белков и производных.

[000268] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанная метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, агента для визуализации и иона металла.

[000269] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный цитотоксический агент содержит лекарственное средство, разрушающее микротрубочки, и/или агент, повреждающий ДНК.

[000270] Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент может быть выбран из: паклитаксела; цитохалазина В; короткого бактериоцина D; бромида этидия; эметина; митомицина; этопозиды; онихотиозида; тиенозида; винкристина; колхицина; доксорубина; эритромицина; дигидроксикарбамицина диона; ингибиторов микротубулина; митоксантрона; актиномицина D; 1-дегидротестостерона; глюкокортикоидов; прокаина; бупивакаина; лидокаина; пропранолола; пуромицина; калликреина или его аналогов или производных; антиметаболитов; алкилирующих агентов; антибиотиков; антимиотических агентов; дифтерийного токсина и родственных молекул и их активных фрагментов и гетеродимерных молекул, токсина рицина, холерного токсина,

шигиподобного токсина, LT-токсина, СЗ-токсина, шигатоксина, коклюшного токсина, столбнячного токсина, соевого ингибитора протеазы Боумана-Бирка, экзотоксина *Pseudomonas*, алорина, фукозида, капсидина, геланина, цепи А токсина фасоли, цепи А капсидина, альфа-бромотоксина, олеуропеина, белка стафилина, белка *Phytolacca americana*, ингибитора горькой тыквы, токсина ятрофы, токсина кротона, ингибитора мыльнянки, токсина манцинеллы, митогеллина, микотоксина трихотецена, токсинов феномицина и эноксидина; рибонуклеазы (РНКазы); ДНКазы I, стафилококкового эндотоксина А; противовирусного белка фитолакки; дифтерийного токсина; и эндотоксина *Pseudomonas*.

[000271] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный ингибитор микротубулина может представлять собой меденсин I или его аналог или производное; указанный антимераболит представляет собой аминоптерин, б-меркаптопурин, б-тиогуанин, цитарабин, флударабин, 5-фторурацил, дакарбазин, гидроксимочевину, аспарагиназу, гемцитабин или кладрибин; алкилирующий агент представляет собой азациитидин, тиофан, азациитидина бензоат, мелфалан, каразациитидин (BSNU), ломустин (CCNU), циклофосфамид, лейковорин, дибромоманнан, стрептозотозин, дакарбазин (DTIC), прокарбазин, митомицин С, цис-молибден, карбомолибден, дуокармицин А, дуокармицин SA, рахелмицин (CC-1065) или их аналоги или производные; антибиотики представляют собой блеомицин, адриамицин, идарубицин (или митомицин, митоксантрон, пуккамицин, антириксин (AMC)); антимераболитический агент представляет собой монометил ауристатин Е или F; молекула, родственная дифтерийному токсину, представляет собой цепь А дифтерийного токсина; токсин рицина представляет собой ригин А или дегликозилированный токсин цепи А рицина; шигиподобный токсин представляет собой SLT I, SLT II и SLT IIV; белки *Phytolacca americana* представляют собой PAPI, PAPII и PAP S.

[000272] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения радионуклид содержит: At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, I¹²³, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹², Tc⁹⁹, S³⁵, F¹⁹, N¹⁵, C¹⁴, C¹³ или H³; необязательно, указанный радионуклид может быть конъюгирован с антителом посредством хелатирующего агента.

[000273] Согласно некоторым вариантам реализации изобретения указанный цитокин содержит: ИЛ-2, ИЛ-4, ИЛ-6, ИЛ-7, ИЛ-10, ИЛ-12, ИЛ-13, ИЛ-15, ИЛ-18, ИЛ-23, ИЛ-24,

ИЛ-27, ИЛ_28А, ИЛ_28В, ИЛ-29, KGF ИФН- α , ИФН- β , ИФН- γ , ГМ-КСФ, CD40L, лиганд Flt3, фактор стволовых клеток, анизидин или ФНО- α .

Конъюгат антитело к CDH6 – лекарственное средство

[000274] Антитело против CDH6 по настоящему изобретению может быть конъюгировано с лекарственным средством через фрагмент линкерной структуры с получением конъюгата антитело против CDH6 – лекарственное средство. Лекарственное средство не ограничено конкретным образом, если оно имеет заместитель или подструктуру, которая может быть соединена с линкерной структурой. Конъюгат антитело против CDH6 – лекарственное средство можно применять для различных целей, соответствующих конъюгированному лекарственному средству. Примеры такого лекарственного средства могут включать вещества, обладающие противоопухолевой активностью, вещества, эффективные при заболеваниях крови, вещества, эффективные при аутоиммунных заболеваниях, противовоспалительные вещества, противомикробные вещества, антимикотические вещества, противопаразитарные вещества, противовирусные вещества и антианестетические вещества.

[000275] Цитотоксический агент

[000276] Пример, в котором применяется цитотоксический агент в качестве соединения для конъюгации в конъюгате антитело против CDH6 – лекарственное средство согласно настоящему изобретению, описан ниже. Цитотоксический агент не ограничен конкретным образом, при условии, что соединение обладает противоопухолевым действием и имеет заместитель или подструктуру, которая может быть соединена с линкерной структурой. При расщеплении части или всего линкера в опухолевых клетках цитотоксический агент высвобождается, таким образом оказывая противоопухолевый эффект. Поскольку линкер расщепляется в положении соединения с лекарственным средством, цитотоксический агент высвобождается в виде своей исходной структуры, вызывая свойственный ему исходный противоопухолевый эффект.

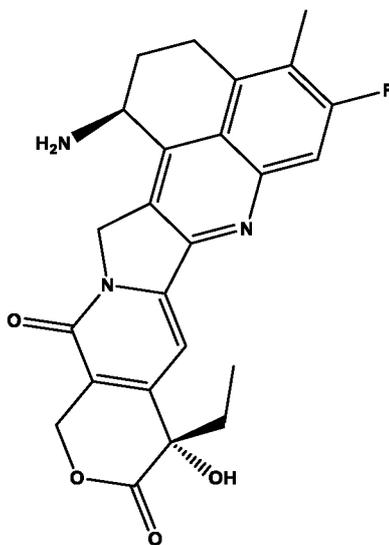
[000277] Согласно некоторым вариантам реализации настоящего изобретения указанный цитотоксический агент содержит ингибитор тубулина и/или ингибитор топоизомеразы. Например, цитотоксический агент может содержать: монOMETИЛАУРИСТАТИН E (ММАЕ), монOMETИЛАУРИСТАТИН F (ММАF), МЕДЕНСИН I, ПИРРОЛОБЕНЗОДИАЗЕПИН (PBD), КАМПТОТЕЦИН,

неморубицин, PNU-159682, антрациклины, бетакамицин, периллилалкалоиды, паклитаксел, монтелукаст, элинафид, калликреин, дуокармицин, рахелмицин (CC-1065) или их аналог, производное или пролекарство.

[000278] Согласно некоторым вариантам реализации указанный цитотоксический агент содержит ингибитор топоизомеразы I. Например, цитотоксический агент может содержать камптотецин (CPT) или его производное.

[000279] В качестве неограничивающего примера, камптотецин может включать производные камптотецина и камптотецина, в том числе, но не ограничиваясь перечисленным, иринотекан, топотекан, лортотекан, силатекан, этиринотекан пегол, TAS 103, 9-аминокамптотецин, 7-этилкамптотецин, 10-гидроксикамптотецин, 9-нитрокамптотецин, 10,11-метилендиоксикамптотецин, 9-амино-10,11-метилендиоксикамптотецин, 9-хлор-10,11-метилендиоксикамптотецин, 7-(4-метилпиперазинометил)-10, 11-этилендиокси-20(S)-камптотецин, 7-(4-метилпиперазинометил)-10, 11-метилендиокси-20(S)-камптотецин и 7-(2-N-изопропиламино)этил)-(20S)-камптотецин и их стереоизомеры, соли и сложные эфиры.

[000280] В качестве одного примера цитотоксического агента, применяемого согласно настоящему изобретению, можно предпочтительно использовать производное камптотецина ((1S,9S) -1-амино-9-этил-5-фтор-2,3-дигидро-9-гидрокси-4-метил-1H,12H-бензо[де]пирано[3',4':6,7]индолизино[1,2-b]хинолин-10,13(9H,15H)-дион, представленный формулой ниже).



Формула II

[000281] Экзатекан может быть легко получен, например, способом, описанным в патентной публикации США № US2016/0297890, или другими известными способами, и аминогруппа в положении 1 предпочтительно может быть использована в качестве положения для соединения с линкерной структурой.

[000282] Поскольку экзатекан имеет структуру камптотецина, известно, что равновесие смещается к структуре со сформированным лактоновым кольцом (замкнутым кольцом) в кислой водной среде (например, при значениях порядка рН 3), а в основной водной среде (например, при значениях порядка рН 10) равновесие смещается к структуре с открытым лактоновым кольцом (незамкнутым кольцом). Формула II, как описано в настоящем документе, включает таутомер, мезомер, рацемат, энантиомер или диастереомер или их смеси, или фармацевтически приемлемую соль или сольват перечисленного. Также ожидается, что конъюгат лекарственного средства, в который введены остатки экзатекана, соответствующие такой замкнутой кольцевой структуре и/или разомкнутой кольцевой структуре, будет иметь эквивалентный противоопухолевый эффект, и, безусловно, любой из таких конъюгатов лекарственного средства включен в объем настоящего изобретения.

[000283] Другие примеры цитотоксического агента могут включать цитотоксические агенты, описанные в литературе (Pharmacological Reviews, 68, p. 3-19, 2016). Конкретные примеры могут включать доксорубицин, калихеамицин, доластатин 10, ауристатин, такие как монометилауристатин E (MMAE) и монометилауристатин F (MMAF), майтансиноиды, такие как DM1 и DM4, димер пирролбензодиазепина SG2000 (SJG-136), производное камптотецина SN-38, дуокармицины, такие как CC-1065, аманидин, даунорубицин, митомицин C, блеомицин, циклоцитидин, винкристин, винбластин, метотрексат, противоопухолевые агенты на основе платины (цисплатин и его производные), а также таксол и его производные.

[000284] В случае конъюгата антитело – лекарственное средство количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела является ключевым фактором, влияющим на его эффективность и безопасность. Получение конъюгата антитело – лекарственное средство осуществляют путем определения условий реакции, таких как количество исходных материалов и реагентов, используемых для реакции, для достижения постоянного количества конъюгированных молекул

лекарственного средства. В отличие от химической реакции низкомолекулярного соединения, обычно образуется смесь, содержащая различное количество конъюгированных молекул лекарственного средства. Количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела определяют и указывают как среднее значение, т. е. среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства. Если не указано иное, то есть исключая случай, когда имеется в виду конъюгат антитела с лекарственным средством, содержащий конкретное количество конъюгированных молекул лекарственного средства, который включен в смесь конъюгата антитела с лекарственным средством с различным количеством конъюгированных молекул лекарственного средства, под количеством конъюгированных молекул лекарственного средства согласно настоящему изобретению также понимают, как правило, среднее значение. Количество молекул экзатекана, конъюгированных с молекулой антитела, можно контролировать, и в качестве среднего количества конъюгированных молекул лекарственного средства на антитело можно конъюгировать приблизительно от 1 до 10 молекул экзатекана. Количество молекул экзатекана предпочтительно составляет от 2 до 8, от 3 до 8, от 4 до 8, от 5 до 8, от 6 до 8 или от 7 до 8, более предпочтительно от 5 до 8, более предпочтительно от 7 до 8, еще более предпочтительно 8 молекул. Следует отметить, что специалист в данной области техники сможет разработать реакцию для конъюгации требуемого количества молекул лекарственного средства с молекулой антитела на основании описания примеров по настоящему изобретению, и сможет получить конъюгат антитело – лекарственное средство с контролируемым количеством конъюгированных молекул экзатекана.

[000285] Линкерная структура

[000286] Будет описана линкерная структура, которая конъюгирует лекарственный фрагмент с антителом против CDH6 в конъюгате антитело против CDH6 – лекарственное средство согласно настоящему изобретению. В конъюгате антитело – лекарственное средство по настоящему изобретению линкерная структура, которая конъюгирует антитело к CDH6 с лекарственным средством, не ограничена конкретным образом, если полученный конъюгат антитело – лекарственное средство подходит для применения. Линкерная структура может быть надлежащим образом выбрана и использована в соответствии с целью

применения. Один пример линкерной структуры может включать линкер, описанный в известных публикациях (Pharmacol Rev 68: 3-19, January 2016, Protein Cell DOI 10.1007/s13238-016-0323-0; и т.п.).

[000287] Предпочтительно может быть использована любая линкерная структура, представленная ниже. Отметим, что левый конец структуры представляет собой положение для соединения с антителом, а правый конец представляет собой положение для соединения с лекарственным средством. Далее, VA в линкерных структурах, приведенных ниже, представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из валина-аланина (VA), связанного через пептидные связи, а GGFG в линкерных структурах, представленных ниже, представляет собой аминокислотную последовательность, состоящую из глицина-глицина-фенилаланина-глицина (GGFG), связанных пептидными связями.

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-
 PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-
 CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-
 CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-; и

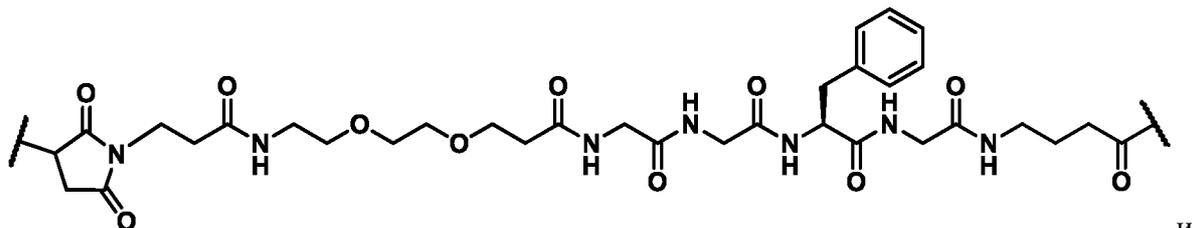
-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[000288] Согласно некоторым вариантам реализации указанный спейсер включает саморасщепляющиеся спейсеры. Например, саморасщепляющийся спейсер может содержать п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB).

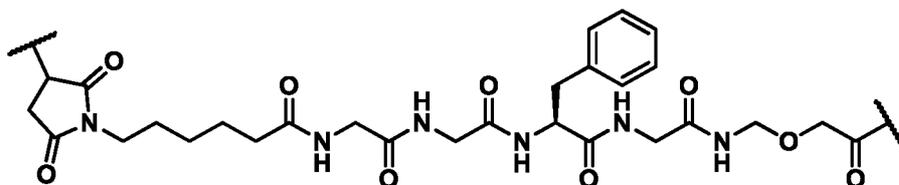
[000289] Согласно некоторым вариантам реализации расщепляемый пептид может прямо присоединяться к спейсеру при сплайсинге.

[000290] Согласно некоторым вариантам реализации L может содержать: -Val-Cit-PABC-, -Val-Ala-PABC-, -Glu-Val-Cit-PABC-, -Ala-Ala-Asn-PABC-, -Gly-Val-Cit-PABC-, -Gly-Gly-Gly-PABC-, -Gly-Gly-Phe-Gly-PABC-, -Val-Cit-PAB-, -Val-Ala-PAB-, -Glu-Val-Cit-PAB-, -Ala-Ala-Asn-PAB-, -Gly-Val-Cit-PAB-, -Gly-Gly-Gly-PAB- или -Gly-Gly-Phe-Gly-PAB-.

[000291] Например, L может быть выбран из следующей структуры:

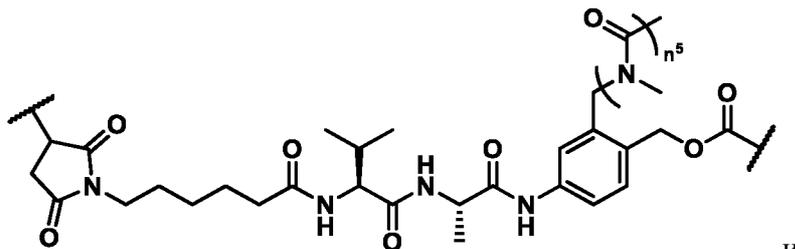


и

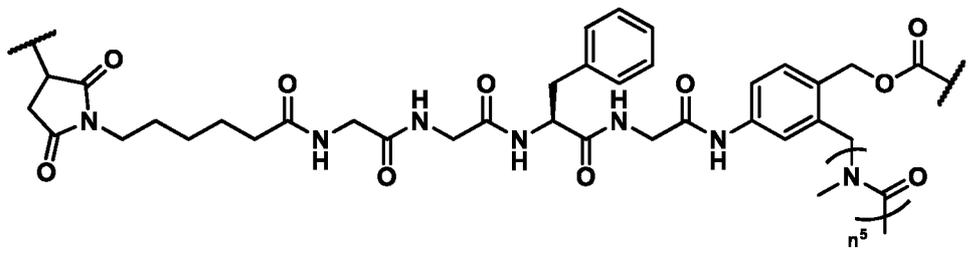


[000292] Согласно некоторым вариантам реализации п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB) содержит остаток полисаркозина (поли-N-метилглицина).

[000293] Согласно некоторым вариантам реализации L выбран из следующей структуры:



и



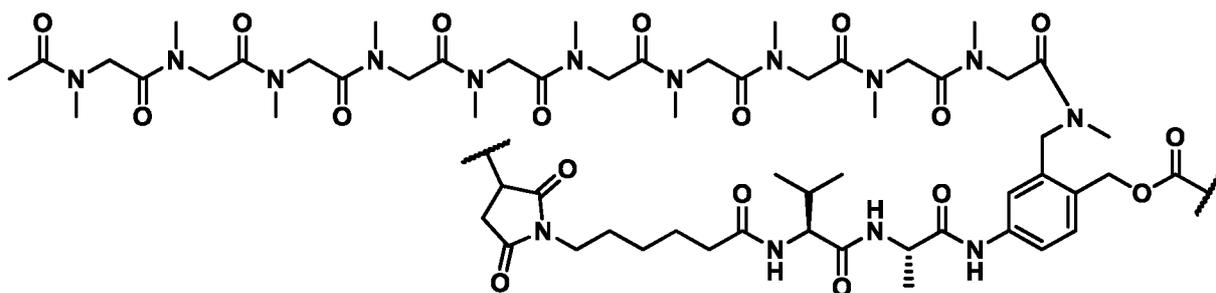
где n^5 обозначает целое число от 0 до 20, необязательно n^5 может обозначать целое число от 1 до 15.

[000294] Например, n^5 может быть равен 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20.

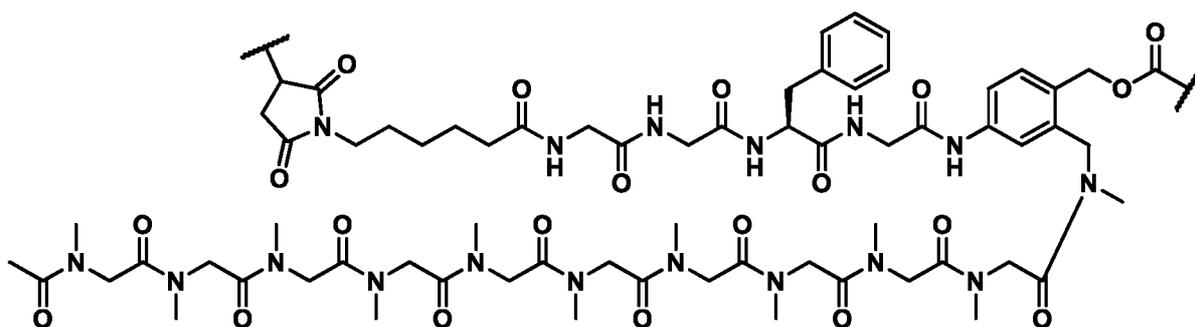
[000295] Например, n^5 может обозначать целое число от 1 до 20, от 1 до 19, от 1 до 18, от 1 до 17, от 1 до 16, от 1 до 15, от 1 до 14, от 1 до 13, от 1 до 12, от 1 до 11, от 1 до 10, от 1 до 9, от 1 до 8, от 1 до 7, от 1 до 6, от 1 до 5, от 1 до 4, от 1 до 3, от 1 до 2, от 2 до 20, от 2 до 19, от 2 до 18, от 2 до 17, от 2 до 16, от 2 до 15, от 2 до 14, от 2 до 13, от 2 до 12, от 2 до 11, от 2 до 10, от 2 до 9, от 2 до 8, от 2 до 7, от 2 до 6, от 2 до 5, от 2 до 4, от 2 до 3, от 3 до 20, от 3 до 19, от 3 до 18, от 3 до 17, от 3 до 16, от 3 до 15, от 3 до 14, от 3 до 13, от 3 до 12, от 3 до 11, от 3 до 10, от 3 до 9, от 3 до 8, от 3 до 7, от 3 до 6, от 3 до 5, от 3 до 4, от 4 до 20, от 4 до 19, от 4 до 18, от 4 до 17, от 4 до 16, от 4 до 15, от 4 до 14, от 4 до 13, от 4 до 12, от 4 до 11, от 4 до 10, от 4 до 9, от 4 до 8, от 4 до 7, от 4 до 6, от 4 до 5, от 5 до 20, от 5 до 19, от 5 до 18, от 5 до 17, от 5 до 16, от 5 до 15, от 5 до 14, от 5 до 13, от 5 до 12, от 5 до 11, от 5 до 10, от 5 до 9, от 5 до 8, от 5 до 7, от 5 до 6, от 6 до 20, от 6 до 19, от 6 до 18, от 6 до 17, от 6 до 16, от 6 до 15, от 6 до 14, от 6 до 13, от 6 до 12, от 6 до 11, от 6 до 10, от 6 до 9, от 6 до 8, от 6 до 7, от 7 до 20, от 7 до 19, от 7 до 18, от 7 до 17, от 7 до 16, от 7 до 15, от 7 до 14, от 7 до 13, от 7 до 12, от 7 до 11, от 7 до 10, от 7 до 9, от 7 до 8, от 8 до 20, от 8 до 19, от 8 до 18, от 8 до 17, от 8 до 16, от 8 до 15, от 8 до 14, от 8 до 13, от 8 до 12, от 8 до 11, от 8 до 10, от 8 до 9, от 9 до 20, от 9 до 19, от 9 до 18, от 9 до 17, от 9 до 16, от 9 до 15, от 9 до 14, от 9 до 13, от 9 до 12, от 9 до 11, от 9 до 10, от 10 до 20, от 10 до 19, от 10 до 18, от 10 до 17, от 10 до 16, от 10 до 15, от 10 до 14, от 10 до 13, от 10 до 12 или от 10 до 11.

[000296] Например, n^5 может обозначать целое число от 1 до 7. Например, n^5 может обозначать целое число от 8 до 15.

[000297] Например, L может быть выбран из следующей структуры:

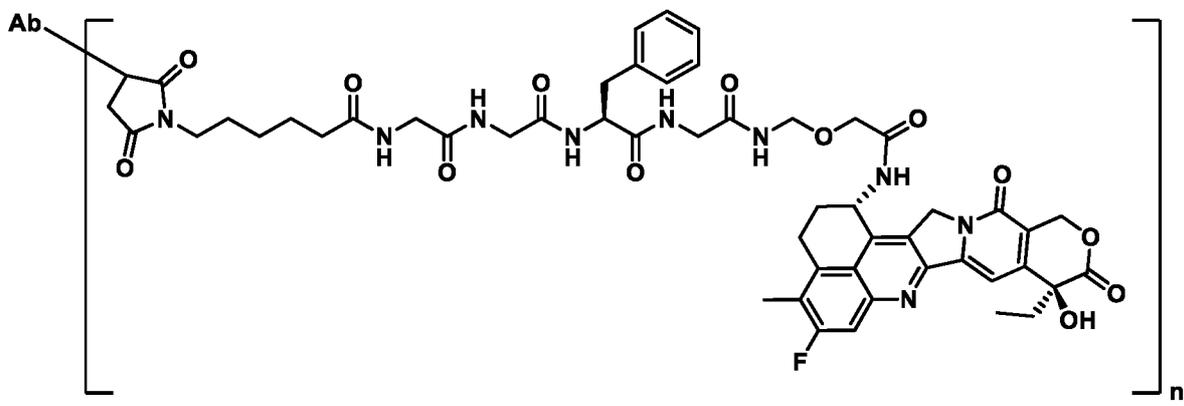


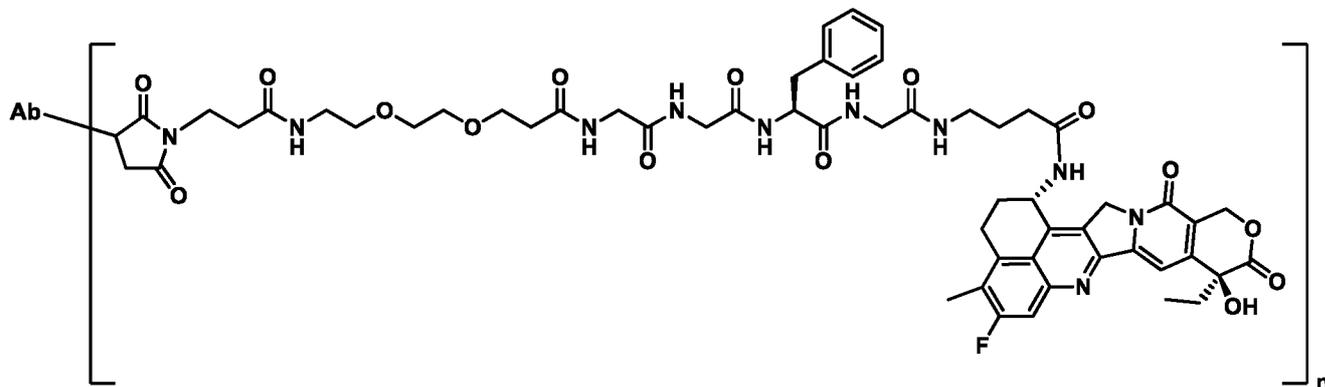
и



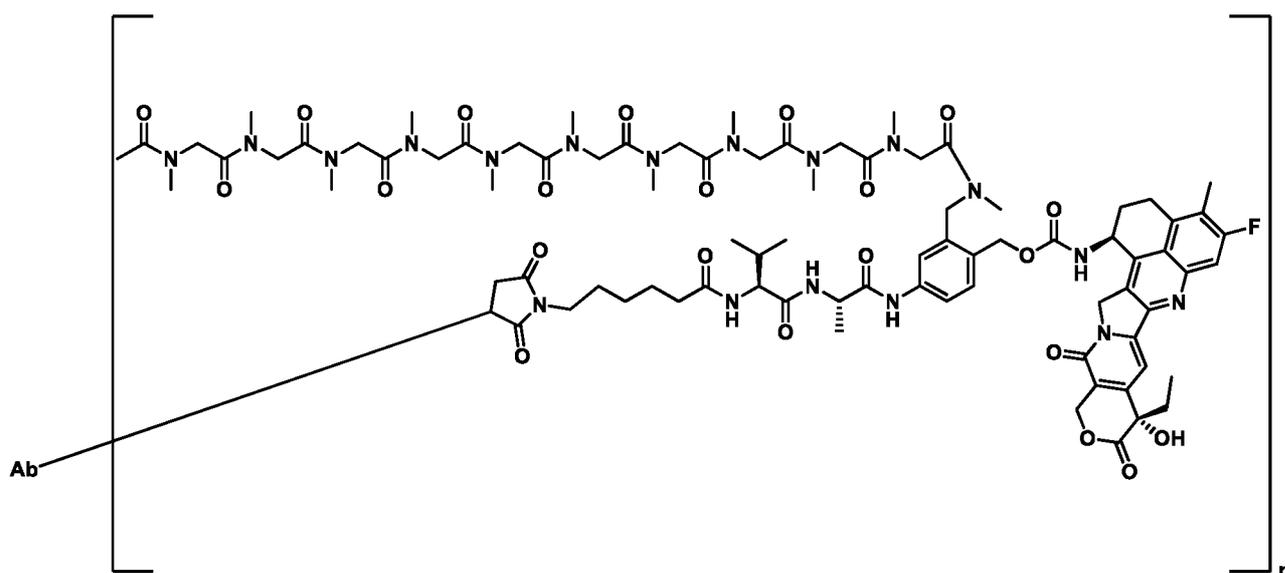
[000298] Конъюгат антитело – лекарственное средство может быть получен путем проведения реакции соединения, получаемого известным способом (например, получаемого способом, описанным в патентной публикации US2016/297890 (например, получаемого способом, описанным в параграфах [0336] – [0374])), с антителом, имеющим сульфгидрильную группу. Антитело, содержащее сульфгидрильную группу, может быть получено способом, хорошо известным специалисту в данной области техники (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)).

[000299] Один конкретный пример конъюгата антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитело – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную следующей формулой:

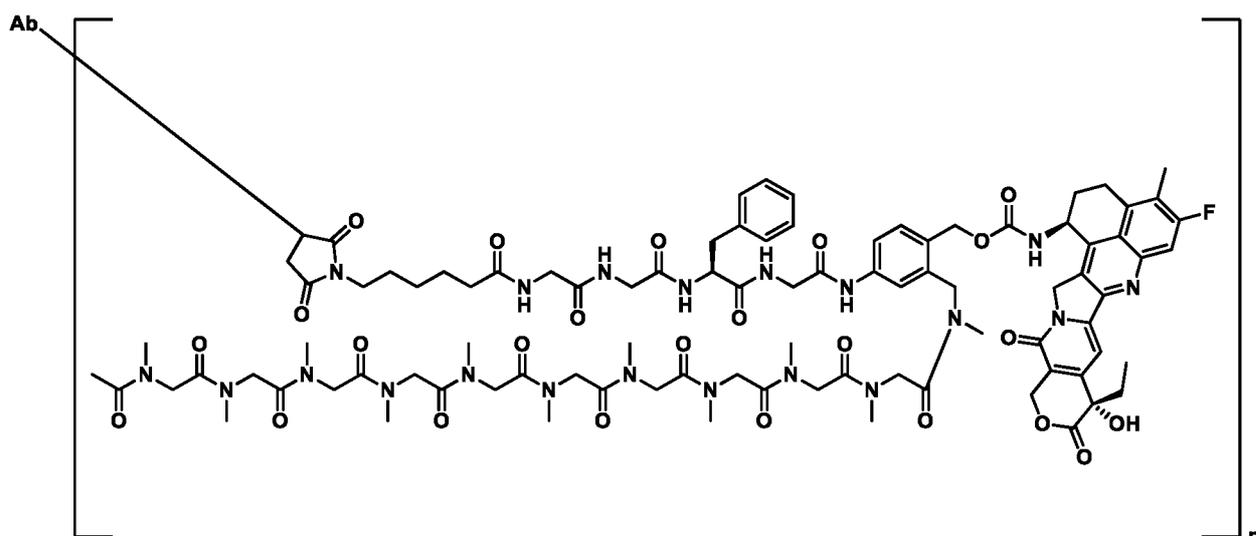




;



И



;

где n может представлять собой любое число от 1 до 10. Например, n может представлять собой любое число от 1 до 9,5, от 1 до 9, от 1 до 8,5, от 1 до 8, от 1 до 7,5, от 1 до 7, от 1 до 6,5, от 1 до 6, от 1 до 5,5, от 1 до 5, от 1 до 4,5, от 1 до 4, от 1 до 3,5, от 1 до 3, от 1 до 2,5,

от 1 до 2, от 1 до 1,5, от 1,5 до 9,5, от 1,5 до 9, от 1,5 до 8,5, от 1,5 до 8, от 1,5 до 7,5, от 1,5 до 7, от 1,5 до 6,5, от 1,5 до 6, от 1,5 до 5,5, от 1,5 до 5, от 1,5 до 4,5, от 1,5 до 4, от 1,5 до 3,5, от 1,5 до 3, от 1,5 до 2,5, от 1,5 до 2, от 2 до 9,5, от 2 до 9, от 2 до 8,5, от 2 до 8, от 2 до 7,5, от 2 до 7, от 2 до 6,5, от 2 до 6, от 2 до 5,5, от 2 до 5, от 2 до 4,5, от 2 до 4, от 2 до 3,5, от 2 до 3, от 2 до 2,5, от 2,5 до 9,5, от 2,5 до 9, от 2,5 до 8,5, от 2,5 до 8, от 2,5 до 7,5, от 2,5 до 7, от 2,5 до 6,5, от 2,5 до 6, от 2,5 до 5,5, от 2,5 до 5, от 2,5 до 4,5, от 2,5 до 4, от 2,5 до 3,5, от 2,5 до 3, от 3 до 9,5, от 3 до 9, от 3 до 8,5, от 3 до 8, от 3 до 7,5, от 3 до 7, от 3 до 6,5, от 3 до 6, от 3 до 5,5, от 3 до 5, от 3 до 4,5, от 3 до 4, от 3 до 3,5, от 3,5 до 9,5, от 3,5 до 9, от 3,5 до 8,5, от 3,5 до 8, от 3,5 до 7,5, от 3,5 до 7, от 3,5 до 6,5, от 3,5 до 6, от 3,5 до 5,5, от 3,5 до 5, от 3,5 до 4,5, от 3,5 до 4, от 4 до 9,5, от 4 до 9, от 4 до 8,5, от 4 до 8, от 4 до 7,5, от 4 до 7, от 4 до 6,5, от 4 до 6, от 4 до 5,5, от 4 до 5, от 4 до 4,5, от 4,5 до 9,5, от 4,5 до 9, от 4,5 до 8,5, от 4,5 до 8, от 4,5 до 7,5, от 4,5 до 7, от 4,5 до 6,5, от 4,5 до 6, от 4,5 до 5,5, от 4,5 до 5, от 5 до 9,5, от 5 до 9, от 5 до 8,5, от 5 до 8, от 5 до 7,5, от 5 до 7, от 5 до 6,5, от 5 до 6, от 5 до 5,5, от 5,5 до 9,5, от 5,5 до 9, от 5,5 до 8,5, от 5,5 до 8, от 5,5 до 7,5, от 5,5 до 7, от 5,5 до 6,5, от 5,5 до 6, от 6 до 9,5, от 6 до 9, от 6 до 8,5, от 6 до 8, от 6 до 7,5, от 6 до 7, от 6 до 6,5, от 6,5 до 9,5, от 6,5 до 9, от 6,5 до 8,5, от 6,5 до 8, от 6,5 до 7,5, от 6,5 до 7, от 7 до 9,5, от 7 до 9, от 7 до 8,5, от 7 до 8, от 7 до 7,5, от 7,5 до 9,5, от 7,5 до 9, от 7,5 до 8,5, от 7,5 до 8, от 8 до 9,5, от 8 до 9, от 8 до 8,5, от 8,5 до 9,5 или от 8,5 до 9.

[000300] В этом контексте Ab представляет собой антитело против CDH6, раскрытое в настоящем описании, и указанное антитело конъюгировано с линкером – рабочим веществом посредством сульфгидрильной группы, происходящей из антитела. В этом контексте n имеет то же значение, что и так называемое DAR (отношение лекарственное средство:антитело), и представляет собой отношение лекарственное средство:антитело на каждое антитело. В частности, n представляет собой число конъюгированных молекул лекарственного средства на каждую молекулу антитела, которое является числовым значением, определенным и указанным как среднее значение, то есть среднее число конъюгированных молекул лекарственного средства. Согласно настоящему изобретению n может представлять собой число от 2 до 8 и предпочтительно – от 5 до 8, более предпочтительно от 7 до 8 и еще более предпочтительно может представлять собой 8 при измерении по общей методике F.

[000301] Один пример конъюгата антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитело – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную вышеописанной формулой, где антитело, представленное Ab, включает любое одно антитело, выбранное из группы, состоящей из следующих антител (a) – (k), функционального фрагмента указанного антитела и фармакологически приемлемой соли указанного конъюгата антитело – лекарственное средство:

(a) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73;

(b) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76;

(c) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 74, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77;

(d) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 76;

(e) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 75, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 77;

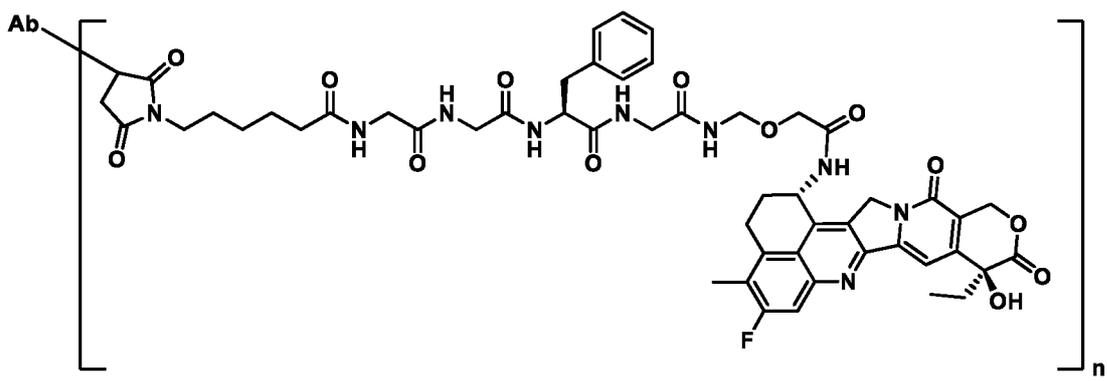
(f) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81;

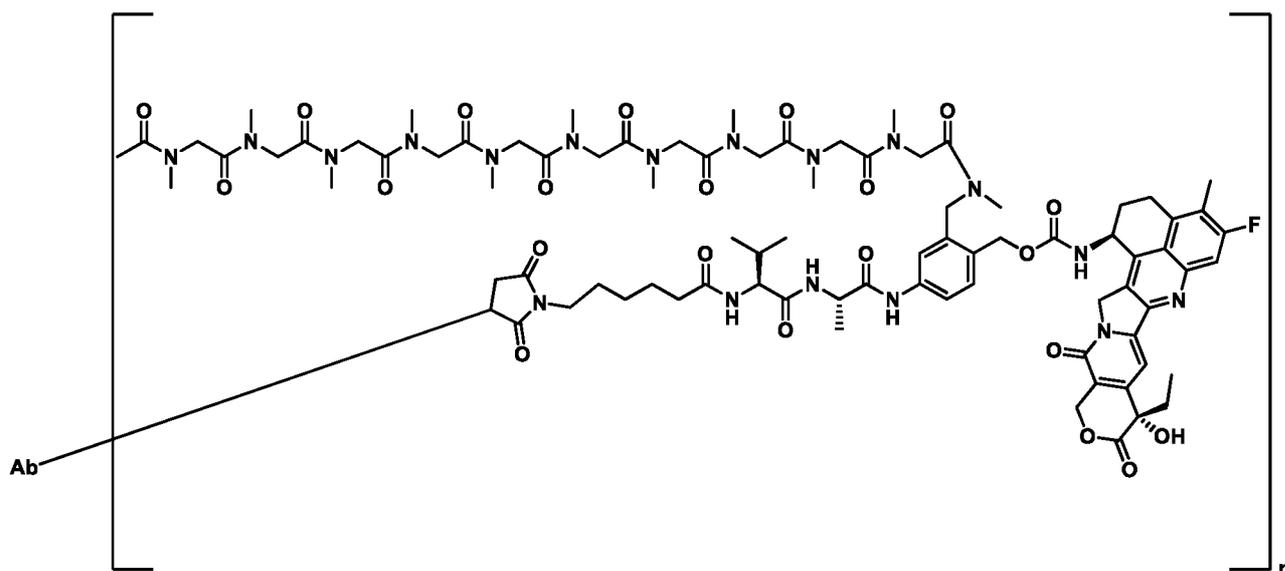
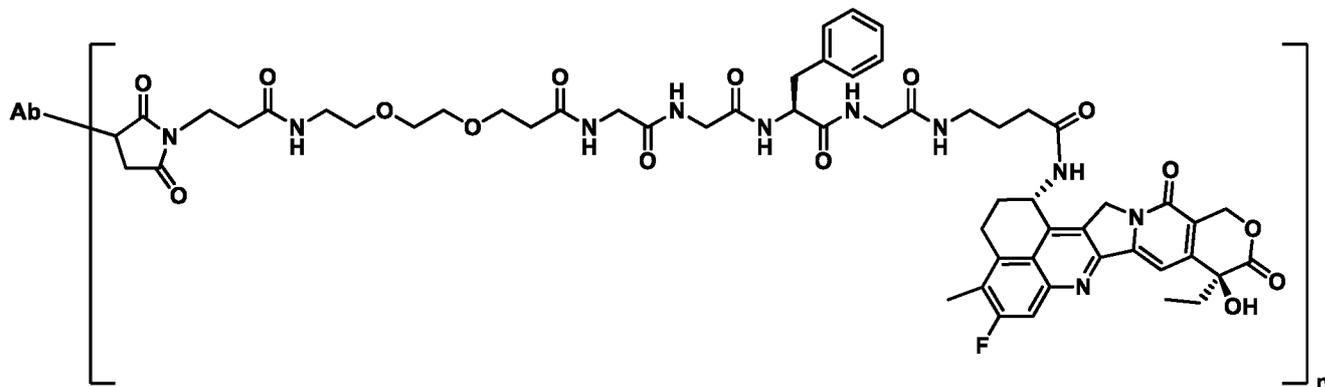
(g) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82;

(h) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83;

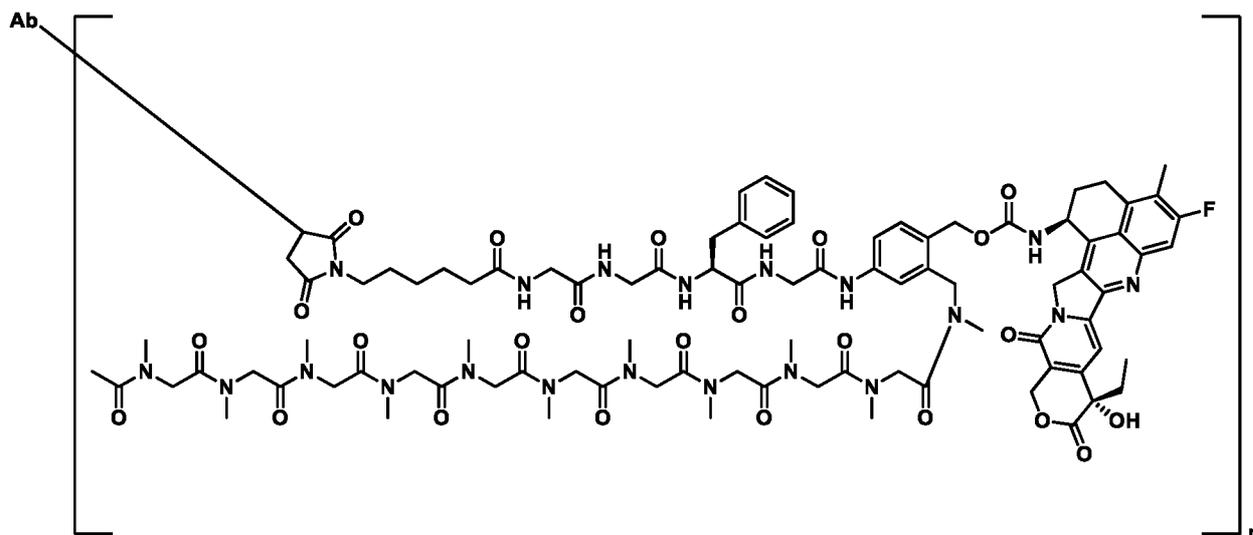
- (i) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 78, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84;
- (j) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 82;
- (k) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 83;
- (l) антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 79, и легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 84;
- (m) любое антитело, выбранное из группы, состоящей из антител (a) – (j), где тяжелая цепь или легкая цепь содержит одну или две или более модификаций, выбранных из группы, состоящей из посттрансляционных модификаций, заключающихся в N-связанном гликозилировании, O-связанном гликозилировании, N-концевом процессинге, C-концевом процессинге, дезамидировании, изомеризации аспарагиновой кислоты, окислении метионина, добавлении остатка метионина к N-концу, амидировании остатка пролина и превращении N-концевого глутамина или N-концевой глутаминовой кислоты в пироглутаминовую кислоту; и делеции одной или двух аминокислот на карбоксильном конце.

[000302] Один из примеров конъюгата антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитело – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную следующей формулой:





ИЛИ

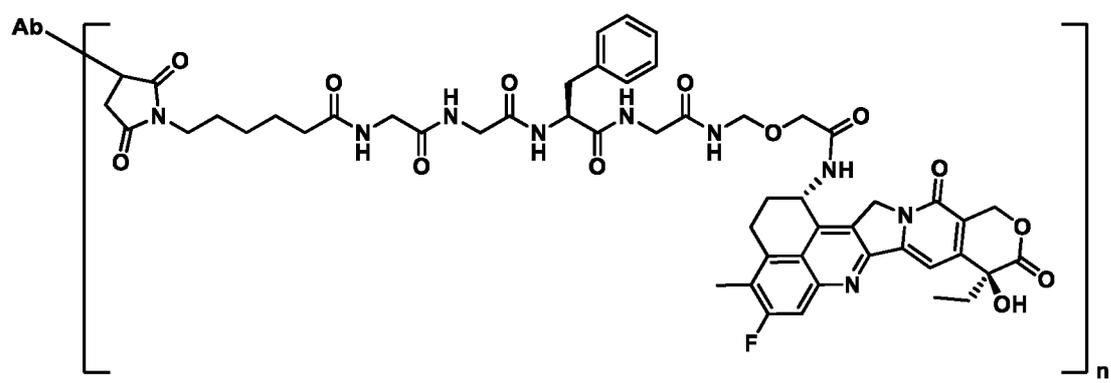


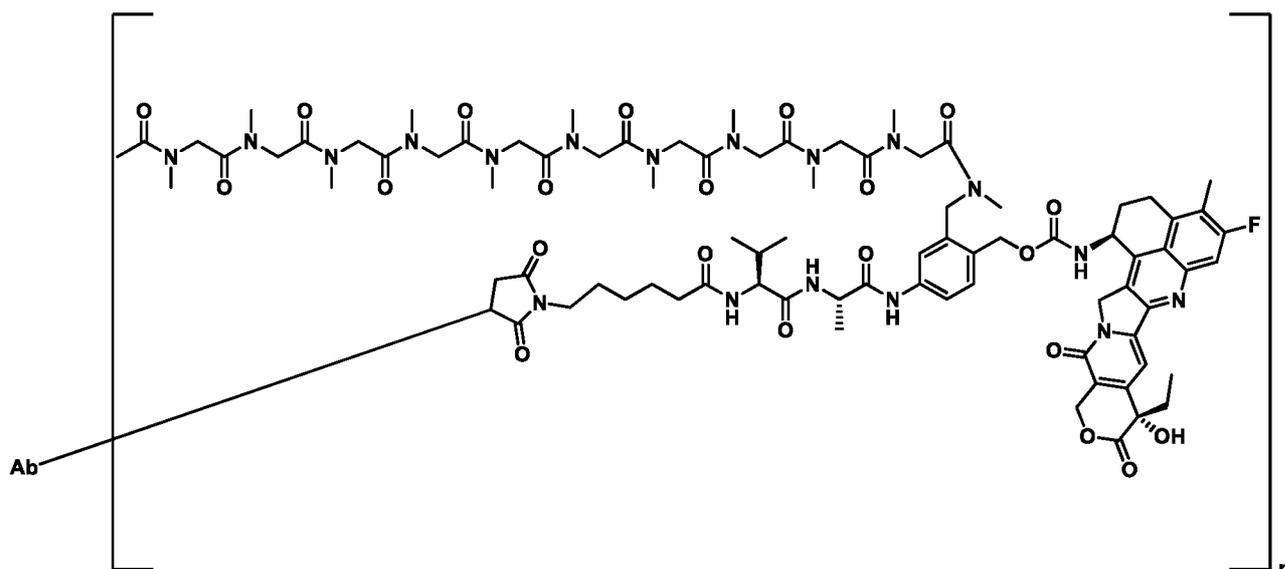
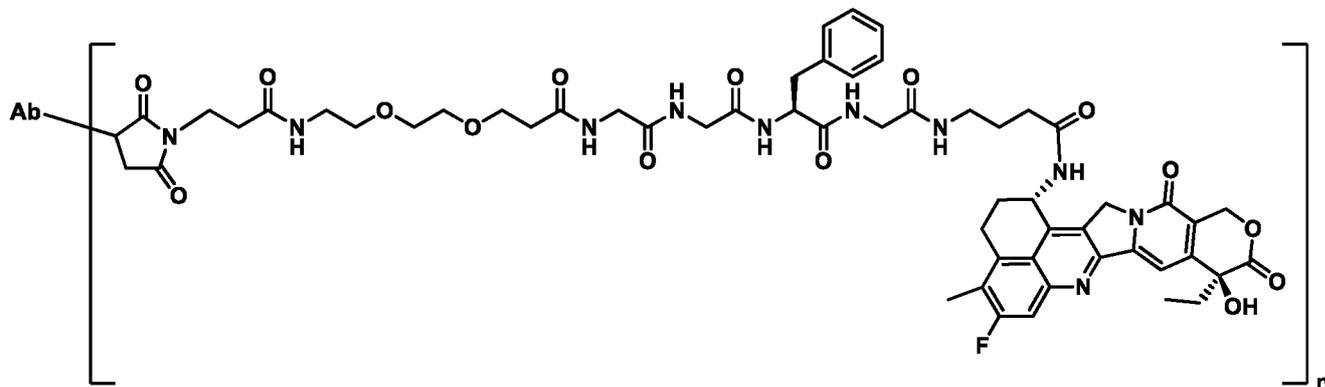
; где n может представлять собой любое число от 1 до 10;

где антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую

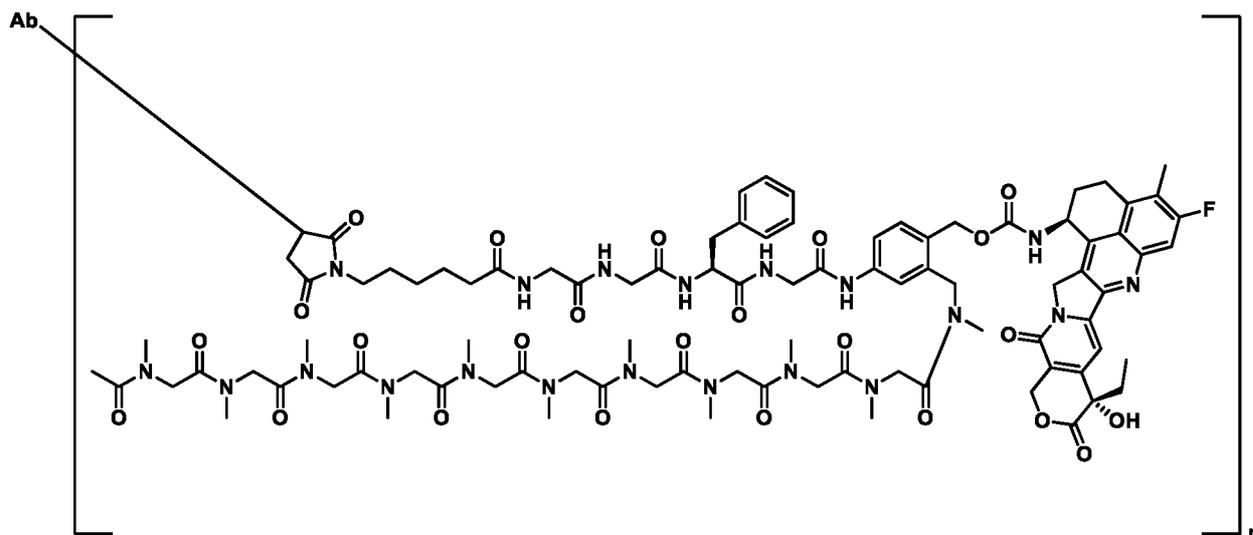
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и/или переменную область легкой цепи, содержащую (1) CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (2) CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и (3) CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и где n представляет собой число от 1 до 10 (например, от 2 до 10, от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до 10, от 7 до 10 и от 8 до 10). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит CL069707-H1L1, CL069707-H1L2, CL069707-H2L1 или CL069707-H2L2.

[000303] Один из примеров конъюгата антитела – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитела – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную следующей формулой:





ИЛИ

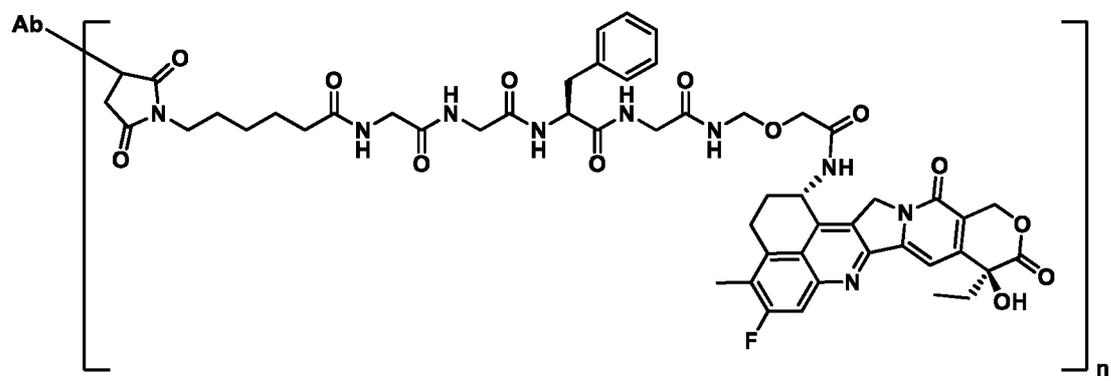


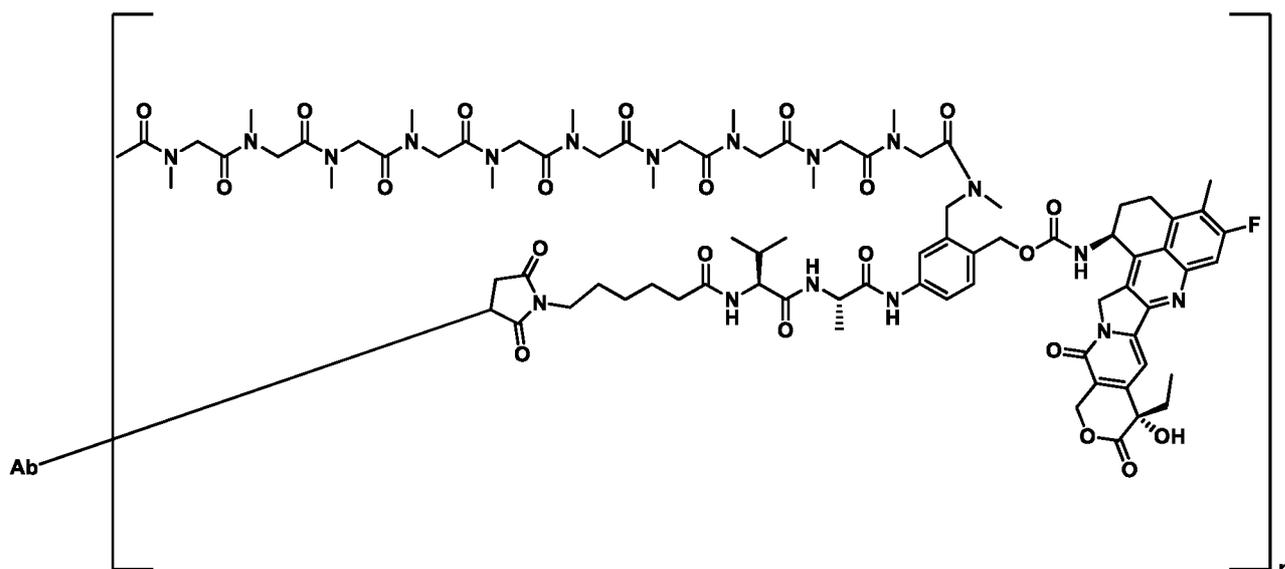
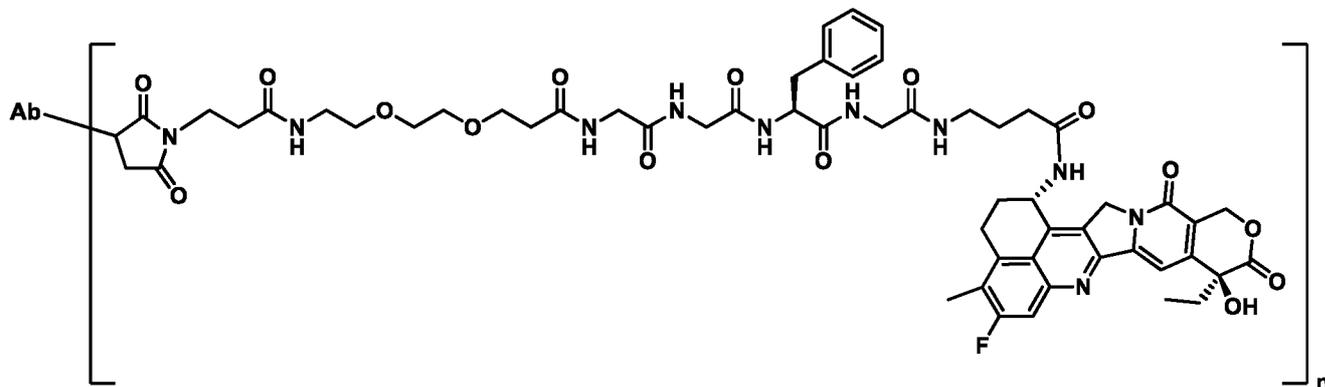
; где n может представлять собой любое число от 1 до 10;

где антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую

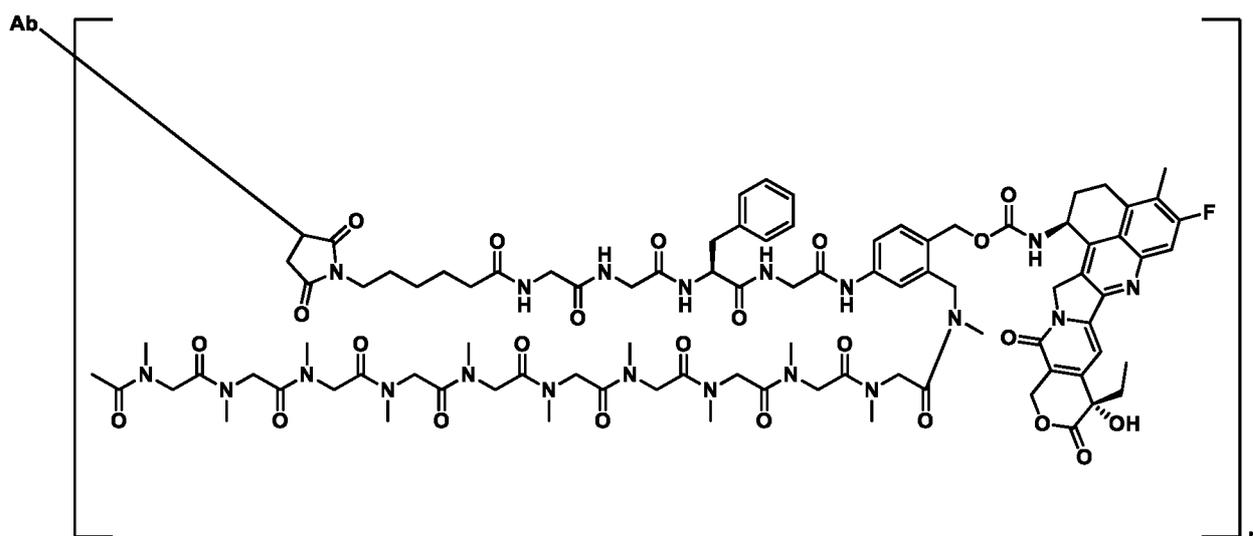
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; и (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10, и/или переменную область легкой цепи, содержащую (1) CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; (2) CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 12; и (3) CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 13; и где n представляет собой число от 1 до 10 (например, от 2 до 10, от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до 10, от 7 до 10 и от 8 до 10). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит CL069463-H1L1, CL069463-H1L2, CL069463-H1L3, CL069463-H2L1, CL069463-H2L2 или CL069463-H2L3.

[000304] Один из примеров конъюгата антитела – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитела – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную следующей формулой:





ИЛИ

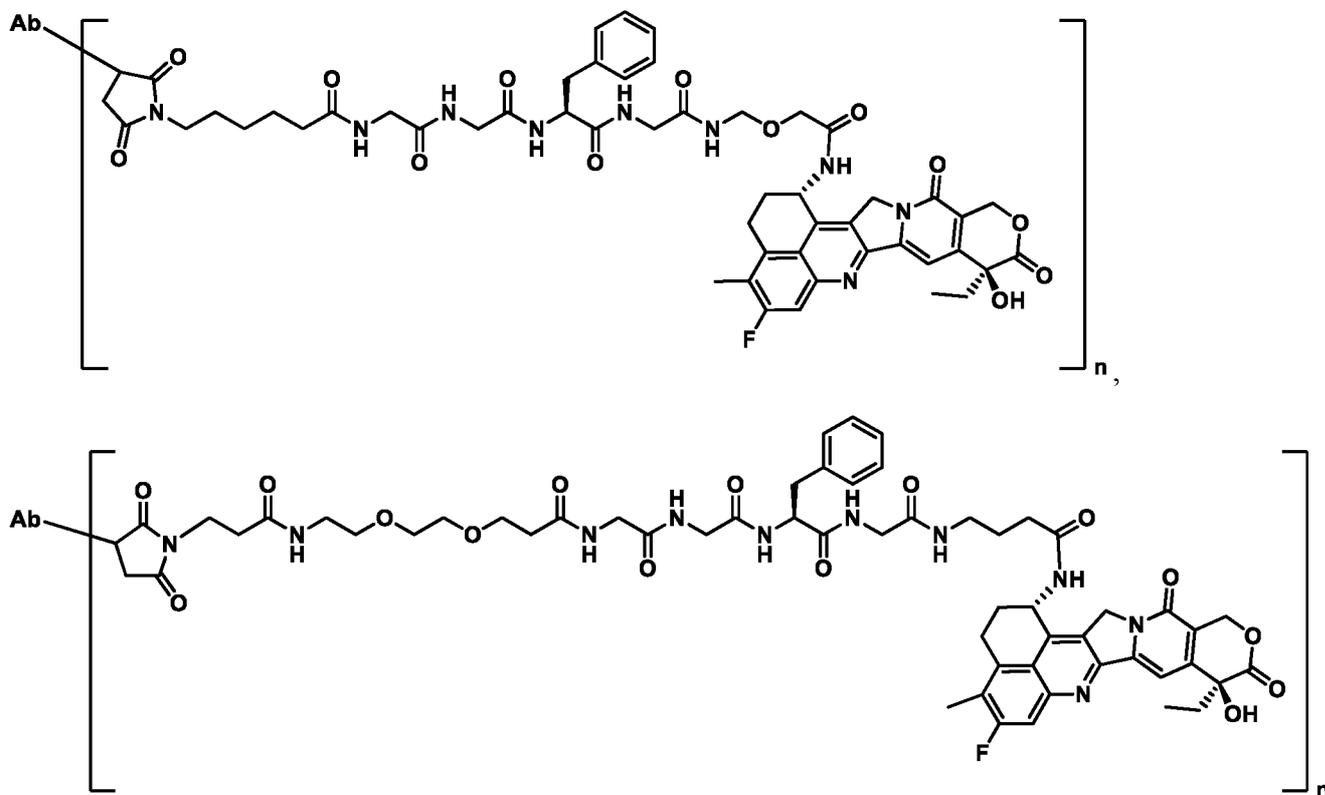


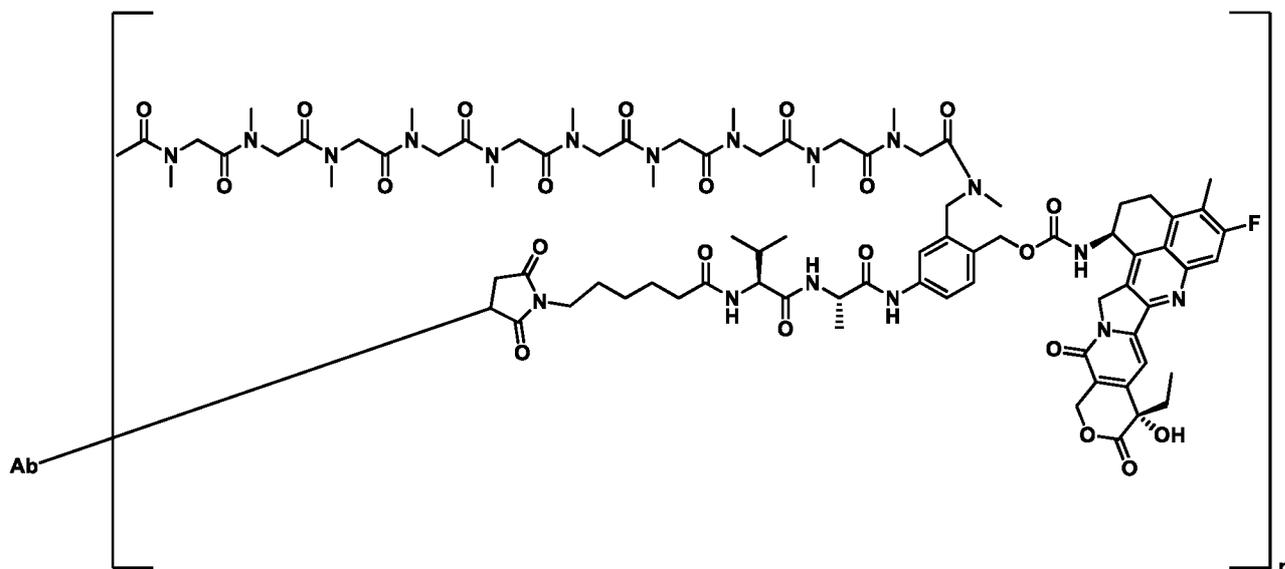
; где n может представлять собой любое число от 1 до 10;

где антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 89; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую

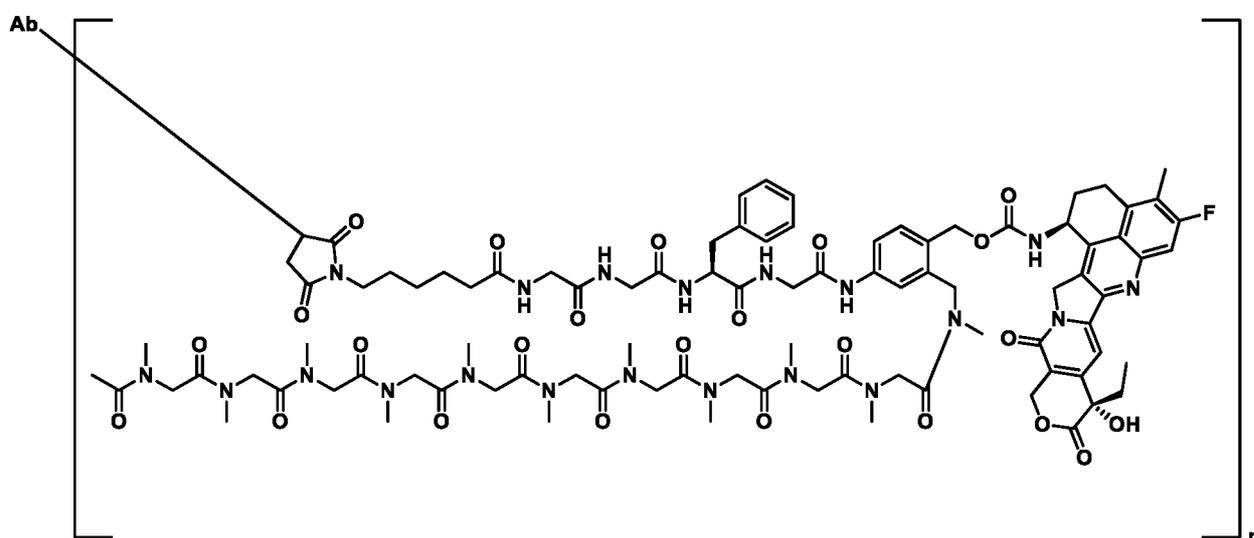
аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 90; и (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 91, и/или переменную область легкой цепи, содержащую (1) CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 92; (2) CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 93; и (3) CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 94; и где n представляет собой число от 1 до 10 (например, от 2 до 10, от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до 10, от 7 до 10 и от 8 до 10). Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96.

[000305] Один из примеров конъюгата антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитело – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную следующей формулой:





ИЛИ

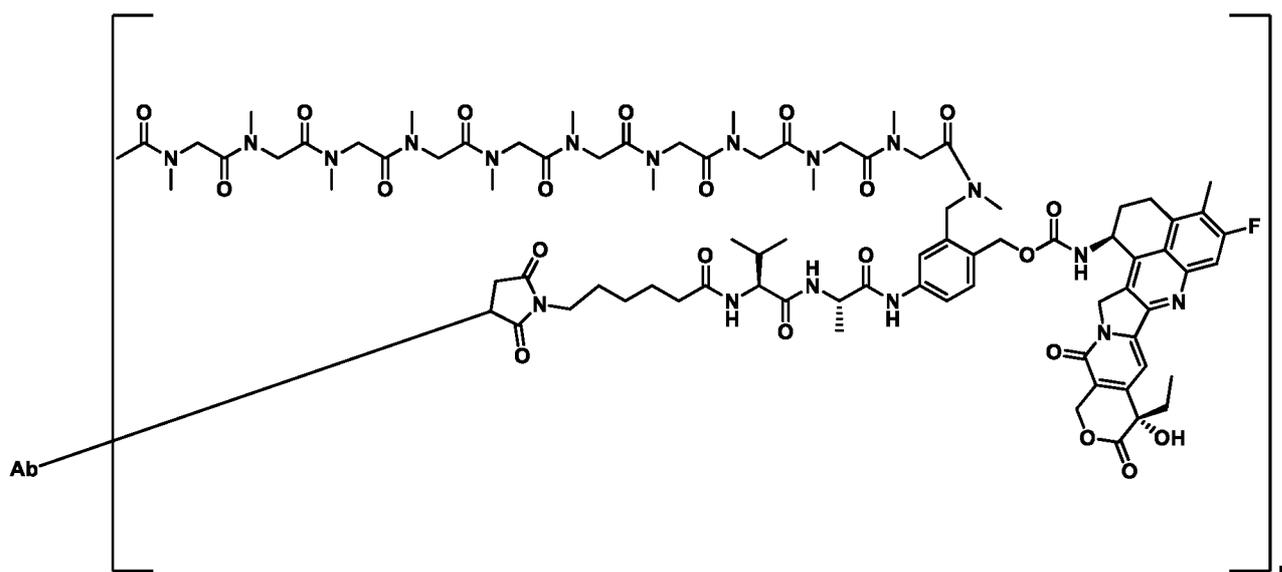


; где n может представлять собой любое число от 1 до 10;

где антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 97; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 98; и (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 99, и/или переменную область легкой цепи, содержащую (1) CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 100; (2) CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 101; и (3) CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 102; и где n представляет собой число от 1 до 10 (например, от 2 до 10, от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до

10, от 7 до 10 и от 8 до 10). Согласно некоторым вариантам реализации антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 104.

[000306] Один из примеров конъюгата антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению может включать конъюгат антитело – лекарственное средство, имеющий структуру, представленную следующей формулой:



; где n может представлять собой любое число от 1 до 10;

где антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую (1) CDR1 тяжелой цепи (HCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2; (2) CDR2 тяжелой цепи (HCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3; и (3) CDR3 тяжелой цепи (HCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4, и/или переменную область легкой цепи, содержащую (1) CDR1 легкой цепи (LCDR1), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5; (2) CDR2 легкой цепи (LCDR2), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; и (3) CDR3 легкой цепи (LCDR3), имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; и где n представляет собой число от 1 до 10 (например, от 2 до 10, от 4 до 10, от 5 до 10, от 6 до 10, от 7 до 10 и от 8 до 10). Согласно некоторым вариантам реализации антитело, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую

аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68. Согласно некоторым вариантам реализации антитела, представленное Ab, содержит CL069707-H1L1.

[000307] Медикамент

[000308] Конъюгат антитела – лекарственное средство против CDH6 в примерах представляет собой конъюгат антитела против CDH6 и/или функционального фрагмента антитела против CDH6, обладающего активностью интернализации, и лекарственного средства, обладающего противоопухолевой активностью, такой как цитотоксическая активность. Поскольку указанный конъюгат антитела – лекарственное средство против CDH6 проявляет противоопухолевую активность в отношении раковых клеток, экспрессирующих CDH6, его можно применять в качестве медикамента и, в частности, в качестве терапевтического средства и/или профилактического средства против рака.

[000309] Конъюгат антитела – лекарственное средство против CDH6 согласно настоящему изобретению может абсорбировать влагу или содержать адсорбционную воду, например, превращаться в гидрат, если его оставляют на воздухе или подвергают процедурам перекристаллизации или очищения. Такое соединение или фармакологически приемлемая соль, содержащая воду, также включены в настоящее изобретение. Настоящее изобретение также может включать конъюгат антитела – лекарственное средство против CDH6, в котором один или более атомов, составляющих конъюгат антитела – лекарственное средство, заменены изотопами указанных атомов. Композиция, содержащая конъюгат антитела – лекарственное средство, меченный таким изотопом, подходит, например, для применения в качестве терапевтического агента, профилактического агента, исследовательского реагента, аналитического реагента, диагностического агента и диагностического агента для визуализации *in vivo*.

[000310] Тип рака, при котором применяют конъюгат антитело – лекарственное средство против CDH6 по настоящему изобретению, конкретным образом не ограничен, при условии, что указанный рак экспрессирует CDH6 в раковых клетках, подлежащих лечению. Примеры могут включать почечно-клеточную карциному (например, светлоклеточную карциному почки или папиллярную почечно-клеточную карциному), рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого (например, мелкоклеточный рак легкого или немелкоклеточный рак легкого), глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса и нейробластому, хотя не ограничиваются перечисленными, при условии, что указанный рак экспрессирует CDH6. Более предпочтительные примеры рака могут включать почечно-клеточную карциному (например, светлоклеточную карциному почки и папиллярную почечно-клеточную карциному) и рак яичника.

[000311] Конъюгат антитело – лекарственное средство против CDH6 согласно настоящему изобретению предпочтительно можно вводить млекопитающему, и более предпочтительно – человеку.

[000312] Вещество, используемое в фармацевтической композиции, содержащей конъюгат антитело – лекарственное средство против CDH6 согласно настоящему изобретению, может быть надлежащим образом выбрано из фармацевтических добавок и других веществ, обычно используемых в этой области техники, применительно к применяемой дозе или применяемой концентрации, а затем использовано.

[000313] Конъюгат антитело – лекарственное средство против CDH6 согласно настоящему изобретению можно вводить в виде фармацевтической композиции, содержащей один или более фармацевтически совместимых компонентов. Например, фармацевтическая композиция обычно содержит один или более фармацевтических носителей (например, стерилизованные жидкости (например, воду и масло (включая нефтяное масло и масло животного происхождения, растительного происхождения или синтетического происхождения (например, арахисовое масло, соевое масло, минеральное масло и кунжутное масло))). Вода является более типичным носителем при внутривенном введении фармацевтической композиции. Водный солевой раствор, водный раствор декстрозы и водный раствор глицерина также могут быть использованы в качестве жидкого носителя, в

частности, для инъекционного раствора. Подходящие фармацевтические основы известны в данной области техники. При необходимости композиция может также содержать следовое количество увлажняющего агента, эмульгирующего агента или рН-буферного агента.

[000314] Известны различные системы доставки, и они могут быть использованы для введения конъюгата антитело против CDH6 – лекарственное средство согласно настоящему изобретению. Примеры пути введения могут включать, не ограничиваясь перечисленными, внутрикожный, внутримышечный, внутривенный и подкожный пути. Введение может быть осуществлено, например, путем инъекции или болюсной инъекции. Согласно конкретному предпочтительному варианту реализации введение описанного выше конъюгата антитело – лекарственное средство осуществляют путем инъекции. Парентеральное введение является предпочтительным путем введения.

В настоящем документе раскрыты следующие конкретные варианты реализации:

[000315] **Вариант реализации 1:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, содержащие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывается с эпитопом кадгерина-6 (CDH6), причем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладает одним или более из следующих свойств:

- i) способен связываться с белком CDH6 со значением KD ниже чем приблизительно $3,1 \times 10^{-9}$ М в ИФА ELISA;
- ii) может быть интернализирован CDH6-экспрессирующей клеткой при связывании с CDH6.

[000316] **Вариант реализации 2:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 1, где CDH6 представляет собой белок CDH6 млекопитающего.

[000317] **Вариант реализации 3:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–2, где CDH6 представляет собой белок CDH6 человека.

[000318] **Вариант реализации 4:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–3, характеризующиеся тем, что указанное антитело содержит моноклональное антитело, поликлональное антитело, димер,

мультимер, интактное антитело, фрагмент антитела, антитело человека, гуманизированное антитело и/или химерное антитело.

[000319] **Вариант реализации 5:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–4, где указанный антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', Fv-фрагмент, F(ab')₂, scFv, di-scFv и/или dAb.

[000320] **Вариант реализации 6:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–5, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.

[000321] **Вариант реализации 7:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–6, где указанное антитело представляет собой химерное антитело, гуманизированное антитело и/или антитело человека.

[000322] **Вариант реализации 8:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–7, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR (область, определяющую комплементарность) вариабельной области тяжелой цепи (VH), причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 103.

[000323] **Вариант реализации 9:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–8, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит по меньшей мере одну CDR вариабельной области легкой цепи (VL), причем указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

[000324] **Вариант реализации 10:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–9, содержащие VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, и HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

[000325] **Вариант реализации 11:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–10, содержащие VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, и указанная HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO: 97.

[000326] **Вариант реализации 12:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–11, содержащие VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:90 или SEQ ID NO:98.

[000327] **Вариант реализации 13:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–12, содержащие VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 99.

[000328] **Вариант реализации 14:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–13, содержащие VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9, а HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10.

[000329] **Вариант реализации 15:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–14, содержащие VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; или где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99.

[000330] **Вариант реализации 16:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–15, содержащие VH, причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 103.

[000331] **Вариант реализации 17:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–16, содержащие константную область тяжелой цепи антитела.

[000332] **Вариант реализации 18:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 17, где константная область тяжелой цепи антитела содержит константную область, происходящую из IgG человека.

[000333] **Вариант реализации 19:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 17–18, где константная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70.

[000334] **Вариант реализации 20:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–16, содержащие тяжелую цепь антитела, причем указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 87.

[000335] **Вариант реализации 21:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–20, содержащие VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:92 или SEQ ID NO:100.

[000336] **Вариант реализации 22:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–21, содержащие VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 101.

[000337] **Вариант реализации 23:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–22, содержащие VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 94 или SEQ ID NO: 102.

[000338] **Вариант реализации 24:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–23, содержащие VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94; или

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

[000339] **Вариант реализации 25:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–24, содержащие VH и VL, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, а указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

[000340] **Вариант реализации 26:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–25, содержащие VH и VL, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2, HCDR3, и указанная VL содержит LCDR1, LCDR2, LCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную

последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

[000341] **Вариант реализации 27:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–26, содержащие VL, причем указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

[000342] **Вариант реализации 28:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–27, содержащие VH и

VL, причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46; или где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68; или где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69; или где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96; или где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 104.

[000343] **Вариант реализации 29:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–28, содержащие константную область легкой цепи антитела.

[000344] **Вариант реализации 30:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–29, где константная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71.

[000345] **Вариант реализации 31:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–30, содержащие легкую цепь антитела, причем указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:81 или SEQ ID NO:88.

[000346] **Вариант реализации 32:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–31, содержащие тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, при этом указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, и указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73; или при этом тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86; или при этом тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81; или при этом тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87, а легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88.

[000347] **Вариант реализации 33:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–32, дополнительно содержащие активный фрагмент, конъюгированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[000348] **Вариант реализации 34:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват согласно варианту реализации 33, где активный фрагмент содержит лекарственный фрагмент и/или метку.

[000349] **Вариант реализации 35:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват согласно варианту реализации 34, где лекарственный фрагмент выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, цитокина, нуклеиновой кислоты, молекулы, ассоциированной с нуклеиновой кислотой, радионуклида, хемокина, иммуно(ко)стимулирующей молекулы, иммуносупрессивной молекулы, лиганда смерти, белка, индуцирующего апоптоз, киназы, пролекарство-превращающего фермента, РНКазы, агонистического антитела или фрагмента антитела, антагонистического антитела или фрагмента антитела, фактора роста, гормона, фактора

коагуляции, фибринолитического белка, пептидов, имитирующих указанное, и их фрагментов, слитых белков и производных.

[000350] **Вариант реализации 36:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват согласно варианту реализации 34, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, агента для визуализации и иона металла.

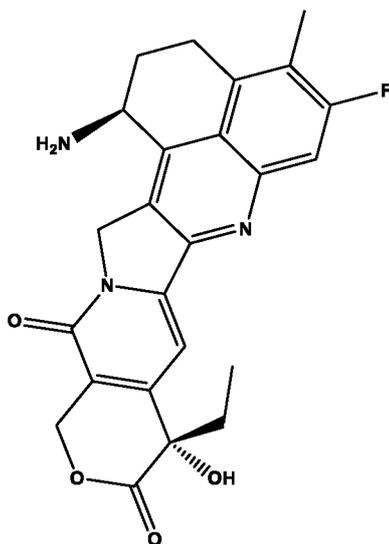
[000351] **Вариант реализации 37:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 35–36, где цитотоксический агент содержит лекарственное средство, разрушающее микротрубочки, и/или агент, повреждающий ДНК.

[000352] **Вариант реализации 38:** Иммунокомплекс, или его фармацевтически приемлемая соль, или сольват по любому из вариантов реализации 35–37, где указанный цитотоксический агент содержит ингибитор тубулина и/или ингибитор топоизомеразы.

[000353] **Вариант реализации 39:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 35–38, где указанный цитотоксический агент содержит ингибитор топоизомеразы I.

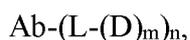
[000354] **Вариант реализации 40:** Иммуноконъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 35–39, где указанный цитотоксический агент содержит камптотетин или его производное.

[000355] **Вариант реализации 41:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 35–40, где указанный цитотоксический агент содержит следующую структуру формулы II:



(II)

[000356] **Вариант реализации 42:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–41, содержащие конъюгат антитело – лекарственное средство (ADC) формулы (I):



(I)

где Ab представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из вариантов реализации 1–41;

L представляет собой линкер;

D представляет собой лекарственный фрагмент;

m представляет собой целое число от 1 до 8; и

n представляет собой любое число от 1 до 10.

[000357] **Вариант реализации 43:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 42, где L выбран из: расщепляемого линкера и нерасщепляемого линкера.

[000358] **Вариант реализации 44:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–43, где L содержит расщепляемый пептид.

[000359] **Вариант реализации 45:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 44, где расщепляемый пептид может быть расщеплен ферментом.

[000360] **Вариант реализации 46:** Иммуноконъюгат по варианту реализации 45, где указанный фермент содержит катепсин В.

[000361] **Вариант реализации 47:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 44–46, где расщепляемый пептид или L содержит аминокислотную единицу.

[000362] **Вариант реализации 48:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 47, где аминокислотная единица содержит дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид.

[000363] **Вариант реализации 49:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 47–48, где аминокислотная единица выбрана из: Val-Cit, Val-Ala, Glu-Val-Cit, Ala-Ala-Asn, Gly-Val-Cit, Gly-Gly-Gly и Gly-Gly-Phe-Gly.

[000364] **Вариант реализации 50:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–49, где L содержит спейсер.

[000365] **Вариант реализации 51:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 50, где спейсер содержит саморасщепляющиеся спейсеры.

[000366] **Вариант реализации 52:** Иммуноконъюгат по варианту реализации 51, где указанный саморасщепляющийся спейсер содержит п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB).

[000367] **Вариант реализации 53:** Иммуноконъюгат по любому из вариантов реализации 44–52, где расщепляемый пептид прямо присоединяется к спейсеру при сплайсинге.

[000368] **Вариант реализации 54:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–53, где L содержит: -Val-Cit-PABC-, -Val-Ala-PABC-, -Glu-Val-Cit-PABC-, -Ala-Ala-Asn-PABC-, -Gly-Val-Cit-PABC-, -Gly-Gly-Gly-PABC-, -Gly-Gly-Phe-Gly-PABC-, -Val-Cit-PAB-, -Val-Ala-PAB-, -Glu-Val-Cit-PAB-, -Ala-Ala-Asn-PAB-, -Gly-Val-Cit-PAB-, -Gly-Gly-Gly-PAB- или -Gly-Gly-Phe-Gly-Ply-PAB-.

[000369] **Вариант реализации 55:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–54, где спейсер содержит структуру, представленную в $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{La}-\text{Lb}-\text{Lc}-$, где La обозначает $-\text{O}-$ или одинарную связь; Lb обозначает $-\text{CR}^2(-\text{CR}^3)-$ или одинарную связь, где каждый из R^2 и R^3 независимо обозначает $\text{C}_1\text{--}\text{C}_6$ алкил, $-(\text{CH}_2)_{n^a}-\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{n^b}-\text{COOH}$ или $-(\text{CH}_2)_{n^c}-\text{OH}$, n^1 обозначает целое число от 0 до 6, каждый из n^a , n^b и n^c независимо обозначает целое число от 1 до 4, при этом R^2 и R^3 не являются одинаковыми, если n^a равен 0, и Lc обозначает $-\text{C}(=\text{O})-$.

[000370] **Вариант реализации 56:** Иммуноконъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или сольват согласно варианту реализации 55, где спейсер содержит $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.

[000371] **Вариант реализации 57:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–56, где L содержит структуру, представленную в $-\text{L}_1-\text{L}_2-\text{L}_3-$, где L_1 обозначает $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n^4}-\text{C}(=\text{O})-$, где n^2 обозначает целое число от 2 до 8, n^3 обозначает целое число от 1 до 8, и n^4 обозначает целое число от 1 до 8; L_2 обозначает аминокислотную единицу; L_3 обозначает саморазлагающийся спейсер.

[000372] **Вариант реализации 58:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–57, где L выбран из:

- $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$
- $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$
- $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-PABC}-;$
- $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$
- $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$
- $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$
- $-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$
- $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-
 NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-
 PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

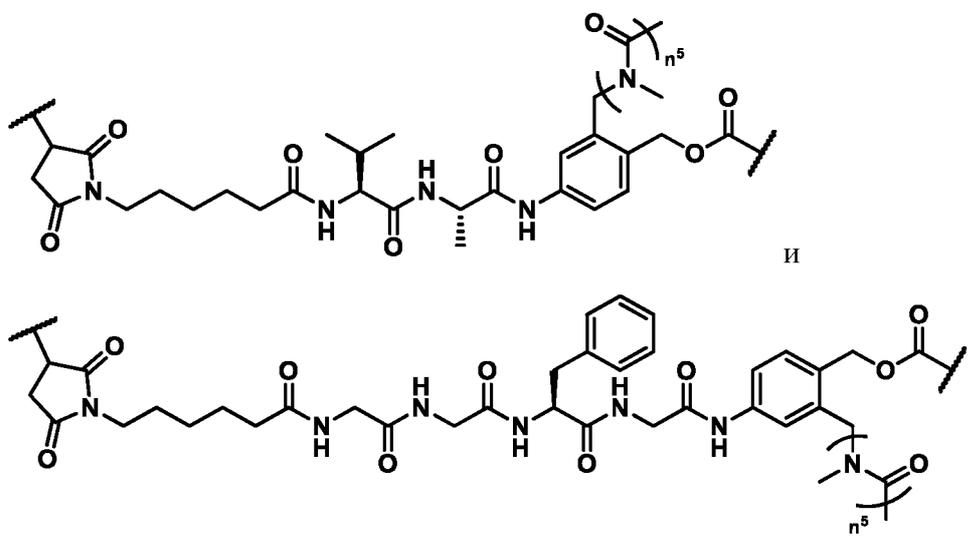
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-; и

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[000373] **Вариант реализации 59:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 52–58, где п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB) содержит остаток полисаркозина (поли-N-метилглицина).

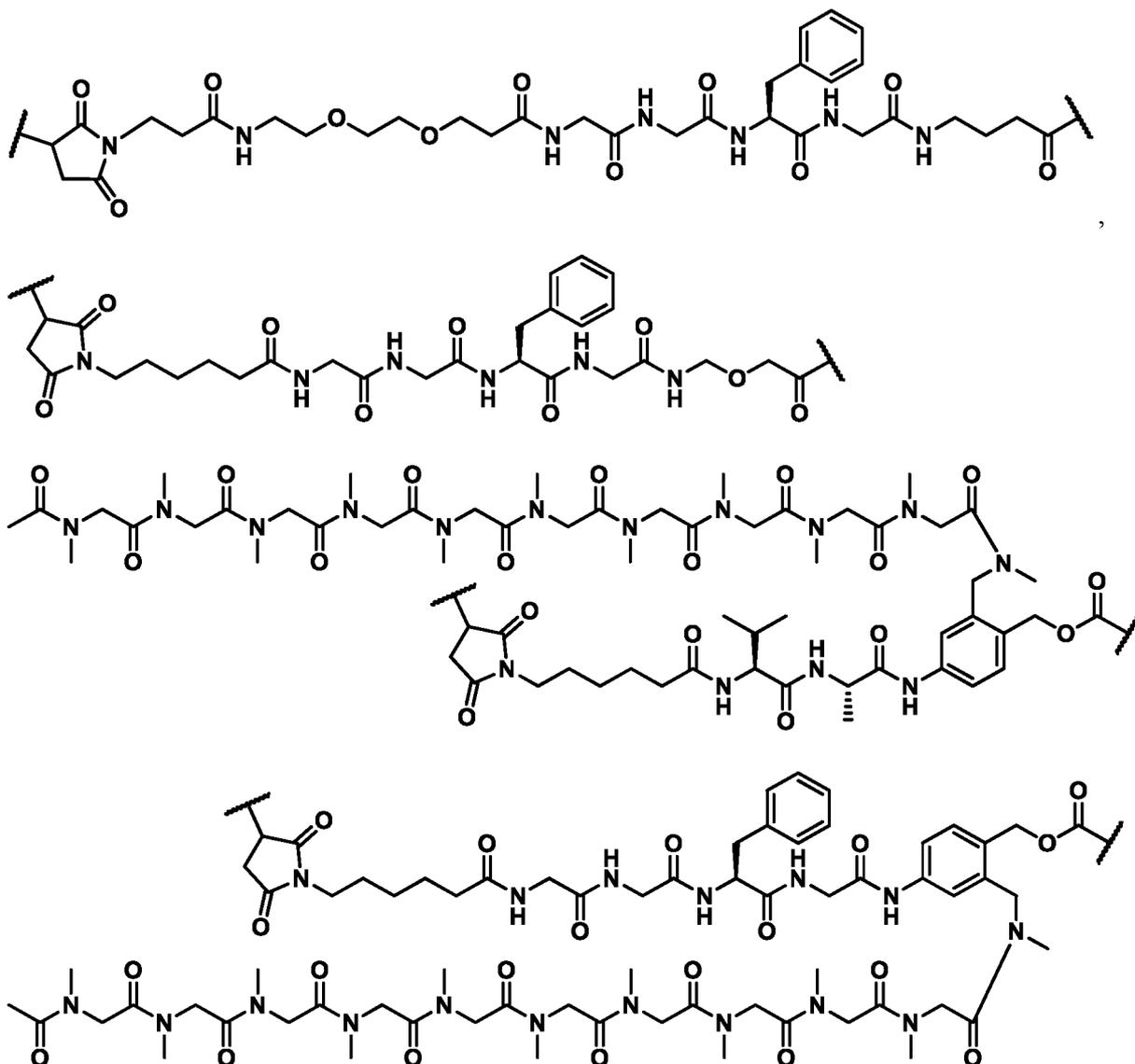
[000374] **Вариант реализации 60:** Иммуноконъюгат или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–59, где L выбран из следующей структуры:



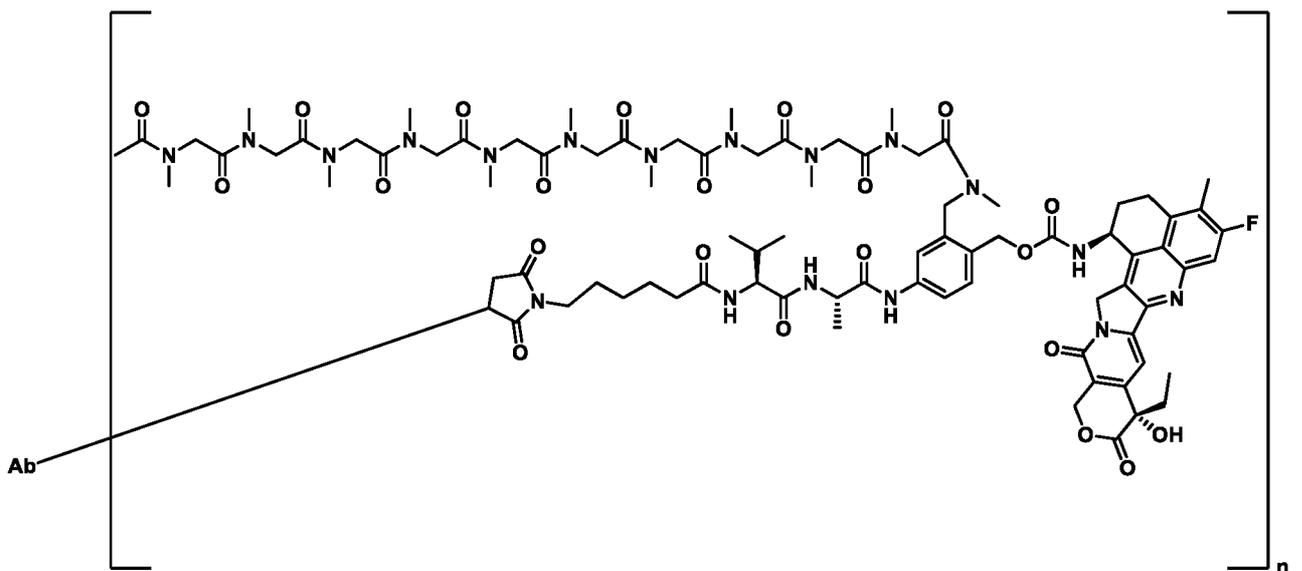
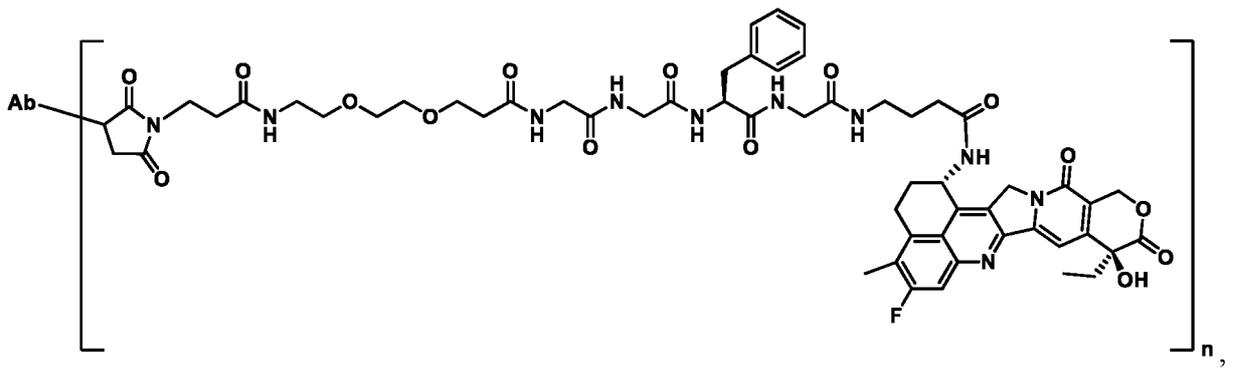
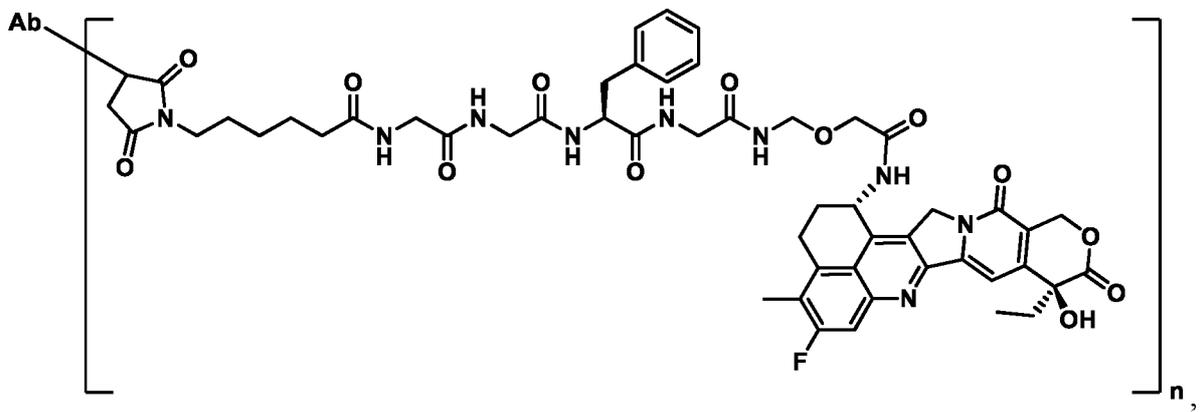
где n^5 обозначает целое число от 0 до 20.

[000375] **Вариант реализации 61:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват согласно варианту реализации 60, где n^5 обозначает целое число от 8 до 15.

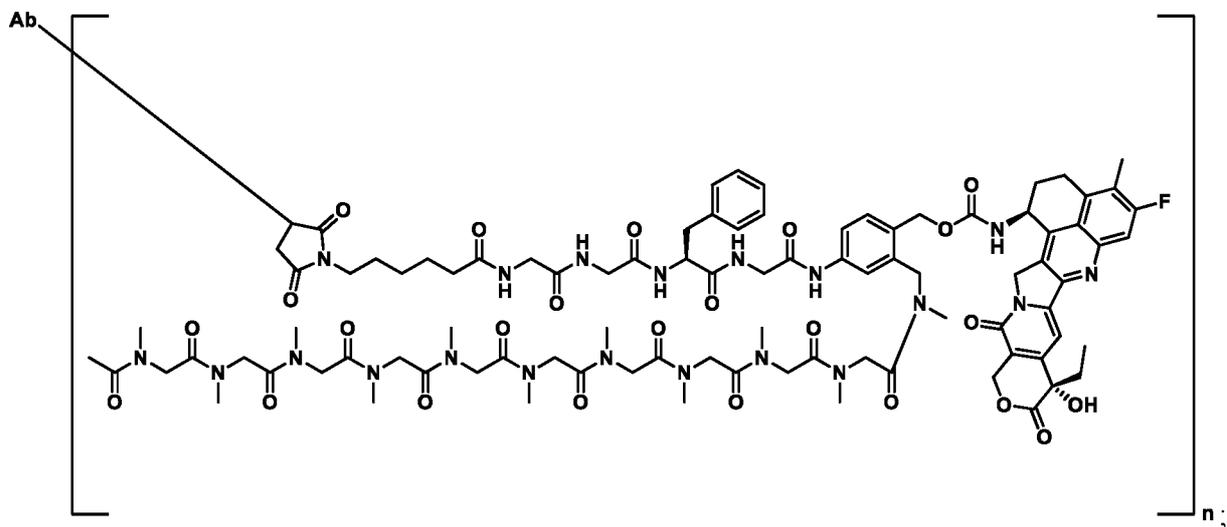
[000376] **Вариант реализации 62:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–61, где L выбран из следующей структуры:



[000377] **Вариант реализации 63:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из вариантов реализации 42–62, где конъюгат антитело – лекарственное средство выбран из следующей структуры:



И



где n представляет собой любое число от 1 до 10.

[000378] **Вариант реализации 64:** Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по варианту реализации 63, где n представляет собой любое число от 2 до 8.

[000379] **Вариант реализации 65:** Способ получения иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из вариантов реализации 1–64, включающий этап взаимодействия антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из вариантов реализации 1–32 с промежуточным соединением лекарственное средство – линкер.

[000380] **Вариант реализации 66:** Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват по любому из вариантов реализации 1–64.

[000381] **Вариант реализации 67:** Фармацевтическая композиция по варианту реализации 66, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[000382] **Вариант реализации 68:** Применение иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из вариантов реализации 1–64, или фармацевтической композиции по любому из вариантов реализации 66–67 для получения медикамента для лечения опухолей.

[000383] **Вариант реализации 69:** Применение по варианту реализации 68, где указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CDH6.

[000384] **Вариант реализации 70:** Применение по любому из вариантов реализации 68–69, где указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

[000385] **Вариант реализации 71:** Способ лечения опухоли, включающий введение субъекту иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из вариантов реализации 1–64.

[000386] **Вариант реализации 72:** Способ по варианту реализации 71, где указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CDH6.

[000387] **Вариант реализации 73:** Способ по любому из вариантов реализации 71–72, где указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

[000388] **Вариант реализации 74:** Способ лечения опухоли, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один компонент, выбранный из иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из вариантов реализации 1–64, и по меньшей мере одного противоопухолевого лекарственного средства, одновременно, отдельно или последовательно.

Примеры

[000389] Следующие примеры приведены для того чтобы предоставить специалистам в данной области техники полное раскрытие и описание реализации и применения настоящего изобретения, и не предназначены для ограничения объема заявленного авторами изобретения; они также не подразумевают, что представленные ниже эксперименты представляют собой все или единственные выполненные эксперименты. Были предприняты усилия для обеспечения точности в отношении используемых значений (например, количеств, температуры и т. д.), но следует учитывать возможность определенных

экспериментальных ошибок и отклонений. Если не указано иное, части представляют собой массовые части, молекулярная масса представляет собой среднюю молекулярную массу, температура представлена в градусах Цельсия, а давление находится на уровне или приблизительно на уровне атмосферного. Могут использоваться стандартные сокращения, например, п.о.: пара(ы) оснований; Кб: тысяча пар оснований (килобаза); пл: пиколитр(ы); с или сек.: секунда(ы); мин: минута(ы); ч: час(ы); АК: аминокислота(ы); нт: нуклеотид(ы); в/м, внутримышечный (внутримышечно); в/б: внутрибрюшинный (внутрибрюшинно); п/к: подкожный (подкожно); и т.п.

Пример 1. Получение линкера – рабочего вещества

[000390] 1.1 Получение соединения LP-1

[000391] Этап 1: Синтез промежуточного продукта 11-1

[000392] К раствору соединения 11-1А (Mc-Val-Ala-OH, приобретенного у MedChemExpress Shanghai, 2,4 г, 6,29 ммоль) и 11-1В (3,18 г, 6,29 ммоль) в смеси DCM:MeOH (v:v=2:1, 90 мл) добавляли EEDQ (1,86 г, 7,55 ммоль) при комнатной температуре. Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 24 часов, растворитель удаляли под вакуумом, неочищенный остаток дополнительно очищали с помощью флэш-хроматографии с получением соединения 11-1 (3,9 г, 71%). ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 868,49 (M+H).

[000393] Этап 2: Синтез промежуточного продукта 11-2

[000394] Соединение 11-1 (2 г, 2,3 ммоль) растворяли в безводном ТГФ (50 мл), добавляли фтороводород-пиридин (4,6 г, 46 ммоль) в атмосфере аргона при 0°C, а затем реакционную смесь перемешивали при 0°C в течение 2 часов. Реакцию останавливали путем добавления воды, экстрагировали ДХМ, высушивали органическую фазу и концентрировали. Остаток очищали с помощью хроматографии на силикагеле с получением соединения 11-2 (1,1 г, 76%). ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 630,31 (M+H).

[000395] Этап 3: Синтез промежуточного продукта 11-3

[000396] Соединение 11-2 (700 мг, 1,11 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (4 мл), ДИПЭА (0,39 мл, 2,23 ммоль) и добавляли 4,4'-динитродифенилкарбонат (406 мг, 1,33 ммоль) в атмосфере аргона при комнатной температуре, а затем реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи. Растворитель удаляли путем концентрирования, продукт осаждали из МТБЭ, желтое твердое вещество собирали с помощью фильтрации,

промывали диэтиловым эфиром и высушивали с получением соединения 11-3, используемого непосредственно на следующем этапе. ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 795,41 (M+H).

[000397] Этап 4: Синтез промежуточного продукта 11-4

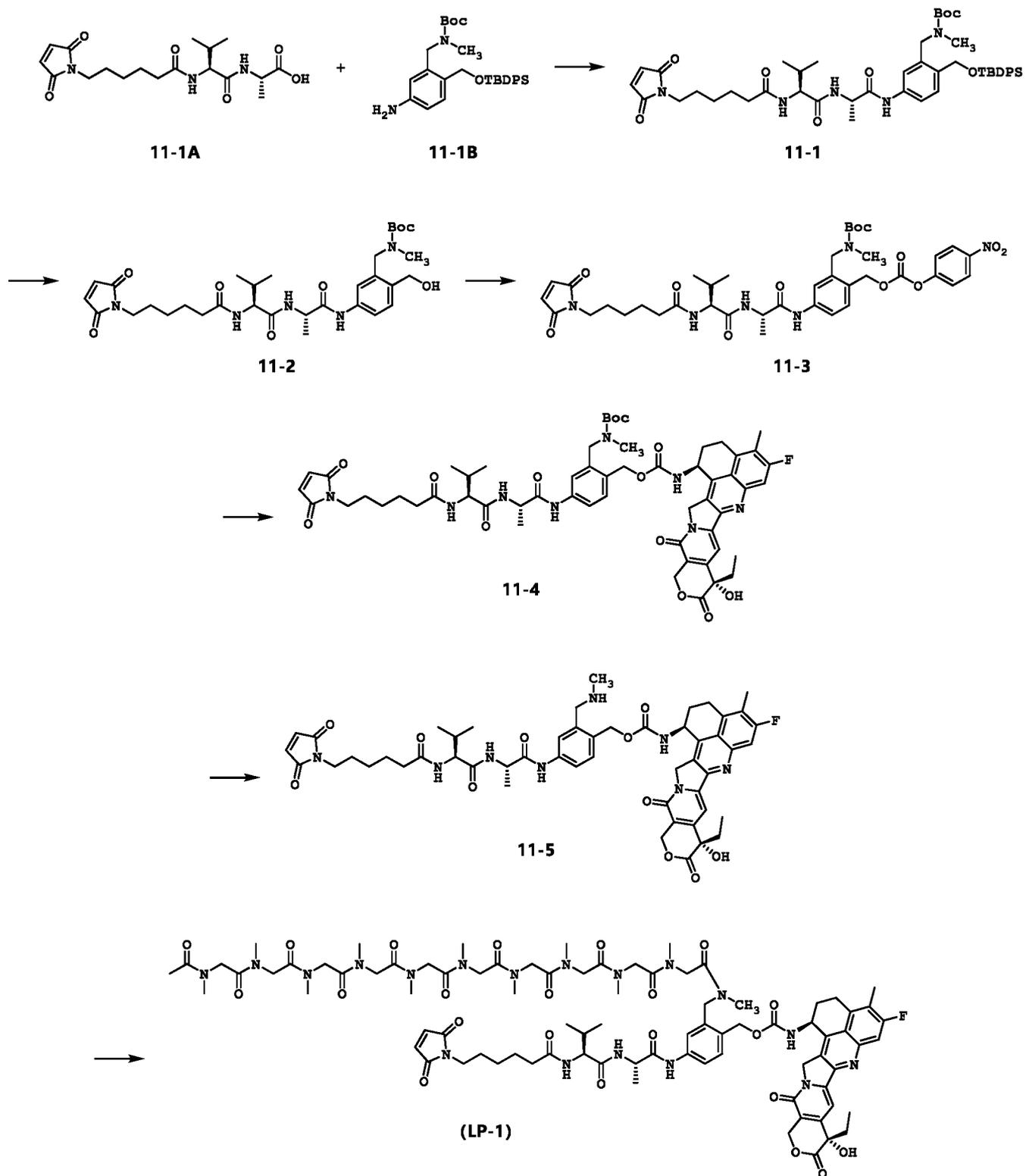
[000398] Соединение 11-3 (300 мг, 0,44 ммоль) растворяли в безводном ДМФА (4 мл), добавляли высушенный пиридин (1 мл), а затем экзатекана мезилат (приобретен у MedChemExpress Shanghai, 234 мг, 0,44 ммоль) и НОВt (60 мг, 0,44 ммоль). Реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в атмосфере аргона в течение ночи. Продукт очищали с помощью пре-ВЭЖХ с получением промежуточного соединения 11-4 (230 мг, 48%). ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 1091,53 (M+H).

[000399] Этап 5: Синтез промежуточного продукта 11-5

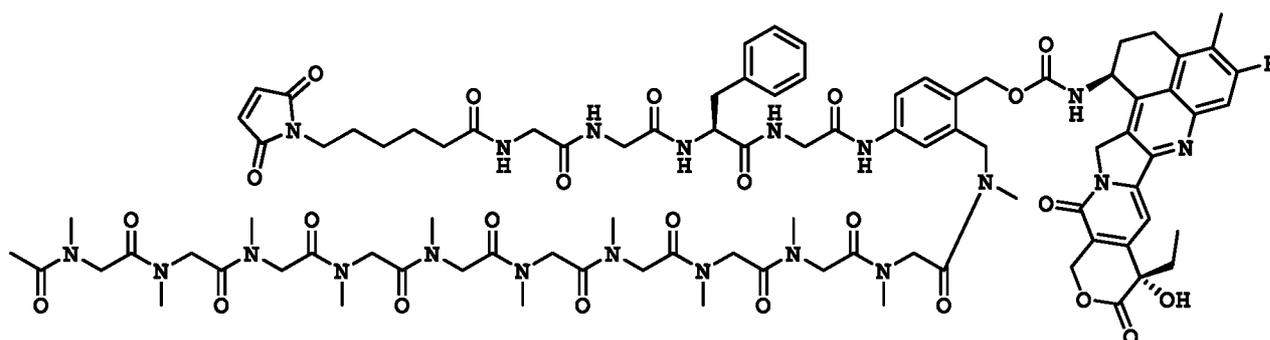
[000400] Соединение 11-4 (200 мг, 0,183 ммоль) растворяли в 1 мл безводного ДХМ, добавляли 300 мкл ТФУ при 0°C, реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение 30 мин, растворитель удаляли концентрированием с получением промежуточного соединения 11-5 в виде соли ТФУ, которую использовали на следующей стадии без дополнительного очищения. ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 991,47 (M+H).

[000401] Этап 6: Синтез соединения LP-1

[000402] Соединение 11-5 (120 мг, 0,109 ммоль) растворяли в 1 мл безводного ДМФА, добавляли Ac-Sar10-COOH (84 мг, 0,109 ммоль), затем НАТУ (50 мг, 0,130 ммоль) и DIPEA (38 мкл, 0,22 ммоль), реакционную смесь перемешивали при комнатной температуре в течение ночи, растворитель удаляли концентрированием, неочищенный продукт очищали с помощью предварительной ВЭЖХ с получением соединения LP-1 (74 мг, 38%). ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 1743,85 (M+H).



[000403] 1.2 Получение соединения LP-2



LP-2

[000404] Синтез соединения LP-2 осуществляют в соответствии с методикой для соединения LP-1, исходный материал 11-1A заменяют на Mc-GGFG-OH (приобретенный у MedChemExpress Shanghai), соединение LP-2 получают в виде бежевого аморфного твердого вещества. ЖХ-МС (ИЭР, m/z): 1891,90 (M+H).

Пример 2. Получение и скрининг гуманизированного антитела к CDH6

[000405] Антитело мыши против CDH6 CL069707 гуманизировали путем прививки CDR (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989). Области CDR CL069707 прививали на наиболее сходную последовательность зародышевой линии человека. Некоторые из ключевых остатков, которые имеют важное значение, возвращали путем обратной мутации на основании, например, критериев, приведенных в источнике: Queen et al. (Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 10029-10033(1989)).

[000406] Два гуманизированных варианта тяжелой цепи были названы CL069707-H1, CL069707-H2. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи CL069707-H1 представлена в SEQ ID NO: 74. Аминокислотная последовательность тяжелой цепи CL069707-H2 представлена в SEQ ID NO: 75. Два гуманизированных варианта легкой цепи были названы CL069707-L1, CL069707-L2. Аминокислотная последовательность легкой цепи CL069707-L1 представлена в SEQ ID NO: 76. Аминокислотная последовательность легкой цепи CL069707-L2 представлена в SEQ ID NO: 77.

[000407] Последовательность ДНК, кодирующую полноразмерные аминокислотные последовательности CL069707-H1, CL069707-H2, CL069707-L1, CL069707-L2, синтезировали и встраивали в экспрессионный вектор pCDNA3.1. Антитела CL069707-H1L1, CL069707-H1L2, CL069707-H2L1 и CL069707-H2L2 продуцировали в клетке 293 путем комбинирования тяжелой цепи и легкой цепи.

[000408] EC50 для связывания гуманизированных антител с опухолевыми клетками исследовали следующим образом. Культуру клеток линии рака яичников человека OVCAR-3 (приобретенную у Национальной коллекции аутентифицированных клеточных культур) поддерживали *in vitro* в виде независимых монослойных культур при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки собирали с использованием частичного расщепления трипсином-EDTA с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Клетку

ресуспендировали в холодном ФСБ и добавляли серийные разведения антител Ch069707 и CL069707-H1L1, CL069707-H1L2, CL069707-H2L1 и CL069707-H2L2. Антитело Ch069707 представляло собой химерное антитело. Вариабельные области были такими же, как и в CL069707, а константная область была такой же, как константные области IgG1 человека (SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71). Растворы клеток смешивали, инкубировали при 4°C и промывали холодным ФСБ перед добавлением вторичных конъюгатов антител (для целей детекции). После инкубации при 4°C клетки промывали ФСБ, а затем подвергали проточно-цитометрическому анализу (FACS). На фиг. 1А показано, что CL069707-H1L1, CL069707-H1L2, CL069707-H2L1 и CL069707-H2L2 имели аналогичную EC50 для клеток OVCAR-3. На фиг. 1В показано, что CL069707-H1L1 имел несколько более низкую EC50, чем Ch069707, для клетки OVCAR-3.

[000409] Антитело мыши против CDH6 CL069463 гуманизировали с помощью того же способа. Результаты представлены на фиг. 2. CL069463-H1L1, CL069463-H2L2, CL069463-H2L3 имели такую же EC50, как и Ch069463 на клетке OVCAR-3. Антитело Ch069463 представляло собой химерное антитело. Вариабельные области были такими же, как и в CL069463, а константная область была такой же, как константные области IgG1 человека (SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71).

Пример 3. Оценка *in vitro* гуманизованного CL069707-H1L1

[000410] 3.1 Анализ связывания CL069707-H1L1 на CDH6, CDH9 и CDH10 человека

[000411] CDH9 и CDH10 являются наиболее близко связанными членами семейства с CDH6. Связывание CL069707-H1L1 с внеклеточными доменами (ВКД) CDH6, CDH9 и CDH10 человека анализировали с помощью анализа связывания методом ИФА ELISA. Антигены CDH6-EC6D-His, CDH9-ECD-His и CDH10-ECD-His человека были получены от Acro Biosystems, Inc. 100 мкл антигенов в концентрации 1 мкг/мл, разведенных в ФСБ, добавляли в 96-луночные планшеты и инкубировали при 4°C в течение ночи. Планшеты 3 раза промывали 300 мкл промывочного буфера. Затем в планшеты добавляли по 100 мкл/лунку 1% блокирующего реагента БСА и инкубировали при 37°C в течение 1 часа, после чего блокирующий реагент утилизировали. В планшеты добавляли CL069707-H1L1 в 3-кратном серийном разведении, и затем инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Затем планшеты 3 раза промывали 300 мкл промывочного буфера. В планшеты добавляли по 100

мкл/лунку HRP-конъюгированного антитела против человека, разбавленного в 1% БСА, и затем инкубировали при 37°C в течение 1 часа. Планшеты 3 раза промывали 300 мкл промывочного буфера. В планшеты добавляли по 100 мкл/лунку субстрата ТМВ и инкубировали в течение приблизительно 10 минут при комнатной температуре. Затем реакцию останавливали добавлением 100 мкл/лунку стоп-раствора. Считывали OD450 с помощью считывающего устройства для планшетов и обрабатывали данные. Результаты представлены на фиг. 3. CL069707-H1L1 связывается с CDH6-ECD-His человека с EC50 0,1 нМ, CL069707-H1L1 не связывается с белком CDH9-ECD-His или CDH10-ECD-His.

[000412] 3.2 Оценка EC50 CL069707-H1L1 в анализе связывания ИФА ELISA с применением антигена CDH6 человека, яванского макака, мыши и крысы

[000413] Связывание CL069707-H1L1 на антигене CDH6 человека, яванского макака, мыши или крысы анализировали с помощью ИФА ELISA. Антигены CDH6-ECD-His человека, яванского макака, мыши и крысы получали от Acro Biosystems, Inc. ИФА ELISA проводили с использованием тех же способов, что и в примере 3.1. Результаты представлены на фиг. 4. CL069707-H1L1 связывается с антигенами CDH6-ECD-His человека, яванского макака, мыши и крысы с аналогичной EC50.

[000414] 3.3 Оценка констант связывания CL069707-H1L1 и Ch069707 с применением антигена CDH6 человека и яванского макака

[000415] Аффинность связывания CL069707-H1L1 и Ch069707 измеряли с использованием системы Octet® на основе метода биослойной интерферометрии (BLI). Антитела загружали на АНС (Anti-hIgG Fc Capture) в концентрации 100 нМ. Затем 3,13 нМ, 6,25 нМ, 12,5 нМ, 25 нМ, 50 нМ и 100 нМ антигенов CDH6-ECD-His человека или CDH6-ECD-His яванского макака инкубировали с наконечником биосенсора, конъюгированного с антителом, для измерения связывания между антигеном и антителом. На основании шести различных кривых связывания, полученных для каждой концентрации антигена, вычисляли константы связывания (KD), используя модель связывания 1:1. Результаты представлены в Таблице 2. CL069707-H1L1 и Ch069707 связываются с антигеном CDH6-ECD-His человека с аналогичной аффинностью. CL069707-H1L1 связывается с антигенами CDH6-ECD-His человека и CDH6-ECD-His яванского макака с аналогичной аффинностью.

[000416] Таблица 2.

Антитело	Антиген	KD(M)
Ch069707	CDH6-ECD-His яванского макака	2,19E-09
Ch069707	CDH6-ECD-His человека	2,28E-9
CL069707-H1L1	CDH6-ECD-His яванского макака	2,69E-9
CL069707-H1L1	CDH6-ECD-His человека	3,08E-9

Пример 4. Получение конъюгата антитело – лекарственное средство

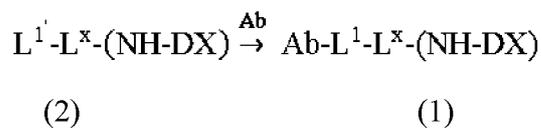
[000417] Общий способ получения конъюгата антитело – лекарственное средство

[000418] Антитело, которое можно применять в конъюгате антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению, конкретно не ограничено, если оно представляет собой антитело к CDH6, обладающее активностью интернализации, или функциональный фрагмент указанного антитела.

[000419] Далее будет описан типичный способ получения конъюгата антитело – лекарственное средство согласно настоящему изобретению. Отметим, что в приведенном ниже описании «№ соединения», указанный на каждой схеме реакции, используется для обозначения соединения. В частности, каждое соединение называют «соединением формулы (1)», «соединением (1)» или т.п. Это относится и к соединениям под другими номерами.

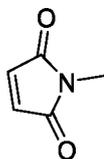
[000420] Конъюгат антитело – лекарственное средство, представленный формулой (1), приведенной ниже, в которой антитело к CDH6 соединено с линкерной структурой через тиоэфир, может быть получен путем проведения реакции антитела, имеющего сульфгидрильную группу, полученную при преобразовании дисульфидной связи путем восстановления антитела к CDH6, с соединением (2). Этот конъюгат антитело – лекарственное средство может быть получен, например, следующим способом.

[Выражение 1]



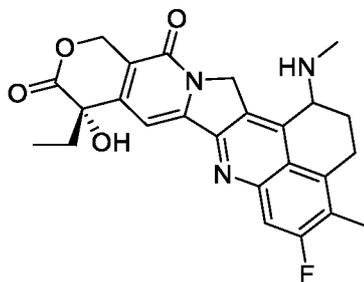
[000421] Где Ab представляет собой антитело с сульфгидрильной группой, где L¹ имеет структуру, представленную -(сукцинимид-3-ил-N)-, и L^{1'} представляет собой малеимидильную группу, представленную следующей формулой.

[Формула 1]



[000422] При этом (NH-DX) имеет структуру, представленную следующей формулой.

[Формула 2]



[000423] -L¹-L^x- имеет структуру, представленную любой из следующих формул:

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-PABC-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
 GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-
 GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-
 PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-
 CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-
 C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;
 -(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-
 NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

- (сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-; и

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-.

[000424] В вышеописанной схеме реакции конъюгат антитело – лекарственное средство (1) можно понимать как имеющий структуру, в которой один структурный фрагмент лекарственного средства у конца линкера соединен с одним антителом. Однако это описание приведено для удобства, и на самом деле существует множество случаев, когда совокупность вышеупомянутых структурных фрагментов связано с одной молекулой антитела. Это справедливо и для объяснения способа получения ниже.

[000425] Антитело, содержащее сульфгидрильную группу, может быть получено способом, хорошо известным специалисту в данной области техники (Hermanson, G. T, Bioconjugate Techniques, pp. 56-136, pp. 456-493, Academic Press (1996)). Примеры способа могут включать, не ограничиваясь перечисленными: проведение реакции реагента Трота с аминогруппой антитела; проведение реакции N-сукцинимидил-S-ацетилтиоалканоатов с аминогруппой антитела с последующей реакцией с гидроксиламином; проведение реакции N-сукцинимидил-3- (пиридилдитио)пропионата с антителом с последующей реакцией с восстанавливающим агентом; проведение реакции антитела с восстанавливающим агентом, таким как дитиотреитол, 2-меркаптоэтанол или гидрохлорид трис(2-карбоксиэтил)фосфина (ТСЕР), с восстановлением межцепочечной дисульфидной связи в антителе, так что образуется сульфгидрильная группа.

[000426] В частности, антитело с частично или полностью восстановленными межцепочечными дисульфидными связями может быть получено при использовании от 0,3 до 3 молярных эквивалентов ТСЕР в качестве восстановителя на каждую межцепочечную дисульфидную связь в антителе и проведении реакции восстановителя с антителом в буферном растворе, содержащем хелатирующий агент. Примеры хелатирующего агента

могут включать этилендиаминтетрауксусную кислоту (EDTA) и диэтилентриаминпентауксусную кислоту (DTPA). Хелатирующий агент может быть использован в концентрации от 1 мМ до 20 мМ. В качестве буферного раствора можно использовать раствор фосфата натрия, бората натрия, ацетата натрия или т.п.

[000427] Отметим, что за счет проведения реакции присоединения сульфгидрильной группы к фрагменту лекарственное средство – линкер указанный фрагмент лекарственное средство – линкер может быть конъюгирован посредством тиоэфирной связи.

[000428] Затем, используя от 2 до 20 молярных эквивалентов соединения (2) на антитело, имеющее сульфгидрильную группу, можно получить конъюгат антитело – лекарственное средство (1), где с каждым антителом конъюгировано от 2 до 8 молекул лекарственного средства. В частности, раствор, содержащий растворенное в нем соединение (2), может быть добавлен к буферному раствору, содержащему антитело, имеющее сульфгидрильную группу, для проведения реакции. В этом контексте в качестве буферного раствора можно использовать раствор ацетата натрия, фосфат натрия, борат натрия или т.п. Значение pH для реакции составляет от 5 до 9; более предпочтительно проведение реакции приблизительно при pH 7. Органический растворитель, такой как диметилсульфоксид (DMSO), диметилформамид (DMF), диметилацетамид (DMA) или N-метил-2-пирролидон (NMP), может быть использован в качестве растворителя для растворения соединения (2). Реакцию можно провести путем добавления раствора, содержащего соединение (2), растворенное в органическом растворителе в концентрации 1-20% об./об., к буферному раствору, содержащему антитело, имеющее сульфгидрильную группу. Температура реакции составляет от 0 до 37° С, более предпочтительно от 10 до 25° С, а время реакции составляет от 0,5 до 2 часов. Реакцию можно остановить деактивацией реакционной способности непрореагировавшего соединения (2) тиолсодержащим реагентом. Тиолсодержащий реагент представляет собой, например, цистеин или N-ацетил-L-цистеин (NAC). Более конкретно, реакцию можно остановить путем добавления от 1 до 2 молярных эквивалентов NAC к используемому соединению (2) и инкубирования полученной смеси при комнатной температуре в течение 10–30 минут.

[000429] Идентификация конъюгата антитело – лекарственное средство

[000430] Полученный конъюгат антитело – лекарственное средство (1) может быть подвергнут концентрации, замене буфера, очищению и измерению концентрации антитела и среднего количества конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в соответствии с общими методиками, описанными ниже, для идентификации конъюгата антитело – лекарственное средство (1).

[000431] Общая методика А: Концентрирование водного раствора антитела или конъюгата антитело – лекарственное средство

[000432] В контейнер Amicon Ultra (50 000 MWCO, Millipore Corporation) добавляли раствор антитела или конъюгата антитело – лекарственное средство и концентрировали раствор антитела или конъюгата антитело – лекарственное средство центрифугированием (центрифугирование при 2000–3800 G в течение 5–20 минут).

[000433] Общая методика В: Измерение концентрации антител

[000434] С использованием устройства для считывания микропланшетов (Multiskan GO, Thermo Fisher Scientific Inc.) проводили измерение поглощения антителами в соответствии со способом, определенным производителем. Поэтому использовали коэффициент поглощения 280 нм, отличающийся для разных антител (от $1,3 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ до $1,8 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$).

[000435] Общая методика С: Замена буфера для антитела

[000436] Спин-колонки для обессоливания Zeba™ (5 мл, 40 000 MWCO, Thermo Scientific™) уравнивали фосфатным буфером (50 мМ, рН 7,0) (в настоящем описании называемым PBS7.0/EDTA), содержащим хлорид натрия (50 мМ) и EDTA (2 мМ), в соответствии со способом, определенным производителем. Водный раствор антитела в количестве 2 мл вносили в колонку Zeba™ (5 мл), а затем собирали фракцию (около 2 мл) путем центрифугирования колонки для обессоливания (центрифугирование при 1000 G в течение 4 минут). Эта фракция может быть сконцентрирована с помощью общей процедуры А. После измерения концентрации антитела с применением общей методики В концентрацию антитела довели до более чем 10 мг/мл, используя PBS7.0/EDTA.

[000437] Общая методика D: Очищение конъюгата антитело – лекарственное средство

[000438] Спин-колонки для обессоливания Zeba™ (5 мл, 40 000 MWCO, Thermo Scientific™) уравнивали любым доступным буферным раствором для приготовления

лекарственных форм, таким как гистидин-ацетатный буфер (20 мМ гистидин, рН 5,5), содержащий хлорид натрия (150 мМ), или фосфатный буфер (50 мМ, рН 7,0), содержащий хлорид натрия (50 мМ). Водный реакционный раствор конъюгата антитело – лекарственное средство (приблизительно 2 мл) наносили на колонку Zeba™ (5 мл), после чего собирали фракцию антитела (приблизительно 2 мл) путем центрифугирования колонки для обессоливания (центрифугирование при 1000 G в течение 4 минут). Процесс очищения гель-фильтрацией, в ходе которого собранную фракцию повторно наносили на колонку для обессоливания Zeba™ и проводили элюирование с центрифугированием, повторяли в общей сложности 2 раза для получения конъюгата антитело – лекарственное средство с исключением неконъюгированного линкера – рабочего вещества и низкомолекулярных соединений (гидрохлорида трис(2-карбоксиветил)фосфина (ТСЕР), N-ацетил-L-цистеина (NAC) и диметилсульфоксида).

[000439] Общая методика E: Измерение концентрации антител в конъюгате антитело – лекарственное средство и среднего количества молекул конъюгированного лекарственного средства на молекулу антитела

[000440] Концентрацию конъюгированного лекарственного средства в конъюгате антитело – лекарственное средство можно рассчитать путем измерения УФ-поглощения в водном растворе конъюгата антитело – лекарственное средство при двух длинах волн 280 нм и 370 нм, с последующим проведением расчета, представленного ниже.

[000441] Общее поглощение при любой заданной длине волны равно сумме поглощения всех поглощающих свет химических веществ, присутствующих в системе [аддитивность поглощения]. Следовательно, исходя из гипотезы о том, что молярные коэффициенты поглощения антитела и лекарственного средства не варьируют до и после конъюгации между антителом и лекарственным средством, концентрацию антитела и концентрацию лекарственного средства в конъюгате антитело – лекарственное средство отражают следующие уравнения.

$$[000442] A_{280} = A_{D,280} + A_{A,280} = \epsilon_{D,280}C_D + \epsilon_{A,280}C_A \quad \text{Уравнение (1)}$$

$$[000443] A_{370} = A_{D,370} + A_{A,370} = \epsilon_{D,370}C_D + \epsilon_{A,370}C_A \quad \text{Уравнение (2)}$$

[000444] В этом контексте A_{280} представляет собой поглощение в водном растворе конъюгата антитело – лекарственное средство при 280 нм, A_{370} представляет собой

поглощение в водном растворе конъюгата антитело – лекарственное средство при 370 нм, $A_{A,280}$ представляет собой поглощение антителом при 280 нм, $A_{A,370}$ представляет собой поглощение антителом при 370 нм, $A_{D,280}$ представляет собой поглощение предшественником конъюгата при 280 нм, $A_{D,370}$ представляет собой поглощение предшественником конъюгата при 370 нм, $\varepsilon_{A,280}$ представляет собой молярный коэффициент поглощения антителом при 280 нм, $\varepsilon_{A,370}$ представляет собой молярный коэффициент поглощения антителом при 370 нм, $\varepsilon_{D,280}$ представляет собой молярный коэффициент поглощения предшественником конъюгата при 280 нм, $\varepsilon_{D,370}$ представляет собой молярный коэффициент поглощения предшественником конъюгата при 370 нм, C_A представляет собой концентрацию антитела в конъюгате антитело – лекарственное средство, и C_D представляет собой концентрацию лекарственного средства в конъюгате антитело – лекарственное средство.

[000445] В этом контексте для $\varepsilon_{A,280}$, $\varepsilon_{A,370}$, $\varepsilon_{D,280}$ и $\varepsilon_{D,370}$ используют предварительно заданные значения (расчетные значения, основанные на вычисленных или измеренных значениях, полученных при измерениях УФ для соединения). Например, $\varepsilon_{A,280}$ можно рассчитать на основании аминокислотной последовательности антитела с помощью известного метода вычисления (Protein Science, 1995, vol. 4, 2411-2423). $\varepsilon_{A,370}$ обычно равно нулю. $\varepsilon_{D,280}$ и $\varepsilon_{D,370}$ могут быть получены в соответствии с законом Ламберта-Бера (Молярная концентрация для поглощения \times Молярный коэффициент поглощения \times Длина пути в ячейке) путем измерения поглощения в растворе, в котором растворен используемый предшественник конъюгата в определенной молярной концентрации. C_A и C_D могут быть определены путем измерения A_{280} и A_{370} для водного раствора конъюгата антитело – лекарственное средство, с последующим решением системы уравнений (1) и (2) путем подстановки этих значений. Далее, путем деления C_D на C_A можно определить среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства на антитело.

[000446] Общая методика F: Измерение среднего числа конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела-(2)

[000447] Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в конъюгате антитело – лекарственное средство также может быть определено с помощью анализа на жидкостном хроматографе – масс-спектрометре (ЖХ-МС)

с использованием описанного далее способа в дополнение к вышеупомянутой «общей процедуре Е». Ниже будет описан способ измерения среднего числа конъюгированных молекул лекарственного средства с помощью ЖХ-МС, в тех случаях, когда антитело конъюгировано с линкером – рабочим веществом за счет дисульфидной связи. Специалист в данной области техники способен подходящим образом измерить среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства с помощью ЖХ-МС в зависимости от способа соединения между антителом и линкером – рабочим веществом, обратившись к описанному способу.

[000448] Получение образца для ЖХ-МС анализа (восстановление конъюгата антитело – лекарственное средство)

[000449] Раствор конъюгата антитело – лекарственное средство (приблизительно 5 мг/мл, 6 мкл) смешивают с водным раствором дитиотреитола (ДТТ) (100 мМ, 3 мкл) и 21 мкл воды. Путем инкубации смеси при 37° С в течение 30 минут расщепляют дисульфидную связь между легкой цепью и тяжелой цепью конъюгата антитело – лекарственное средство. Полученный образец используют в ЖХ-МС анализе.

[000450] Параметры ВЭЖХ

Колонка: Agilent PLRP-S, 1000 Å, 50 × 2,1 мм, 8 мкм.

Длина волны детекции: 280 нм

Ширина полосы: 4 нм

Температура термостата колонки: 80 °С

Термостат автоматического пробоотборника: 5 °С

Скорость потока: 0,5 мл/мин

Объем вводимой пробы: 5 мкл

Подвижная фаза А: 0,05% ТФУ, Н₂О

Подвижная фаза В: 0,05% ТФУ, АЦН

Градиентная программа (В %): 25% – 34% (0 мин – 0,7 мин), 34% – 45% (0,7 мин – 5 мин), 45%-90% (5 мин – 6 мин), 90% (6 мин – 7 мин), 90% – 25% (7 мин – 7,10 мин), 25% (7,10 мин – 10 мин)

Параметры МС

Температура газа: 350 °С

Осушающий газ: 13 л/мин

Распылитель: 45 фунтов на кв. дюйм изб.

Напряжение на капилляре: 5000 В

Фрагментор: 350 В

Диапазон масс: 500–8000 m/z

Скорость захвата: 1 спектр/с

[000451] Анализ данных

[000452] С помощью ИЭР-сканирования может быть обнаружена легкая цепь, связанная с молекулой (молекулами) лекарственного средства (легкая цепь, связанная с (i) молекул лекарственного средства: Li), и тяжелая цепь, связанная с молекулой (молекулами) лекарственного средства (тяжелая цепь, связанная с (i) молекул лекарственного средства: Ni).

[000453] Отношение площадей пиков (%) каждой цепи рассчитывают для получения общей суммы скорректированных значений площадей пиков в соответствии со следующим выражением.

[000454] Отношение площадей пиков легкой цепи, связанной с

$$i \text{ молекул лекарственного средства} = 100\% \times A_{Li}/(A_{L0} + A_{L1})$$

[000455] Отношение площадей пиков тяжелой цепи, связанной с

$$i \text{ молекул лекарственного средства} = 100\% \times A_{Ni}/(A_{N0} + A_{N1} + A_{N2} + A_{N3})$$

[000456] Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства на молекулу антитела в конъюгате антитело – лекарственное средство рассчитывали в соответствии со следующим выражением.

[000457] Среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства = (отношение площадей пиков L0×0 + отношение площадей пиков L1×1 + отношение площадей пиков N0×0 + отношение площадей пиков N1×1 + отношение площадей пиков N2×2 + отношение площадей пиков N3×3) × 2

[000458] Общая методика G: Измерение агрегации антител в конъюгате антитело – лекарственное средство

[000459] Агрегацию в конъюгате антитело – лекарственное средство можно определить с помощью эксклюзионной хроматографии (ЭХ) в анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ), используя следующий способ.

Система ВЭЖХ: система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Inc.)

Детектор: Спектрометр для абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом диапазоне (длина волны измерения: 280 нм)

Колонка для ЭХ: TOSOH TSKgel G3000SWXL (7,8×300 мм, 5 мкм)

Подвижная фаза: 200 ммоль/л KHPO_4 , 150 ммоль/л NaCl , 15% (об./об.) изопропанол, pH 7,0

Скорость потока: 0,75 мл/мин

Работа в изократическом режиме: 18 мин

Температура колонки: комнатная температура

Введение пробы: 50 мкг

[000460] Анализ данных

[000461] ЭХ-хроматограмма контроля качества (QC, CL069707-H1L1) приведена на фиг. 5А; подтверждено, что молекулярная масса основного продукта QC составляет около 150 кДа, а время удерживания мономера составляет около 9,5–10,5 мин. При этом время удерживания агрегатов меньше, чем для мономера.

[000462] Общая методика Н: Сравнение гидрофильности антител в конъюгате антитело – лекарственное средство

[000463] Гидрофильность конъюгата антитело – лекарственное средство может быть определена с помощью хроматографии гидрофобных взаимодействий (НИС) в анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с использованием следующего способа.

Система ВЭЖХ: система ВЭЖХ Agilent 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Inc.)

Детектор: Спектрометр для абсорбционной спектроскопии в ультрафиолетовом диапазоне (длина волны измерения: 280 нм)

ГХ-колонка: TOSOH TSKgel Butyl-NPR (внутренний диаметр 4,6 мм × 3,5 см, 2,5 мкм)

Подвижная фаза А: 1,5 моль/л $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 50 ммоль/л KHPO_4 , pH 7,0

Подвижная фаза В: 50 ммоль/л KHPO_4 , 25% (об./об.) изопропанола, pH 7,0

Работа в изократическом режиме: 25 мин

Температура колонки: комнатная температура

Градиентная программа (В %): 0% – 25% (0 мин – 1 мин), 25% (1 мин – 3 мин), 25% – 80% (3 мин – 13 мин), 80% (13 мин – 17 мин), 80% – 0% (17 мин – 17,10 мин), 0% (17,10 мин – 25 мин)

Введение пробы: 10 мкл

[000464] Анализ данных: ГХ-хроматограмма контроля качества (QC, CL069707-H1L1) показана на фиг. 5В. По сравнению с неконъюгированным антителом конъюгаты антитело – лекарственное средство проявляют более высокую гидрофобность и, таким образом, имеют большее время удерживания. Подтверждено, что чем короче время удерживания, тем выше гидрофильность образца.

[000465] 4.1: Получение конъюгата CL069707-H1L1 с лекарственным средством

[000466] 4.1.1 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-LP1

[000467] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000468] Восстановление антитела: Концентрацию CL069707-H1L1 доводили до 9 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих методик В (с использованием $1,423 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и С, описанных для способа получения. К этому раствору (1,099 мл) добавляли водный раствор 5 мМ ТСЕР (0,101 мл; 7,0 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет рН в пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000469] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к ним добавляли 10 мМ раствор LP1 в диметилацетамиде (0,108 мл; 15 эквивалентов на молекулу антитела), и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000470] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 1,2 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «CL069707-H1L1-LP1».

[000471] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\varepsilon_{D,280}=6384$ и $\varepsilon_{D,370}=16180$), методику F, методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000472] Концентрация антитела: 7,82 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 8,55. Среднее число конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике F: 7,65. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 2,83% (фиг. 6А). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 7,505 мин (фиг. 6В).

[000473] 4.1.2 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-LP2

[000474] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000475] Восстановление антитела: Концентрацию CL069707-H1L1 довели до 9 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих методик B (с использованием $1,423 \text{ мл}\cdot\text{мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (1,099 мл) добавляли водный раствор 5 мМ ТСЕР (0,101 мл; 7,0 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет pH в пределах $7,0\pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000476] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к ним добавляли 10 мМ раствор LP2 в диметилацетамиде (0,108 мл; 15 эквивалентов на молекулу антитела), и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000477] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 1,2 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «CL069707-H1L1-LP2».

[000478] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\epsilon_{D,280}=5814$ и $\epsilon_{D,370}=14742$), методику F, методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000479] Концентрация антитела: 7,37 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 9,27. Среднее число конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике F: 7,72. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 2,96% (фиг. 7A). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 7,820 мин (фиг. 7B).

[000480] **4.1.3 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство CL069707-H1L1-GGFG-DXd**

[000481] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000482] Восстановление антитела: Концентрацию CL069707-H1L1 доводили до 9 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих методик B (с использованием $1,423 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (0,275 мл) добавляли водный раствор 5 мМ ТСЕР (0,025 мл; 7,0 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет pH в пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000483] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к нему добавляли 10 мМ раствор GGFG-DXd (приобретенный у DC Chemicals, DC7556) в диметилацетамиде (0,027 мл; 15 эквивалентов на молекулу антитела), и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000484] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 0,3 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «CL069707-H1L1-GGFG-DXd».

[000485] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\epsilon_{D,280}=5178$ и $\epsilon_{D,370}=20217$), методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000486] Концентрация антитела: 6,78 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 6,88. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 0,92% (фиг. 8A). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 8,802 мин (фиг. 8B).

[000487] 4.1.4 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство DS-6000a (называемого в настоящем документе референсным ADC)

[000488] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000489] Последовательность mAb DS-6000a (называемого в настоящем документе референсным антителом) описана в US 2020/0390900 A1 (антитело H01L02). Последовательность вариабельной области тяжелой цепи референсного антитела представлена в SEQ ID NO: 105. Последовательность вариабельной области легкой цепи референсного антитела представлена в SEQ ID NO: 106. Последовательности константной области тяжелой цепи и константной области легкой цепи референсного антитела представлены, соответственно, в SEQ ID NO: 70 и SEQ ID NO: 71.

[000490] EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRNFMHWVRQAPGQGLEWMGWI YPGDGETEYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARGVYGGFAGGYFDF WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 109).

[000491] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQNIYKNLAWYQQKPKAPKLLIYDANTL QTGVPSRFSGSGSGSDFTLTISSLQPEDFATYFCQQYYSGWAFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 110).

[000492] Восстановление антитела: Концентрацию референсного антитела доводили до 14,8 мг/мл PBS7.0/EDTA с применением общих методик B (с использованием $1,678 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \text{ см}^1$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (0,659 мл) добавляли водный раствор 5 мМ ТСЕР (0,130 мл; 10,0 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет рН в

пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000493] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к нему добавляли 10 мМ раствор GGFG-DXd в диметилацетамиде (0,098 мл; 15 эквивалентов на молекулу антитела), и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000494] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 1,4 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «Референсный ADC».

[000495] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\varepsilon_{D,280}=5178$ и $\varepsilon_{D,370}=20217$), методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000496] Концентрация антитела: 4,46 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 7,02. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 2,68% (фиг. 9A). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 7,672 мин (фиг. 9B).

[000497] 4.1.5 Получение референсного антитела-LP1, конъюгата антитело – лекарственное средство

[000498] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000499] Восстановление антитела: Концентрацию референсного антитела доводили до 12,7 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих методик B (с использованием $1,678 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (0,106 мл) добавляли водный раствор 5 мМ ТСЕР (12,6 мкл; 7 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет рН в пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000500] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к ней добавляли 10 мМ раствор

LP1 в диметилацетамиде (13,5 мкл; 15 эквивалентов на молекулу антитела) и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000501] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 200 мкл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «Референсное антитело-LP1».

[000502] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\epsilon_{D,280}=6384$ и $\epsilon_{D,370}=16180$), методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000503] Концентрация антитела: 8,07 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 7,11. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 0,89% (фиг. 10A). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 6,422 мин (фиг. 10B).

[000504] 4.1.6 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-LP1 человека

[000505] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000506] Восстановление антитела: Концентрацию IgG человека (приобретен у Solarbio) доводили до 10 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих процедур B (с использованием $1,35 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (1,33 мл) добавляли водный раствор 5 мМ TCEP (0,267 мл; 10 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет pH в пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000507] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к ним добавляли 10 мМ раствор LP1 в диметилацетамиде (0,2 мл; 15 эквивалентов на молекулу антитела), и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000508] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 2 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «IgG-LP1 человека».

[000509] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\varepsilon_{D,280}=6384$ и $\varepsilon_{D,370}=16180$), методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000510] Концентрация антитела: 11,08 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 9,15. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 4,38% (фиг. 11A). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 6,213 мин (фиг. 11B).

[000511] 4.1.7 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-LP2 человека

[000512] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000513] Восстановление антитела: Концентрацию IgG человека (приобретен у Solarbio) доводили до 10 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих процедур B (с использованием $1,35 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (0,467 мл) добавляли водный раствор 5 мМ TCEP (0,093 мл; 10 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет pH в пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000514] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к нему добавляли 10 мМ раствор LP2 в диметилацетамиде (0,07 мл; 15 эквивалентов на молекулу антитела), и полученную смесь инкубировали при 22° C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000515] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 1 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «IgG-LP2 человека».

[000516] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\epsilon_{D,280}=5814$ и $\epsilon_{D,370}=14742$), методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000517] Концентрация антитела: 4,68 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 9,18. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 2,92% (фиг. 12A). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 6,506 мин (фиг. 12B).

[000518] 4.1.8 Получение конъюгата антитело – лекарственное средство IgG-GGFG-DXd человека

[000519] Этап 1: Конъюгат антитело – лекарственное средство

[000520] Восстановление антитела: Концентрацию IgG человека (приобретен у Solarbio) доводили до 10 мг/мл в PBS7.0/EDTA с применением общих процедур B (с использованием $1,35 \text{ мл} \cdot \text{мг}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ в качестве коэффициента поглощения при 280 нм) и C, описанных для способа получения. К этому раствору (2,45 мл) добавляли водный раствор 5 мМ ТСЕР (0,327 мл; 10 эквивалентов на молекулу антитела). После подтверждения того, что раствор имеет pH в пределах $7,0 \pm 0,1$, межцепочечную дисульфидную связь в антителе восстанавливали, инкубируя раствор при 37°C в течение 2 часов.

[000521] Конъюгация между антителом и линкером – рабочим веществом: Вышеописанный раствор инкубировали при 4°C в течение 10 минут. Затем к нему добавляли 10 мМ раствор GGFG-DXd в диметилацетамиде (0,294 мл; 18 эквивалентов на молекулу антитела) и полученную смесь инкубировали при 22°C в течение 30 минут для конъюгации линкера – рабочего вещества с антителом.

[000522] Очищение: Вышеописанный раствор очищали с применением общей методики D, описанной для способа получения, с получением 1 мл раствора, содержащего титульный конъюгат антитело – лекарственное средство «IgG-GGFG-DXd человека».

[000523] Получение характеристик: Применяя общую методику E (с использованием $\epsilon_{D,280}=5178$ и $\epsilon_{D,370}=20217$), методику G и методику H, описанные для способа получения, получали следующие характеристические значения.

[000524] Концентрация антитела: 8,20 мг/мл, среднее количество конъюгированных молекул лекарственного средства (n) на молекулу антитела, измеренное по общей методике E: 7,08. Агрегация конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренная по общей методике G: 4,25% (фиг. 13А). Время удерживания конъюгата антитело – лекарственное средство, измеренное с помощью общей процедуры H: 8,222 мин (фиг. 13В).

[000525] Получение других конъюгатов антитело – лекарственное средство «CL069707-ММАЕ», «CL069707-DXd», «CL069066-ММАЕ», «CL069066-DXd », «CL069439-ММАЕ» и «CL069439-DXd» осуществляли таким же образом, как для образцов, описанных выше.

Пример 5. Оценка *in vitro* конъюгата антитело – лекарственное средство

[000526] 5.1 Активность интернализации конъюгата антитело – лекарственное средство

[000527] Линии клеток рака яичников человека PA-1 (приобретенную у Zhejiang Meisen Cell Technology Co., Ltd.), OVCAR-3 (приобретенную у Национальной коллекции аутентифицированных клеточных культур) и культуру клеток карциномы почки человека 786-O (приобретенную у Shanghai Xunqing Biotechnology Co., Ltd.) поддерживали *in vitro* в виде независимых монослойных культур при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Клетки собирали с использованием частичного расщепления трипсином-EDTA с последующим центрифугированием при 1000 об/мин в течение 5 минут. Клетки ресуспендировали в холодном ФСБ и добавляли 50 мкг/мл CL069707-H1L1-LP1. Растворы клеток смешивали, инкубировали при 4°C в течение 30 мин, затем клетки промывали ФСБ, а затем разделяли на 5 частей с получением аликвот и инкубировали при 37°C в течение 0 ч, 0,5 ч, 1, 2 ч и 4 ч. В каждой точке времени брали один образец и промывали холодным ФСБ перед добавлением конъюгатов вторичных антител (в целях детекции). После инкубации при 4°C клетки промывали ФСБ, а затем подвергали проточно-цитометрическому анализу (FACS). Результаты представлены на фиг. 14. CL069707-H1L1-LP1 интернализировался в PA-1, OVCAR-3 и 786-O времязависимым образом.

[000528] 5.2 Активность ингибирования роста опухоли *in vitro* конъюгатов антитело – лекарственное средство

[000529] CDH6-положительную линию клеток рака яичников человека OVCAR-3 (приобретенную в Национальной коллекции аутентифицированных клеточных культур) и

РА-1 (приобретенную у Zhejiang Meisen Cell Technology Co., Ltd.) высевали на 96-луночный планшет с плотностью 2000 клеток/100 мкл/лунку в культуральную среду, после чего клетки культивировали в течение ночи. На следующий день каждый из конъюгатов добавляли к клеткам таким образом, чтобы конечные концентрации составляли от 0,01 нМ до 100 нМ. После культивирования в течение 5 дней среду удаляли из клеток и проводили анализ жизнеспособности ССК-8 (набор для подсчета клеток Cell Counting Kit-8) в соответствии с инструкциями производителя. Жизнеспособность клеток рассчитывали как % контрольных лунок только с опухолевыми клетками. На фиг. 15А–15D показана зависимость от концентрации активность ингибирования роста клеток при добавлении каждого из конъюгатов антител – лекарственное средство к CDH6-положительным клеткам OVCAR-3 и РА-1. Все гуманизированные CL069707-GGFG-DXd (H1L1, H1L2, H2L1 и H2L2) продемонстрировали аналогичную превосходную активность ингибирования роста опухолевых клеток на клетках OVCAR-3 и клетках РА-1, как показано на фиг. 15А и фиг. 15В. Оба положительных конъюгата антител – лекарственное средство продемонстрировали превосходную активность ингибирования роста опухолевых клеток, как показано на фиг. 15С и фиг. 15D, причем CL069707-H1L1-LP1 продемонстрировал наиболее значимую активность ингибирования в отношении клеток OVCAR-3, за ним следует CL069707-H1L1-LP2; при этом CL069707-H1L1-LP1 и CL069707-H1L1-LP2 продемонстрировали сравнимую активность ингибирования в отношении клеток РА-1.

Пример 6. Киллинговая активность в отношении клеток *in vitro* антител мыши к CDH6 CL069707, CL069439, CL069066, конъюгированными с vc-MMAE или GGFG-DXd

[000530] CDH6-положительную линию клеток рака яичников человека OVCAR-3 (приобретенную у Национальной коллекции аутентифицированных клеточных культур (National Collection of Authenticated Cell Cultures)) высевали на 96-луночный планшет с плотностью 2000 клеток/100 мкл/лунку в культуральную среду, после чего клетки культивировали в течение ночи. На следующий день к клеткам добавляли каждый из CL069707-vc-MMAE, CL069439-vc-MMAE и CL069066-vc-MMAE, так что конечные концентрации составляли от 0,005 нМ до 30 нМ; также к клеткам добавляли каждый из CL069707-GGFG-DXd, CL069439-GGFG-DXd и CL069066-GGFG-DXd, так что конечные

концентрации составляли от 0,05 нМ до 300 нМ. После культивирования в течение 5 дней среду удаляли из клеток и проводили анализ жизнеспособности ССК-8 (набор для подсчета клеток Cell Counting Kit-8) в соответствии с инструкциями производителя. Жизнеспособность клеток рассчитывали как % контрольных лунок только с опухолевыми клетками. На фиг. 16А показано, что все 3 конъюгата обладали зависимой от концентрации активностью ингибирования роста клеток в отношении OVCAR-3. Кроме того, CL069707-vc-MMAE продемонстрировал более выраженную киллинговую активность в отношении клеток, чем CL069439-vc-MMAE и CL069066-vc-MMAE. На фиг. 16В показано, что все 3 конъюгата обладали зависимой от концентрации активностью ингибирования роста клеток в отношении OVCAR-3. Кроме того, CL069707-GGFG-DXd продемонстрировал более выраженную киллинговую активность в отношении клеток, чем CL069439-GGFG-DXd и CL069066-GGFG-DXd.

Пример 7. Противоопухолевый эффект конъюгата антитело – лекарственное средство *in vivo* в модели ксенотрансплантата PA-1.

[000531] Самок мышей Balb/c возрастом 6 недель приобретали у JSJ Laboratory (Шанхай, Китай). Клетки линии рака яичников человека PA-1 (приобретенные у Zhejiang Meisen Cell Technology Co., Ltd.) смешивали с матригелем, затем имплантировали подкожно в количестве 10 миллионов клеток на животное. На 15 день (средний размер опухоли ~150 мм³) после имплантации клеток PA-1 мышам внутривенно вводили 10 мг/кг одного из следующих веществ: IgG-LP2, CL069707-H1L1-LP1, CL069707-H1L1-LP2 или CL069707-H1L1-GGFG-DXd. Объем опухолей (TV) измеряли два раза в неделю с дня начала лечения с помощью калипера и вычисляли следующим образом: $TV = (\text{ширина} \times \text{длина})^2 / 2$. Результаты представлены на фиг. 17А–17В. Все конъюгаты антитело – лекарственное средство значительно уменьшали объем опухоли после введения однократной дозы, не оказывая значимого эффекта в отношении массы тела мышей.

Пример 8. Противоопухолевый эффект конъюгата антитело – лекарственное средство *in vivo* в модели ксенотрансплантата PA-1.

[000532] Самок мышей Balb/c возрастом 6 недель приобретали у JSJ Laboratory (Шанхай, Китай). Клетки линии рака яичников человека PA-1 (приобретенные у Zhejiang Meisen Cell Technology Co., Ltd.) смешивали с матригелем, затем имплантировали подкожно в

количестве 10 миллионов клеток на животное. На 14-й день (средний размер опухоли ~150 мм³) после имплантации клеток PA-1 мышам внутривенно вводили одно из следующих веществ: ФСБ, CL069707-H1L1-LP1 (2,5 мг/кг и 5 мг/кг), CL069707-H1L1-LP2 (2,5 мг/кг и 5 мг/кг) или CL069707-H1L1-GGFG-DXd (5 мг/кг). Объем опухолей (TV) измеряли два раза в неделю с дня начала лечения с помощью калипера и вычисляли следующим образом: TV = (ширина*длина)²/2. Результаты представлены на фиг. 18А–18В. Все конъюгаты антитело – лекарственное средство уменьшали объем опухоли дозозависимым образом после введения однократной дозы, не оказывая значимого эффекта в отношении массы тела мышей. Примечательно, что CL067707-H1L1-LP1 в дозе 5 мг/кг оказывал лучший эффект в отношении ингибирования опухоли, чем CL069707-H1L1-LP2 и CL067707-H1L1-GGFG-DXd.

Пример 9. Противоопухолевый эффект конъюгата антитело – лекарственное средство in vivo в модели ксенотрансплантата OVCAR-3.

[000533] Мышей Balb/c возрастом 6–8 недель приобретали у Shanghai Lingchang Biotechnology Co., Ltd. (Шанхай, Китай). Клетки линии рака яичников человека OVCAR-3 (ATCC-HTB-161) смешивали с матригелем, затем имплантировали подкожно в количестве 10 миллионов клеток на животное. На 35-й день (средний размер опухоли ~150 мм³) после имплантации клеток OVCAR-3 мышам внутривенно вводили одно из следующих веществ: ФСБ и 10 мг/кг CL069707-H1L1-LP1. Объем опухолей (TV) измеряли два раза в неделю с дня начала лечения с помощью калипера и вычисляли следующим образом: TV = (ширина*длина)²/2. Результаты представлены на фиг. 19А–19В. Однократная доза CL069707-H1L1-LP1 значимо уменьшала объем опухоли, не влияя на массу тела мышей.

Пример 10. Противоопухолевый эффект конъюгата антитело – лекарственное средство in vivo в модели ксенотрансплантата 786-О.

[000534] Мышей NCG возрастом 6 недель приобретали у Gempharmatech (Сучжоу, Китай). Клетки линии 786-О карциномы почки человека (приобретенные у Shanghai Xunqing Biotechnology Co., Ltd.) ресуспендировали в бессывороточной среде, затем имплантировали подкожно в количестве 6,5 миллионов клеток на животное. На 15-й день (средний размер опухоли ~150 мм³) и 36-й день после имплантации клеток 786-О мышам внутривенно вводили одно из следующих веществ: ФСБ, 10 мг/кг IgG-LP1 и 10 мг/кг CL069707-H1L1-

LP1. Объем опухолей (TV) измеряли два раза в неделю с дня начала лечения с помощью калипера и вычисляли следующим образом: $TV = (\text{ширина} \times \text{длина})^2 / 2$. Результаты представлены на фиг. 20А–20В. CL069707-H1L1-LP1 значительно уменьшал объем опухоли по сравнению с IgG-LP1, не влияя на массу тела мышей.

Пример 11. Противоопухолевый эффект конъюгата антитело – лекарственное средство *in vivo* в модели ксенотрансплантата, происходящего от пациента с карциномой почки (PDX).

[000535] Мышей Nu/Nu возрастом 6–8 недель приобретали у Zhejiang Charles River Co., Ltd. Опухоли разделяли на фрагменты размером 3 мм × 3 мм × 3 мм (приблизительно 50–90 мг) и имплантировали мышам подкожно в правый бок. Затем у животных ежедневно проверяли рост опухолей и массу тела. Мышей рандомизированно распределяли в 5 групп, когда средний объем опухоли достигал ~150 мм³. День распределения в группы считали днем 0. Затем мышам внутривенно вводили 10 мг/кг одного из следующих веществ: 10 мг/кг IgG-LP1, CL069707-H1L1-LP1, IgG-GGFG-DXd, референсный ADC и референсное антитело-LP1. Объем опухолей (TV) измеряли два раза в неделю с дня начала лечения с помощью калипера и вычисляли следующим образом: $TV = (\text{ширина} \times \text{длина})^2 / 2$. Результаты представлены на фиг. 21А–21В. CL069707-H1L1-LP1 значительно уменьшал объем опухоли по сравнению с IgG-LP1, не влияя при этом на массу тела мышей; за ним следовало референсное антитело-LP1. Референсный ADC не демонстрировал активности ингибирования роста опухоли при сравнении с IgG-GGFG-DXd.

Пример 12. Получение клеток гибридомы мыши, продуцирующих моноклональное антитело против белка CDH6

[000536] 12.1 Получение антигенов

[000537] Внеклеточную область CDH6 (Ser 54-Ala 615) использовали в качестве иммуногена, а антиген приобретали у ACRO Biosystems под каталожным номером № СА6-Н5229.

[000538] 12.2 Иммунизация мышей

[000539] Каждую группу антигенов используют для иммунизации 12 мышей Balb/c (8–12 недель), и контролируют титры в сыворотке иммунизированных мышей для определения оптимального числа иммунизаций. Оптимизированные адъювант и способ иммунизации могут обеспечивать продуцирование антител (подтипа IgG) с высокой аффинностью к большинству антигенных полипептидов. После первоначальной иммунизации проводили

3–4 стимулирующих иммунизации, и после стимулирующих иммунизаций у мышей брали сыворотку для определения титра (в качестве антигенного покрытия использовали рекомбинантный белок). Мышам, в сыворотке которых титры удовлетворяют требованиям, проводят стимулирующую иммунизацию для слияния, тогда как мышам, в сыворотке которых титры не удовлетворяют требованиям, проводят стимулирующую иммунизацию от одного до двух раз для достижения максимально высоких титров перед слиянием.

[000540] 12.3 Детекция в сыворотке и скрининг

[000541] У иммунизированных мышей брали кровь из глазной орбиты и проводили детекцию титров в сыворотке с помощью ИФА ELISA (в качестве антигенного покрытия использовали рекомбинантный белок). Титры сыворотки должны были превышать 10 К, в противном случае стимулирующую иммунизацию продолжали.

[000542] 12.4 Слияние и скрининг

[000543] Брали селезенку полностью и 1/2 лимфатического узла и сливали с линией клеток миеломы SP2/0. Способ представлял собой оптимизированное слияние с применением ПЭГ. Слитые клетки высевали в 4 384-луночных планшета (от 10^2 до 10^4 клеток на лунку) и культивировали. Собирали супернатант из всех лунок, проводили скрининг положительных клеточных штаммов с помощью ИФА ELISA для детекции ответа клеточного супернатанта на рекомбинантный белок CDH6, и содержимое лунок, клетки из которых демонстрировали взаимную реакцию, переносили в 96-луночные планшеты для дальнейшего культивирования. Через несколько дней роста супернатант из всех лунок собирали и проводили детекцию реакционной способности в отношении рекомбинантного белка CDH6 с помощью ИФА ELISA. Также проводили детекцию способности клеточного супернатанта из положительных лунок связываться в различных разведениях с рекомбинантным белком CDH6 для ранжирования аффинности, и для субклонирования были отобраны 120 родительских клонов с самой высокой аффинностью.

[000544] 12.5 Субклонирование и скрининг

[000545] Проводили субклонирование с помощью метода серийных разведений и скрининга с помощью ИФА ELISA для получения моноклональных клеток гибридомы. Клетки высевали в 96-луночный планшет и культивировали до достижения покрытия приблизительно 1/6 дна планшета. Ответ супернатанта в каждой лунке на рекомбинантный белок CDH6 детектировали с помощью ИФА ELISA, и две лунки с высокими значениями оптической плотности и хорошим статусом клеток использовали для следующего раунда субклонирования. Вышеуказанные этапы повторяли до тех пор, пока показатель положительных ответов штамма клеток в лунках не составлял 100%. Затем получали моноклональные клеточные штаммы. После последнего раунда субклонирования все

положительные клетки немедленно размножали, одну часть замораживали для последующего использования, а другую часть подготавливали в виде асцита.

[000546] 12.6 Получение асцита и очищение антител

[000547] Наконец, получали 13 моноклональных клеточных штаммов и вводили в брюшную полость мышам F1 для продуцирования антител. Полученный асцит очищали с применением белка A/G и использовали для последующей детекции.

Пример 13. Активность связывания антител с антигенами

[000548] Рекомбинантный белок CDH6 наносили на планшеты для ИФА в концентрации 1 мкг/мл в течение ночи при 4 °С; после промывки PBST в планшет добавляли 10% фетальную бычью сыворотку, и смесь блокировали при 37 °С в течение 1 ч; в планшет добавляли 13 моноклональных антител к CDH6 в различных разведениях (от 0,1 нг/мл до 100 нг/мл), и проводили реакцию смеси при 37 °С в течение 1 ч; после промывки PBST в планшет добавляли меченное пероксидазой хрена вторичное антитело козы против IgG человека (Goat anti Mouse (HRP), Thermo Fisher Scientific), и проводили реакцию смеси при 37 °С в течение 30 минут; после повторного пятикратного промывания планшета PBST оставшиеся капли распределяли по абсорбирующей бумаге, насколько возможно; в каждую лунку планшета добавляли по 100 мкл ТМВ (eBioscience) и помещали в темноту при комнатной температуре (20±5 °С) на 1,5 минут; в каждую лунку планшета добавляли 100 мкл останавливающего буфера 2 N H₂SO₄ для остановки реакции с субстратом, значения OD при 450 нм считывали с помощью считывающего устройства для микропланшетов, и анализировали способность антитела к связыванию с целевым антигеном CDH6. Как показано в таблице 1 и на фиг. 23, чувствительность антитела против CDH6 и рекомбинантного белка CDH6 по настоящей заявке составляла не более 12,5 нг/мл, при этом для №13 (антитело CL069463) она составляла не более 3,125 нг/мл, для №23 (антитело CL069707) не более 1,56 нг/мл, для №4 (антитело CL069066) не более 6,3 нг/мл и для №16 (антитело CL069439) не более 1,0 нг/мл.

[000549] Таблица 3. Детекция активности связывания антитела с антигеном CDH6 с помощью ИФА

№	100	50	25	12,5	6,25	3,13	1,56	0,78	0,39	0,20	0,10	Не вычислял и
4	2,38	2,11	1,68	1,07	0,57	0,30	0,17	0,09	0,06	0,05	0,04	0,056
	2	1	5	6	7	0	0	4	3	0	8	

9	3,55 3	3,26 7	2,93 0	2,24 9	1,64 4	1,08 1	0,47 0	0,25 5	0,13 5	0,07 7	0,05 7	0,050
1 1	3,90 0	3,90 0	3,90 0	3,67 2	3,19 4	2,49 0	1,46 7	0,79 6	0,45 7	0,18 3	0,10 2	0,049
1 2	3,73 2	3,25 4	2,81 8	2,15 9	1,55 4	0,86 5	0,45 6	0,29 9	0,15 7	0,09 7	0,07 2	0,053
1 3	2,61 9	2,32 0	1,79 8	1,69 7	0,97 5	0,59 6	0,37 4	0,21 1	0,13 9	0,08 6	0,07 3	0,061
1 4	3,87 2	3,87 2	3,76 3	3,16 1	2,78 7	1,58 8	0,92 9	0,55 8	0,27 9	0,15 7	0,10 7	0,057
1 5	3,53 6	3,41 1	3,53 6	2,25 8	1,44 8	0,81 2	0,39 1	0,20 2	0,12 0	0,07 8	0,07 2	0,060
1 6	3,90 0	3,88 8	3,69 1	3,61 9	2,82 4	1,87 3	1,11 3	0,64 7	0,25 5	0,18 1	0,10 6	0,061
1 7	3,77 8	3,33 4	3,21 3	2,61 8	2,08 8	1,32 3	0,61 5	0,34 9	0,17 6	0,10 6	0,07 1	0,072
2 0	2,05 2	1,26 6	0,89 3	0,69 8	0,36 3	0,20 5	0,12 0	0,07 8	0,06 2	0,04 9	0,05 7	0,048
2 1	3,56 7	3,75 9	3,63 4	3,31 5	2,63 8	1,58 0	1,16 9	0,63 5	0,29 9	0,17 1	0,08 6	0,054
2 2	2,40 5	2,43 9	2,23 0	2,33 7	2,24 0	1,53 9	0,80 0	0,50 8	0,26 2	0,17 4	0,09 0	0,051
2 3	1,40 9	1,32 6	1,18 3	1,27 3	1,01 1	0,83 1	0,57 7	0,30 5	0,16 5	0,10 1	0,06 9	0,064

Пример 14. Специфическое распознавание антигенов CDH6, экспрессируемых на поверхности клетки, антителами

[000550] Связывание 13 моноклональных антител к CDH6 с CDH6 на поверхности клеток анализировали с помощью проточной цитометрии (FCM) с использованием клеток OVCAR-3 (клетки рака яичников человека) в качестве положительных клеток и клеток HepG2 (клетки гепатомы человека) в качестве отрицательных клеток. Собирали клетки в логарифмической фазе роста, доводили до плотности клеток 5×10^6 клеток/мл и предварительно охлаждали на льду. 13 моноклональных антител CDH6 разводили до 20

мкг/мл в содержащем 2% ФСБ предварительно охлажденном солевом растворе. Отбирали 100 мкл клеток и добавляли равный объем разбавленных моноклональных антител к CDH6, описанных выше, и проводили реакцию полученной смеси при 4 °С в течение 30 минут в темноте. После завершения реакции клетки дважды промывали 2% ФБС-содержащим предварительно охлажденным солевым раствором (6000 об/мин, 45 с). Вторичное ФЭ-антитело против IgG мыши (BD Pharmingen) разбавляли в соотношении 1:500 2% ФБС-содержащим предварительно охлажденным солевым раствором, каждую из промытых клеток ресуспендировали в 100 мкл разбавленного вторичного антитела и проводили реакцию в течение 30 мин при 4 °С в темноте. После завершения реакции клетки дважды промывали 2% ФБС-содержащим предварительно охлажденным солевым раствором (6000 об/мин, 45 с). Клетки ресуспендировали в 400 мкл солевого раствора. Проточный цитометр (BD Calibur) использовали для анализа способности антител связываться с антигенами клеточной поверхности.

[000551] Результаты представлены на фиг. 24. Результаты показали, что в общей сложности 11 антител, включая CL069463, CL069707 и тому подобное, были способны специфически распознавать клетки OVCAR-3 (клетки рака яичников человека) (фиг. 24), в то время как в отрицательных клетках HepG2 (клетки гепатомы человека) связывания не наблюдалось.

[000552] Хотя предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения были представлены и описаны в настоящем документе, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты реализации представлены исключительно в качестве примеров. Не предполагается, что изобретение ограничено конкретными примерами, представленными в настоящем описании. Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на вышеупомянутое описание, описания и иллюстрации вариантов реализации в настоящем документе не должны быть истолкованы как ограничивающие. Соответственно, специалисты в данной области техники смогут представить многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от сути настоящего изобретения. Кроме того, следует понимать, что никакие аспекты настоящего изобретения не ограничены конкретными описаниями, конфигурациями или относительными пропорциями, изложенными в настоящем документе, которые зависят от множества условий и переменных.

[000553] Хотя предпочтительные варианты реализации настоящего изобретения были представлены и описаны в настоящем документе, специалистам в данной области техники будет очевидно, что такие варианты реализации представлены исключительно в качестве примеров. Не предполагается, что изобретение ограничено конкретными примерами,

представленными в настоящем описании. Хотя настоящее изобретение было описано со ссылкой на вышеупомянутое описание, описания и иллюстрации вариантов реализации в настоящем документе не должны быть истолкованы как ограничивающие. Соответственно, специалисты в данной области техники смогут представить многочисленные варианты, изменения и замены без отклонения от сути настоящего изобретения. Кроме того, следует понимать, что никакие аспекты настоящего изобретения не ограничены конкретными описаниями, конфигурациями или относительными пропорциями, изложенными в настоящем документе, которые зависят от множества условий и переменных.

[000554] Следует понимать, что для практической реализации настоящего изобретения могут быть использованы различные альтернативы вариантам реализации настоящего изобретения, описанным в настоящем документе. Поэтому предполагается, что настоящее изобретение также охватывает любые такие альтернативы, модификации, вариации или эквиваленты. Предполагается, что приведенная далее формула изобретения определяет объем настоящего изобретения, и что она охватывает способы и структуры, входящие в объем настоящей формулы изобретения, а также их эквиваленты.

[000555] Цитируемые источники

- (1) Wheelock, M.J. and Johnson, K.R. (2003) *Annu Rev Cell Dev Biol* 19, 207-35.
- (2) Christofori, G. (2003) *EMBO J* 22, 2318-23.
- (3) Hazan, R.B. et al. (2004) *Ann N Y Acad Sci* 1014, 155-63.
- (4) Bryant, D.M. and Stow, J.L. (2004) *Trends Cell Biol* 14, 427-34.
- (5) Rabascio, C. et al. (2004) *Cancer Res* 64, 4373-7.
- (6) Yamaoka-Tojo, M. et al. (2006) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26, 1991-7.
- (7) Patel, I.S. et al. (2003) *Int J Cancer* 106, 172-7.
- (8) Sanders, D.S. et al. (2000) *J Pathol* 190, 526-30.
- (9) Goeppert, B. et al. (2016) *Epigenetics* 11, 780-790.
- (10) Zhao, L. et al. (2016) *Clin Endocrinol (Oxf)* 84, 748-55.
- (11) Sancisi, V. et al. (2013) *PLoS One* 8, e75489.
- (12) Gugnoni, M. et al. (2017) *Oncogene* 36, 667-677.
- (13) Bialucha, C.U. et al. (2017) *Cancer Discov* 7, 1030-1045.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий белок, обладающий одним или более из следующих свойств:
 - i) способность связываться с белком CDH6 с чувствительностью менее 12,5 нг/мл в ИФА ELISA;
 - ii) способность связываться с белком CDH6 со значением KD ниже чем приблизительно $3,1 \times 10^{-9} \text{M}$ в ИФА ELISA; и
 - iii) наличие активности, состоящей в интернализации в экспрессирующую CDH6 клетку путем связывания с CDH6.
2. Антигенсвязывающий белок по п. 1, где белок CDH6 представляет собой белок CDH6 млекопитающего.
3. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–2, где указанный белок CDH6 представляет собой белок CDH6 человека.
4. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–3, конкурирующий за связывание с белком CDH6 с референсным антителом, причем указанное референсное антитело содержит переменную область легкой цепи (VL) и переменную область тяжелой цепи (VH); где: VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, а VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, а VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46.
5. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–4, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
6. Антигенсвязывающий белок по п. 5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит моноклональное антитело, поликлональное антитело, димер, полимер, мультиспецифическое антитело, интактное антитело, антитело человека, гуманизированное антитело или химерное антитело.
7. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-6, где антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab, Fab', Fv-фрагмент, F(ab')₂, scFv, di-scFv и/или dAb.
8. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-7, где указанное антитело содержит химерное антитело, гуманизированное антитело и/или антитело человека.
9. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 5-8, где указанное антитело представляет собой моноклональное антитело.
10. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–9, содержащий по меньшей мере одну CDR переменную области тяжелой цепи (VH), причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66,

SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 103.

11. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–10, содержащий по меньшей мере одну CDR вариабельной области легкой цепи (VL), причем указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

12. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–11, содержащий VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1.

13. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–12, содержащий VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 89 или SEQ ID NO: 97.

14. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–13, содержащий VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 90 или SEQ ID NO: 98.

15. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–14, содержащий VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 91 или SEQ ID NO: 99.

16. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–15, содержащий VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3 или SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4 или SEQ ID NO: 10.

17. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–16, содержащий VH, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; или

hCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10.

18. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–17, содержащий VH, причем указанная

VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4; или

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10;

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99.

19. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–18, содержащий VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR1, при этом С-конец HFR1 прямо или непрямо связан с N-концом HCDR1, и HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 47 или SEQ ID NO: 52.

20. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–19, содержащий VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR2, при этом HFR2 расположена между HCDR1 и HCDR2, и HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 38 или SEQ ID NO: 48.

21. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–20, содержащий VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR3, при этом HFR3 расположена между HCDR2 и HCDR3, и HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 49 или SEQ ID NO: 53.

22. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–21, содержащий VH, причем указанная VH содержит каркасную область HFR4, при этом N-конец HFR4 прямо или непрямо связан с С-концом HCDR3, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 50.

23. Антигенсвязывающий белок по п. 1–22, содержащий VH, причем указанная VH содержит каркасные области HFR1, HFR2, HFR3 и HFR4, при этом С-конец HFR1 прямо или

непрямо связан с N-концом HCDR1, HFR2 расположен между HCDR1 и HCDR2, HFR3 расположен между HCDR2 и HCDR3, а N-конец HFR4 прямо или непрямо связан с C-концом HCDR3; где HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 14, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 16, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 17; или

HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 15, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26;

или

HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 24, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 28, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 25, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26;

или

HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 37, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 39, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 40;

или

HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 47, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 48, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 49, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 50;

или

HFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 52, HFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 38, HFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 53, и HFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 26.

24. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–23, содержащий VH, причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 95 или SEQ ID NO: 103.

25. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–24, содержащий константную область

тяжелой цепи антитела.

26. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где указанная константная область тяжелой цепи антитела содержит константную область, происходящую из IgG человека.

27. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где указанная константная область тяжелой цепи антитела содержит константную область, происходящую из IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4 человека.

28. Антигенсвязывающий белок по п. 25, где указанная константная область тяжелой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 70.

29. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–28, содержащий тяжелую цепь антитела, где указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 80 или SEQ ID NO: 87.

30. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–29, содержащий VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 92 или SEQ ID NO: 100.

31. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–30, содержащий VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 93 или SEQ ID NO: 101.

32. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–31, содержащий VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 94 или SEQ ID NO: 102.

33. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–32, содержащий VL, причем указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3, где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или

LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID

NO: 93, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94; или

где LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

34. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–33, содержащий VH и VL, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3; где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 1, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13.

35. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–34, содержащий VH и VL, причем указанная VH содержит HCDR1, HCDR2 и HCDR3, а указанная VL содержит LCDR1, LCDR2 и LCDR3; где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 2, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 3, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 4, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 5, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 6, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 7; или

HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 8, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 9, HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 10, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 11,

LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 12, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 13; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 89, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 90, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 91, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 92, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 93, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 94; или

где HCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 97, HCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 98, и HCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 99, LCDR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 100, LCDR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 101, и LCDR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 102.

36. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–35, содержащий VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR1, при этом С-конец LFR1 прямо или непрямо связан с N-концом LCDR1, и LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 59 или SEQ ID NO: 64.

37. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–36, содержащий VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR2, при этом LFR2 расположена между LCDR1 и LCDR2, и LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 56 или SEQ ID NO: 60.

38. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–37, содержащий VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR3, при этом LFR3 расположена между LCDR2 и LCDR3, и LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 57 или SEQ ID NO: 61.

39. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–38, содержащий VL, причем указанная VL содержит каркасную область LFR4, N-конец LFR4 прямо или непрямо связан с С-концом LCDR3, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 45 или SEQ ID NO: 62.

40. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–39, содержащий VL, причем указанная

VL содержит каркасные области LFR1, LFR2, LFR3 и LFR4, при этом С-конец LFR1 прямо или непрямо соединен с N-концом LCDR1, LFR2 расположен между LCDR1 и LCDR2, LFR3 расположен между LCDR2 и LCDR3, и N-конец LFR4 прямо или непрямо соединен с С-концом LCDR3; при этом LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 19, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 20, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 21, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 22; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 32, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 30, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 31, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 35, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 33; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 42, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 43, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 44, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 55, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 56, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 57, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 45; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 59, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60, LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62; или

LFR1 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 64, LFR2 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 60,

LFR3 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 61, и LFR4 содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 62.

41. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–40, содержащий VL, причем указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 96 или SEQ ID NO: 104.

42. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–41, содержащий VH и VL, причем указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 18, а указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 23; или

указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 41, а указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 46; или

указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 66, а указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 68; или

указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 67, а указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 69; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 95, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 96; или

где указанная VH содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 103, и указанная VL содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 104.

43. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–42, содержащий константную область легкой цепи антитела.

44. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–43, где указанная константная область легкой цепи антитела содержит константную область Igκ человека или константную область Igλ человека.

45. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–44, где указанная константная область легкой цепи антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 71.

46. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–45, содержащий легкую цепь антитела, при этом указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 81 или SEQ ID NO: 88.

47. Антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–46, содержащий тяжелую цепь антитела и легкую цепь антитела, при этом указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 72, а указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 73; или
- указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 80, а указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 81; или
- указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 85, а указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 86; или
- указанная тяжелая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 87, а указанная легкая цепь антитела содержит аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO: 88.
48. Полипептид, содержащий антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–47.
49. Молекула или молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–47 или полипептид по п. 48.
50. Вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п. 49.
51. Клетка, отличающаяся тем, что она содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п. 49 или вектор по п. 50, или тем, что указанная клетка экспрессирует антигенсвязывающий белок по пп. 1–47 или полипептид по п. 48.
52. Способ получения антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1–47, где указанный способ включает культивирование указанной клетки по п. 51 в условиях, обеспечивающих экспрессию антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1–47.
53. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–47, полипептид по п. 48, молекулу нуклеиновой кислоты по п. 49, вектор по п. 50 и/или клетку по п. 51, и необязательно фармацевтически приемлемый носитель.
54. Набор, содержащий антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–47, полипептид по п. 48 или фармацевтическую композицию по п. 53.
55. Применение антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1–47, полипептида по п. 48, молекулы нуклеиновой кислоты по п. 49, вектора по п. 50 и/или клетки по п. 51, и/или фармацевтической композиции по п. 53 для получения медикамента для предотвращения и/или лечения заболевания или нарушения, связанного с CDH6.
56. Применение по п. 55, где заболевание или нарушение, связанное с CDH6, включает опухоль.

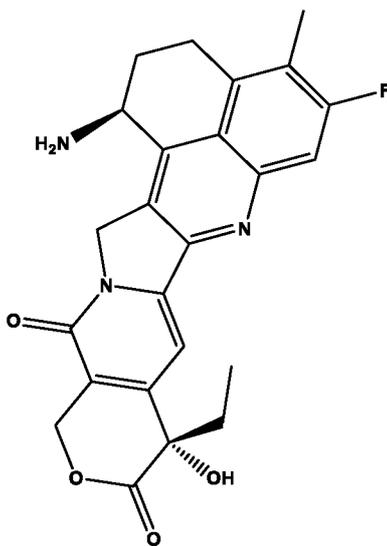
57. Применение по любому из пп. 55–56, где указанная опухоль включает опухоль, экспрессирующую CDH6.
58. Применение по любому из пп. 55–57, где указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак печени, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.
59. Применение по любому из пп. 55–58, где указанный медикамент дополнительно содержит дополнительный терапевтический агент.
60. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват, содержащие антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–47 или полипептид по п. 48.
61. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 60, дополнительно содержащие активный фрагмент, конъюгированный с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.
62. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 61, где активный фрагмент содержит лекарственный фрагмент и/или метку.
63. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 62, где указанный лекарственный фрагмент выбран из группы, состоящей из цитотоксического агента, цитокина, нуклеиновой кислоты, молекулы, связанной с нуклеиновой кислотой, радионуклида, хемокина, иммуно(ко)стимулирующей молекулы, иммуносупрессивной молекулы, лиганда смерти, белка, индуцирующего апоптоз, киназы, пролекарство-превращающего фермента, РНКазы, агонистического антитела или фрагмента антитела, антагонистического антитела или фрагмента антитела, фактора роста, гормона, фактора коагуляции, фибринолитического белка, пептидов, имитирующих указанное, и их фрагментов, слитых белков и производных.
64. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 62, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, агента для визуализации и иона металла.
65. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 63–64, где указанный цитотоксический агент содержит лекарственное средство, разрушающее микротрубочки, и/или агент, повреждающий ДНК.

66. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 63–65, где указанный цитотоксический агент содержит ингибитор тубулина и/или ингибитор топоизомеразы.

67. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 63–66, где указанный цитотоксический агент содержит ингибитор топоизомеразы I.

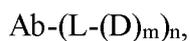
68. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 63–67, где указанный цитотоксический агент содержит камптотецин или его производное.

69. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 63–68, где указанный цитотоксический агент содержит следующую структуру формулы II или ее таутомер, мезомер, рацемат, энантиомер или диастереомер, или их смеси, или их фармацевтически приемлемую соль или сольват:



(II)

70. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 60–69, где указанный иммуноконъюгат представляет собой конъюгат антитело – лекарственное средство (ADC) формулы (I):



(I)

где Ab представляет собой антигенсвязывающий белок по любому из пп. 1–47;

L представляет собой линкер;

D представляет собой лекарственный фрагмент;

m представляет собой целое число от 1 до 8; и

n представляет собой любое число от 1 до 10.

71. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 70, где L выбран из: расщепляемого линкера и нерасщепляемого линкера.

72. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–71, где L содержит расщепляемый пептид.

73. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 72, где расщепляемый пептид может быть расщеплен ферментом.

74. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 73, где указанный фермент содержит катепсин В.

75. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 72–74, где расщепляемый пептид или L содержит аминокислотную единицу.

76. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 75, где аминокислотная единица содержит дипептид, трипептид, тетрапептид или пентапептид.

77. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 75–76, где аминокислотная единица выбрана из: Val-Cit, Val-Ala, Glu-Val-Cit, Ala-Ala-Asn, Gly-Val-Cit, Gly-Gly-Gly и Gly-Gly-Phe-Gly.

78. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–77, где L содержит спейсер.

79. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 78, где спейсер содержит саморасщепляющиеся спейсеры.

80. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 79, где саморасщепляющийся спейсер содержит п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB).

81. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 72–80, где расщепляемый пептид прямо присоединяется к спейсеру при сплайсинге.

82. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–81, где L содержит: -Val-Cit-PABC-, -Val-Ala-PABC-, -Glu-Val-Cit-PABC-, -Ala-Ala-Asn-PABC-, -Gly-Val-Cit-PABC-, -Gly-Gly-Gly-PABC-, -Gly-Gly-Phe-Gly-PABC-, -Val-Cit-PAB-, -Val-Ala-PAB-, -Glu-Val-Cit-PAB-, -Ala-Ala-Asn-PAB-, -Gly-Val-Cit-PAB-, -Gly-Gly-Gly-PAB- или -Gly-Gly-Phe-Gly-Ply-PAB-.

83. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из п.п. 70–82, где спейсер содержит структуру, представленную в $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^1}-\text{La}-\text{Lb}-\text{Lc}-$, где La обозначает $-\text{O}-$ или одинарную связь; Lb обозначает $-\text{CR}^2(-\text{CR}^3)-$ или одинарную связь, где R^2 и R^3 каждый независимо обозначает $\text{C}_1\sim\text{C}_6$ алкил, $-(\text{CH}_2)_{n^a}-\text{NH}_2$, $-(\text{CH}_2)_{n^b}-\text{COOH}$ или $-(\text{CH}_2)_{n^c}-\text{OH}$, n^1 обозначает целое число от 0 до 6, n^a , n^b и n^c каждый независимо обозначает целое число от 1 до 4, при этом R^2 и R^3 не являются одинаковыми, если n^a равен 0, и Lc означает $-\text{C}(=\text{O})-$.

84. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 83, где спейсер содержит $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_3-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{NH}-(\text{CH}_2)_2-\text{O}-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$.

85. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–84, где L содержит структуру, представленную в $-\text{L}_1-\text{L}_2-\text{L}_3-$, где L_1 обозначает $-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-(\text{CH}_2)_{n^2}-\text{C}(=\text{O})-$, $-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-(\text{CH}_2)_{n^3}-\text{C}(=\text{O})-$ или $-\text{C}(=\text{O})-(\text{CH}_2)_{n^4}-\text{C}(=\text{O})-$, где n^2 обозначает целое число от 2 до 8, n^3 обозначает целое число от 1 до 8, и n^4 обозначает целое число от 1 до 8; L_2 обозначает аминокислотное звено; L_3 обозначает саморазлагающийся спейсер.

86. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–85, где L выбран из:

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH-PABC}-;$

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$

$-\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$

$-\text{C}(=\text{O})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-PABC}-;$

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$;

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$;

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$;

$-(\text{сукцинимидил-3-ил-N})-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-\text{GGFG-NH}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{C}(=\text{O})-$;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-GGFG-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-C(=O)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-PABC-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂CH₂CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-CH₂CH₂-O-CH₂-C(=O)-;

-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH₂CH₂-C(=O)-NH-CH₂CH₂O-CH₂CH₂O-CH₂CH₂-C(=O)-VA-NH-

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$;

$\text{-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$;

$\text{-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$;

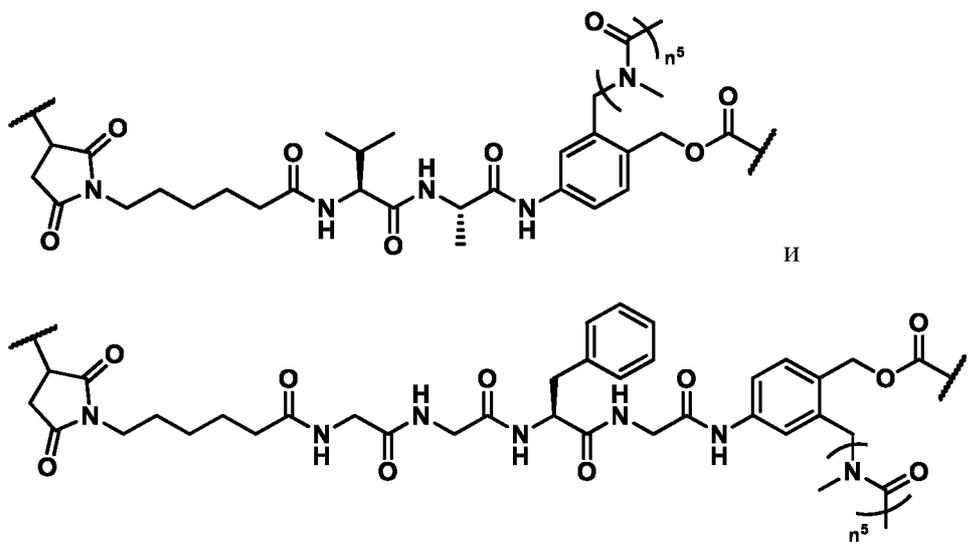
$\text{-(сукцинимидил-3-ил-N)-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{O-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$;

$\text{-CH}_2\text{-C(=O)-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$; и

$\text{-C(=O)-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-VA-NH-CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{-C(=O)-}$.

87. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–86, где п-аминобензоксикарбонил (PABC) или п-аминобензил (PAB) содержит остаток полисаркозина (поли-N-метилглицина).

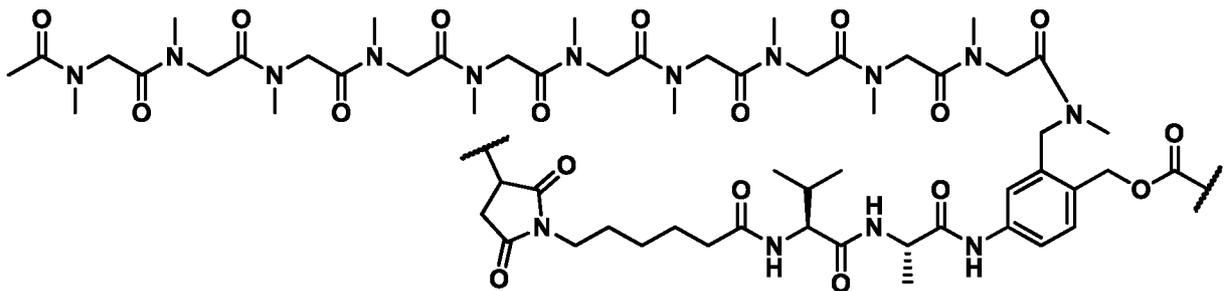
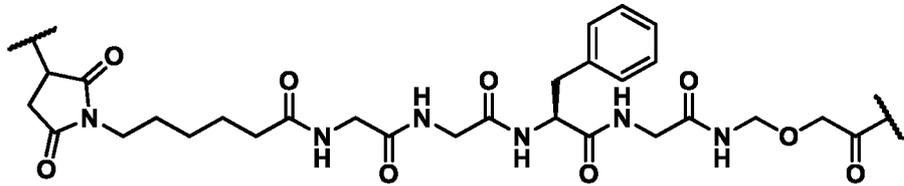
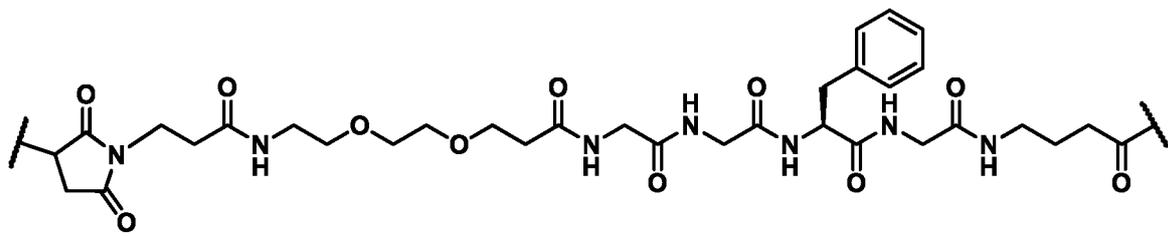
88. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–87, где L выбран из следующей структуры:



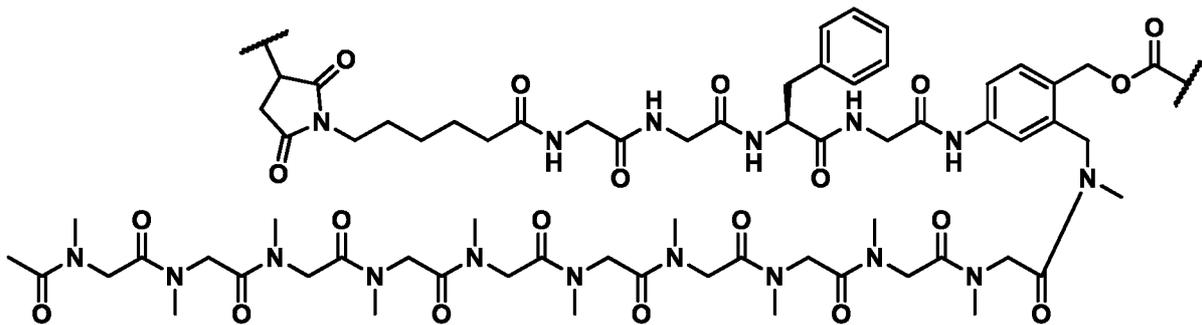
где n^5 обозначает целое число от 0 до 20.

89. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 88, где n^5 обозначает целое число от 1 до 15.

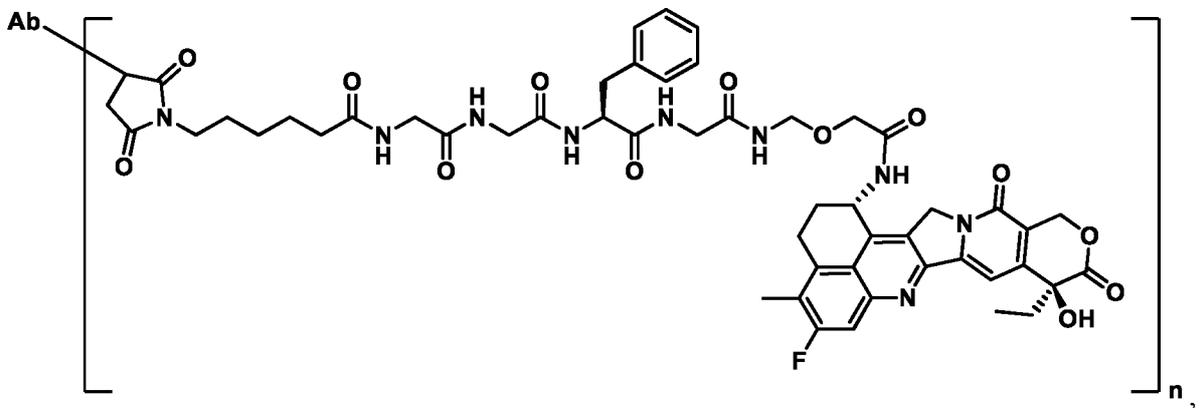
90. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 70–89, где L выбран из следующей структуры:

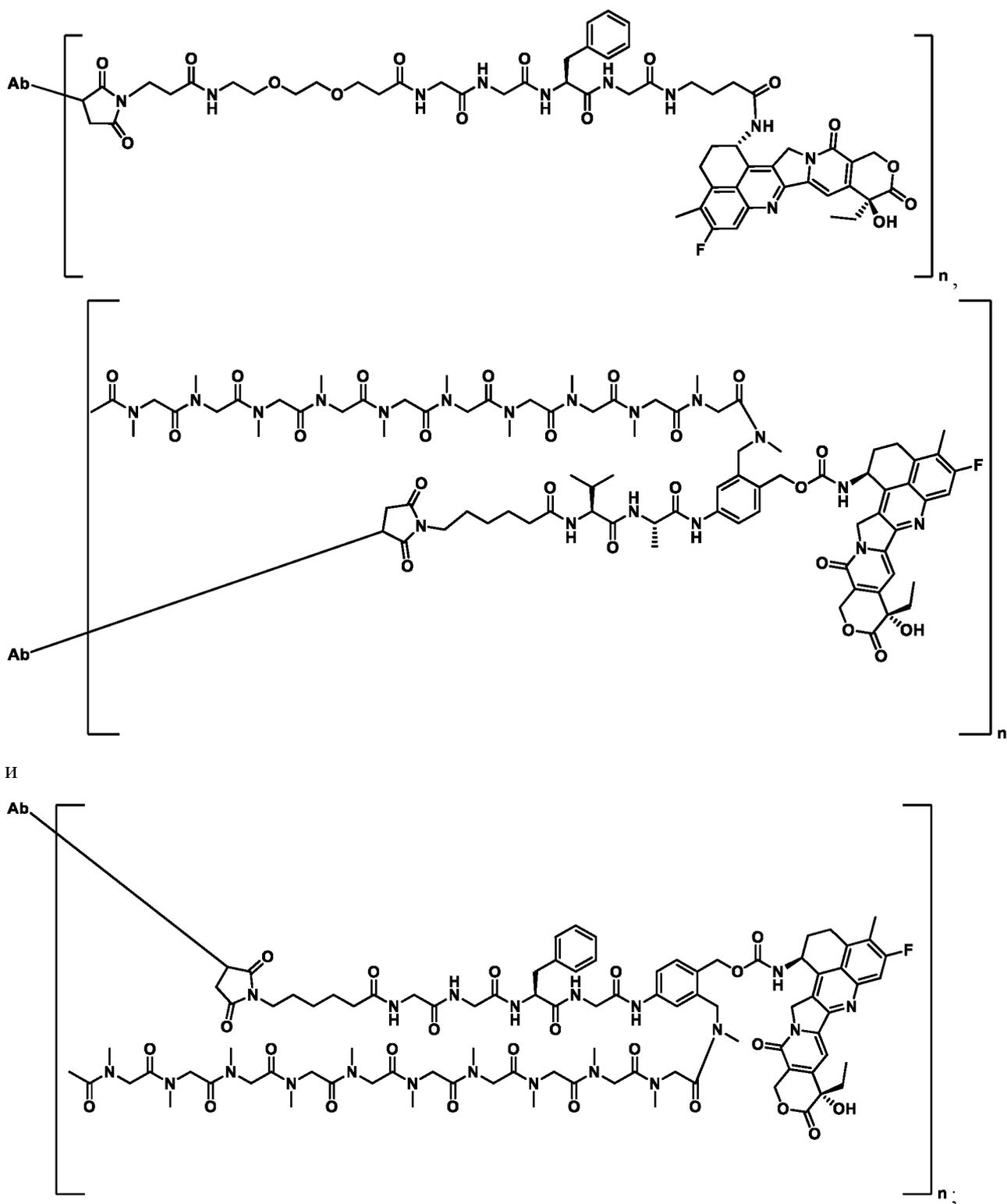


И



91. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по любому из пп. 60–90, где указанный конъюгат антитело – лекарственное средство выбран из следующих структур:





где n представляет собой любое число от 1 до 10.

92. Иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемая соль или сольват по п. 91, где n представляет собой любое число от 2 до 9.

93. Способ получения иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из пп. 60–92, включающий этап взаимодействия антигенсвязывающего белка по любому из пп. 1–47 с промежуточным соединением лекарственное средство –

линкер.

94. Фармацевтическая композиция, содержащая иммуноконъюгат, или его фармацевтически приемлемую соль или сольват по любому из пп. 60–92.

95. Фармацевтическая композиция по п. 94, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель или фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

96. Применение иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из пп. 60–92 или фармацевтической композиции по любому из пп. 94–95 для получения медикамента для лечения опухолей.

97. Применение по п. 96, где указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CDH6.

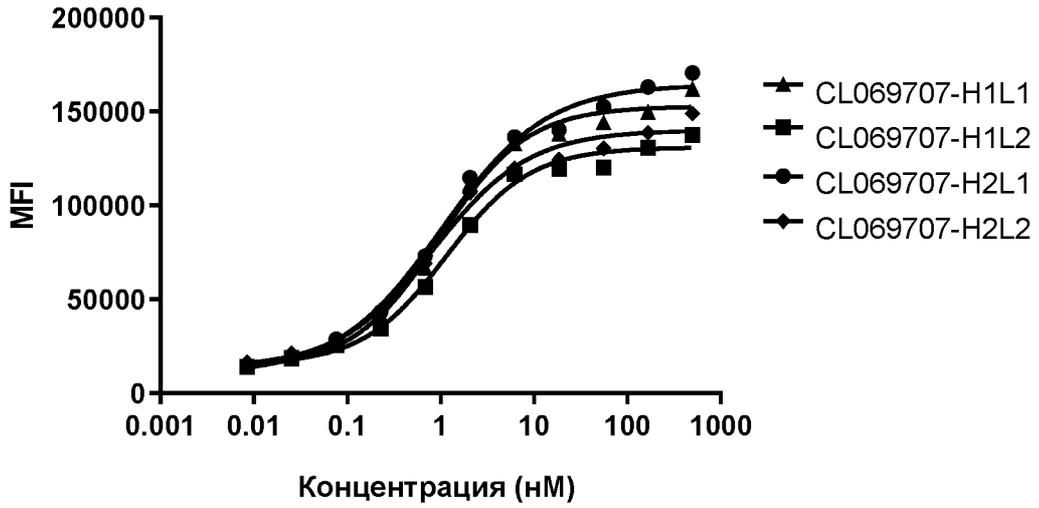
98. Применение по любому из пп. 96–97, где указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

99. Способ лечения опухоли, включающий введение иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из пп. 60–92.

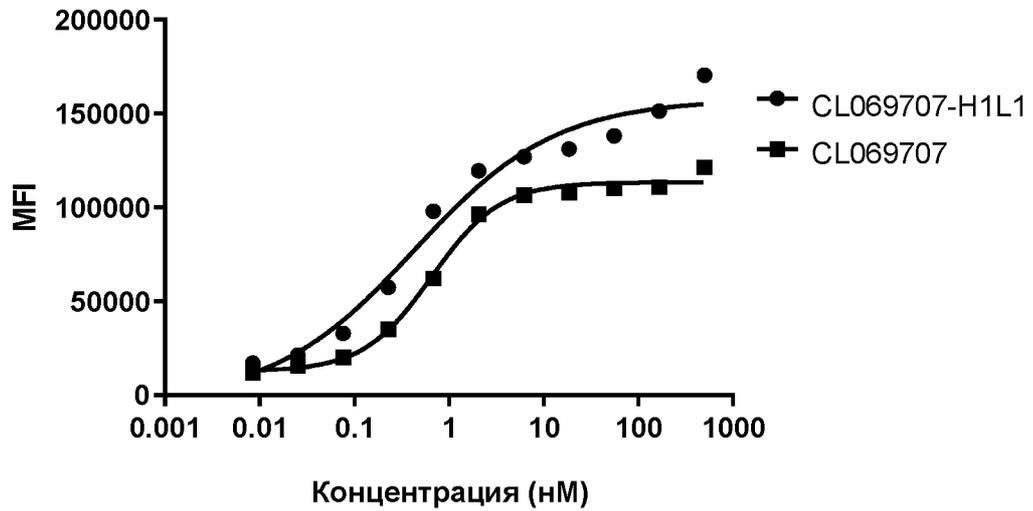
100. Способ по п. 99, где указанная опухоль представляет собой опухоль, экспрессирующую CDH6.

101. Способ по любому из пп. 99–100, где указанная опухоль включает почечно-клеточную карциному, светлоклеточную карциному почки, папиллярную почечно-клеточную карциному, рак яичника, серозную аденокарциному яичника, рак щитовидной железы, рак желчных протоков, рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, глиобластому, мезотелиому, рак матки, рак поджелудочной железы, опухоль Вильмса или нейробластому.

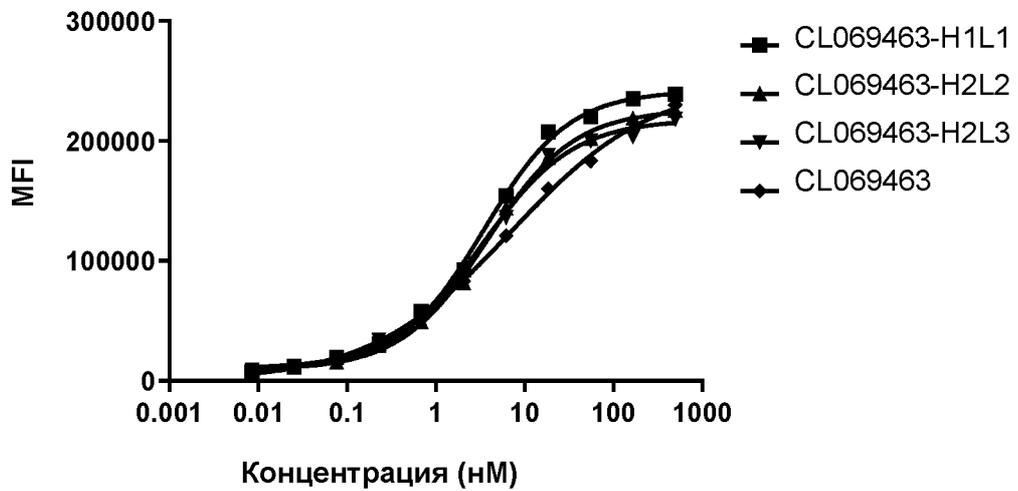
102. Способ лечения опухоли, включающий введение субъекту фармацевтической композиции, содержащей по меньшей мере один компонент, выбранный из иммуноконъюгата, или его фармацевтически приемлемой соли или сольвата по любому из пп. 60–92, и по меньшей мере одного противоопухолевого лекарственного средства, одновременно, отдельно или последовательно.



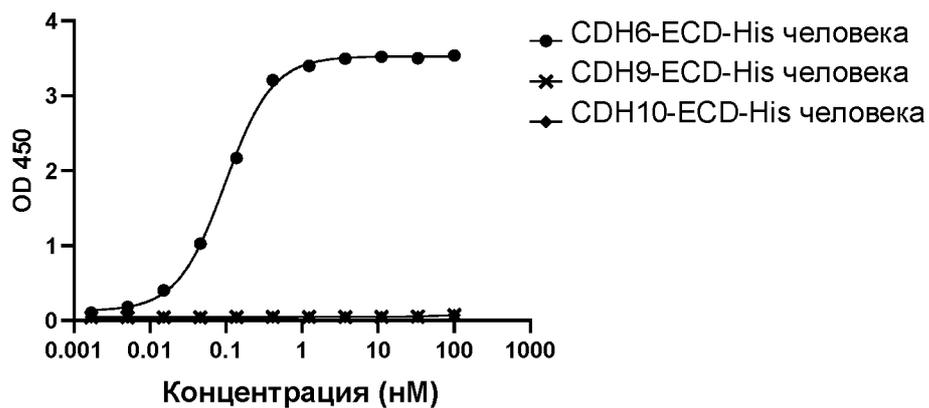
Фиг. 1А



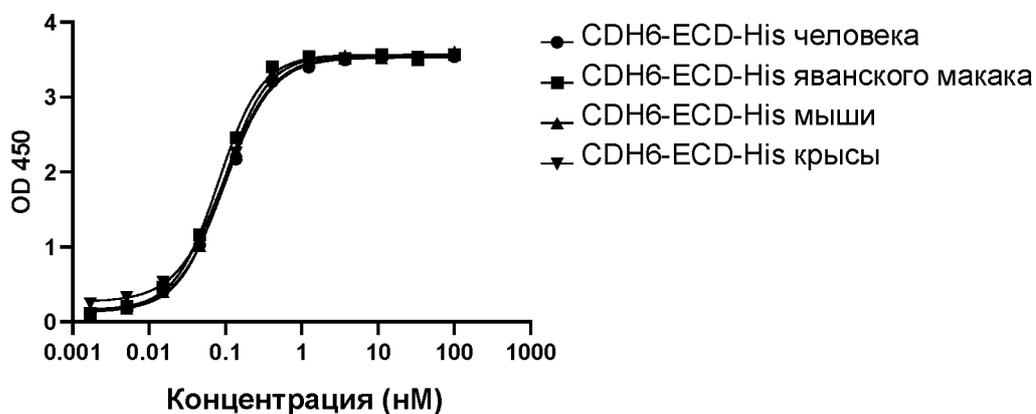
Фиг. 1В



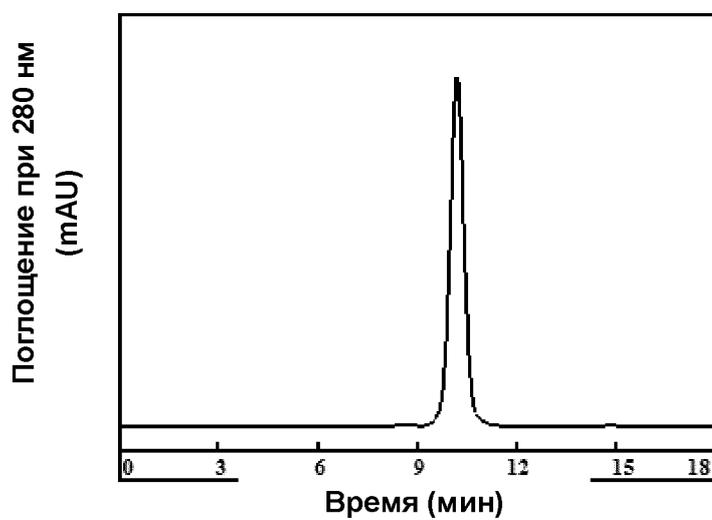
Фиг. 2



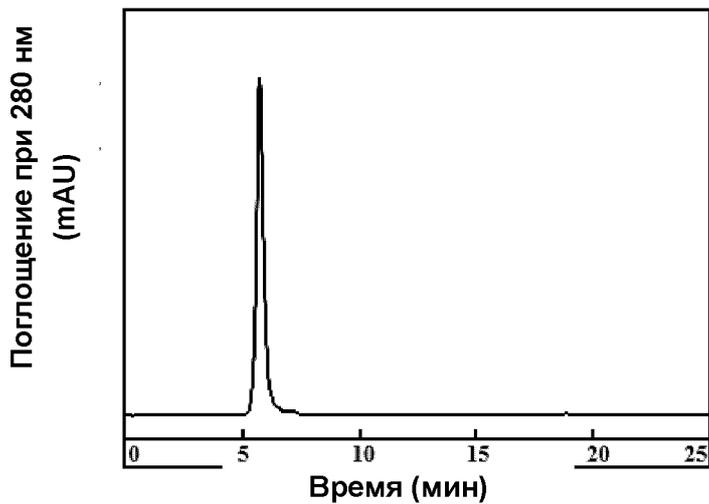
Фиг. 3



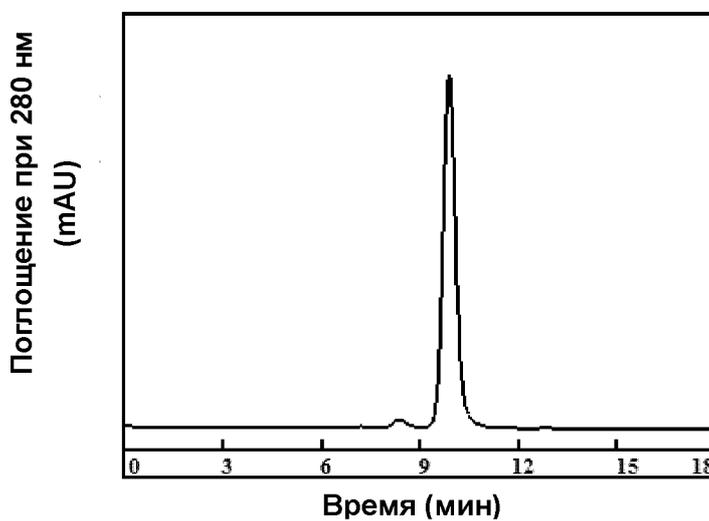
Фиг. 4



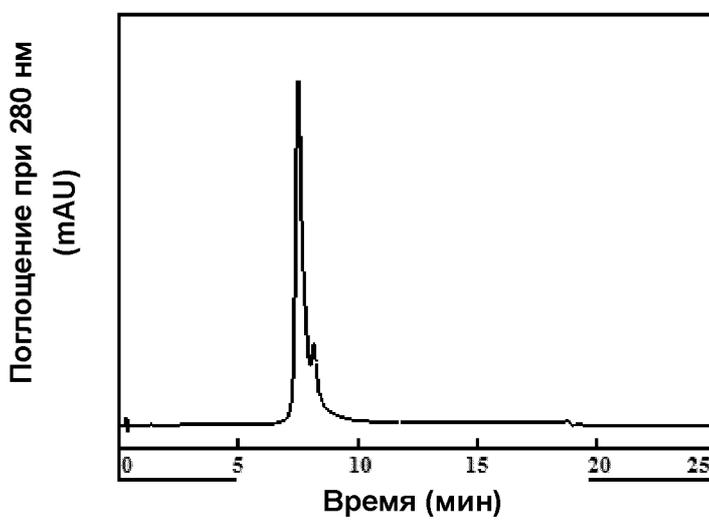
Фиг. 5А



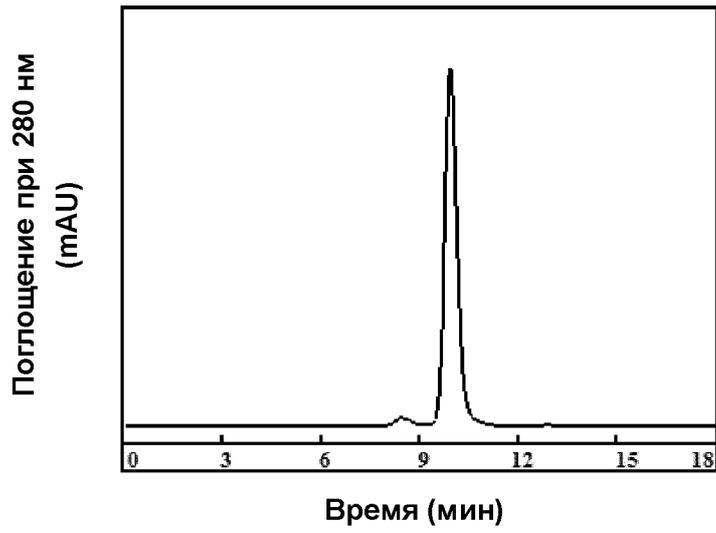
Фиг. 5В



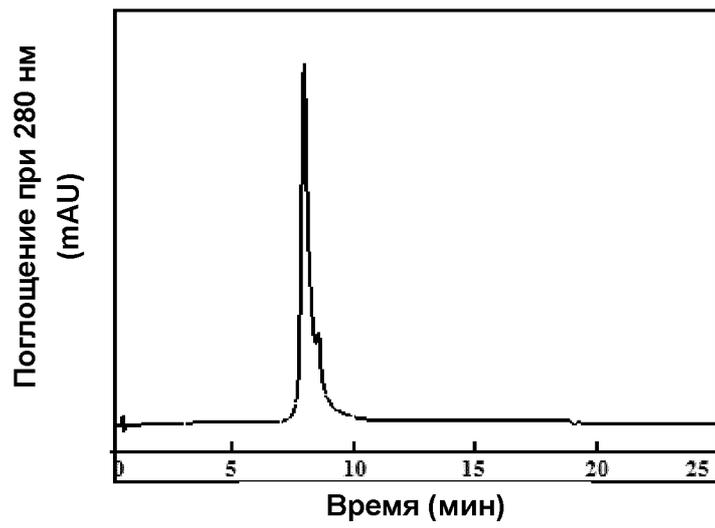
Фиг. 6А



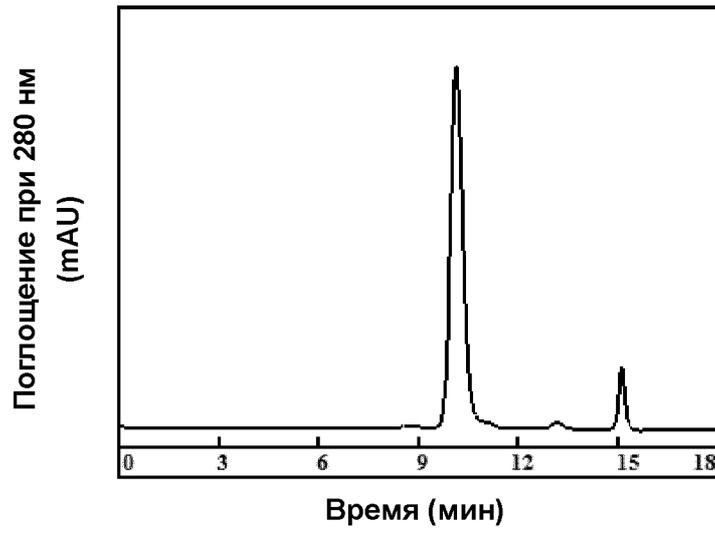
Фиг. 6В



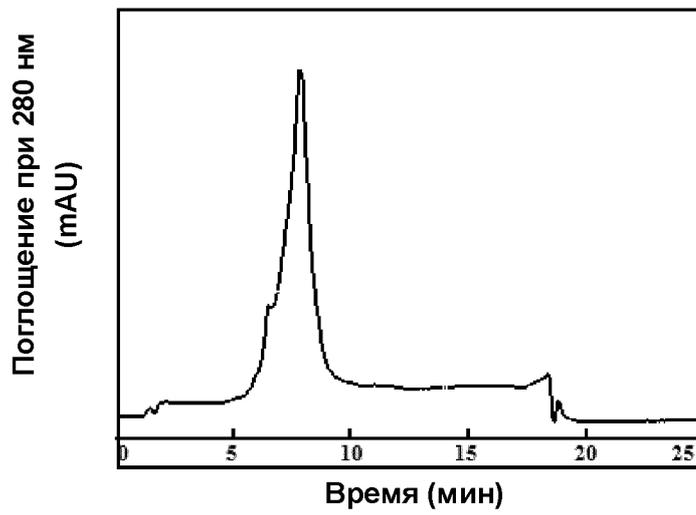
Фиг. 7А



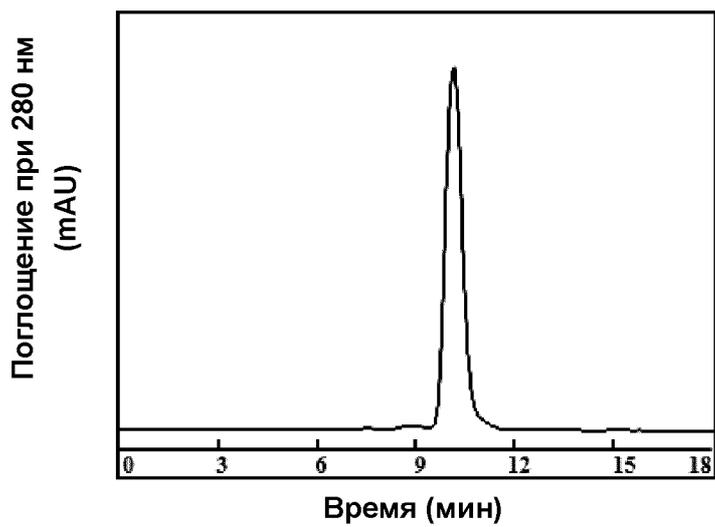
Фиг. 7В



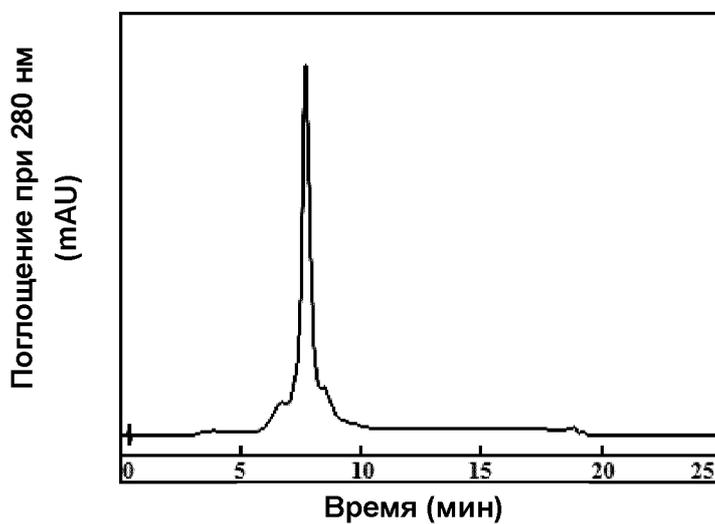
Фиг. 8А



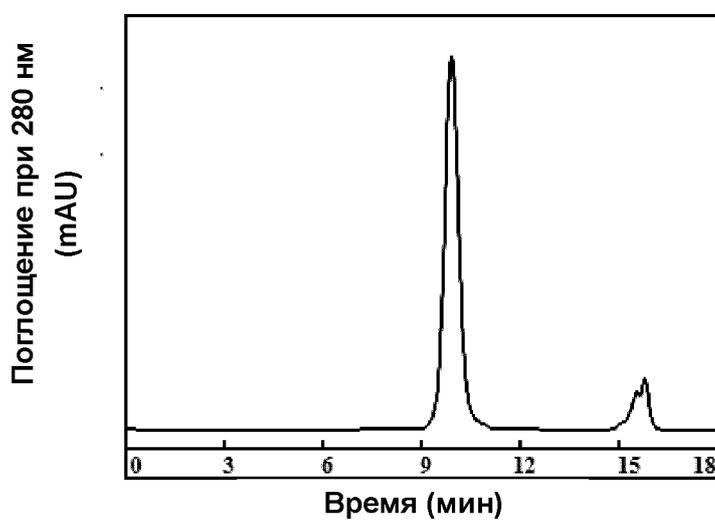
Фиг. 8В



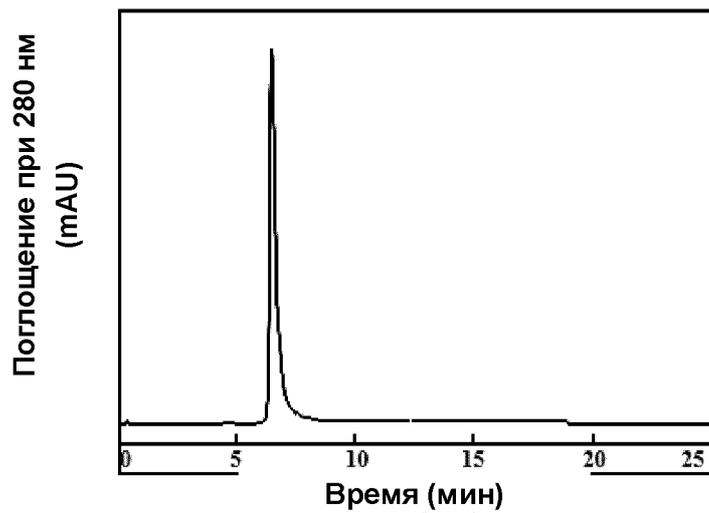
Фиг. 9А



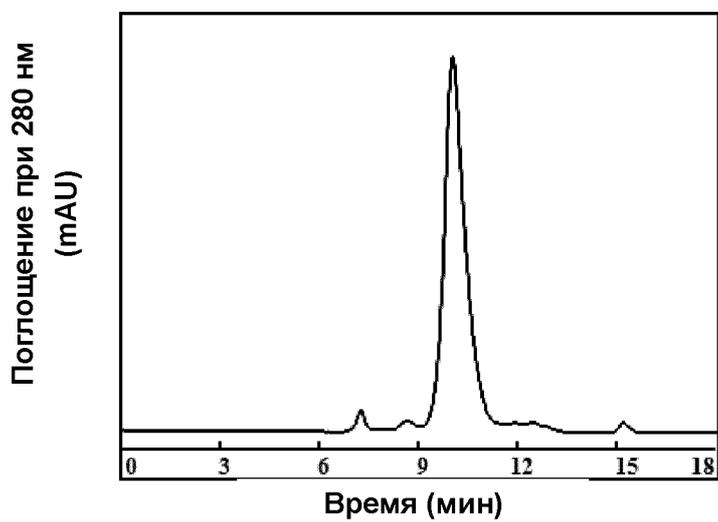
Фиг. 9В



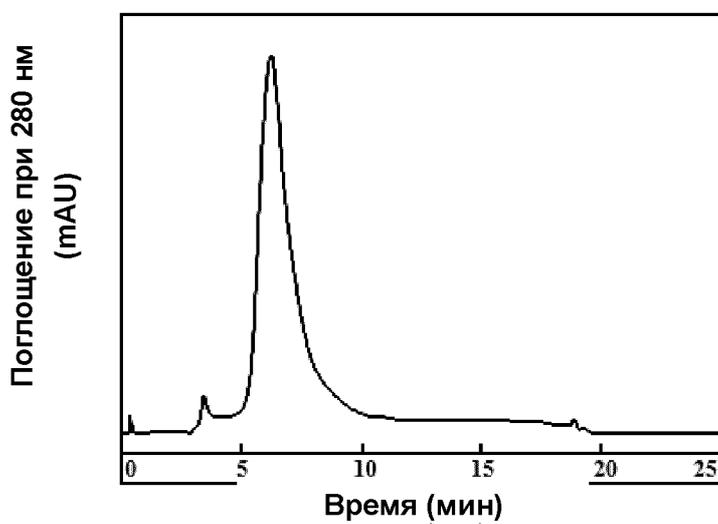
Фиг. 10А



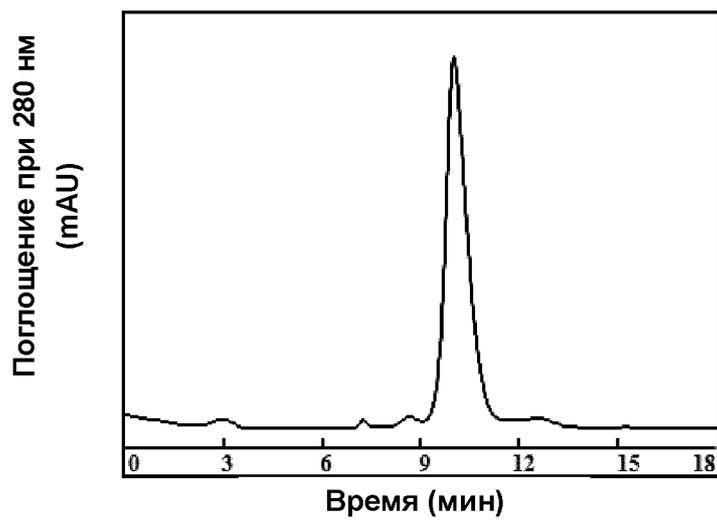
Фиг. 10В



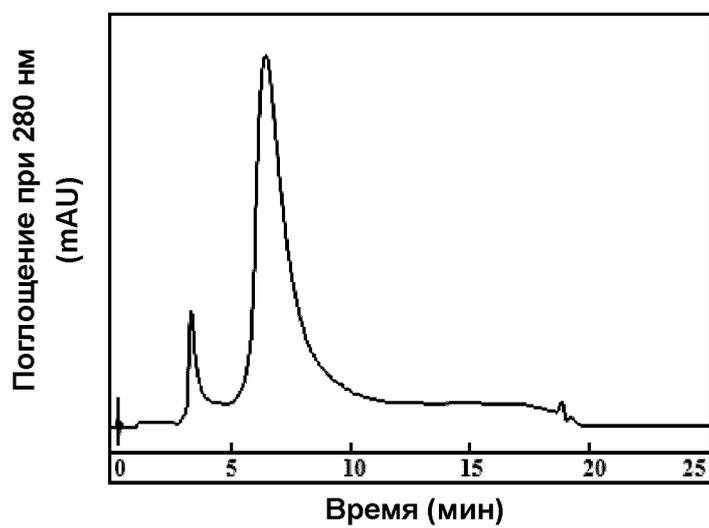
Фиг. 11А



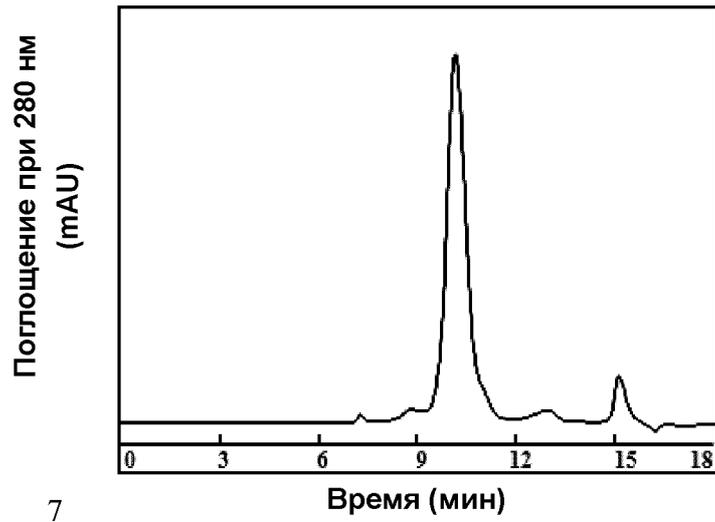
Фиг. 11В



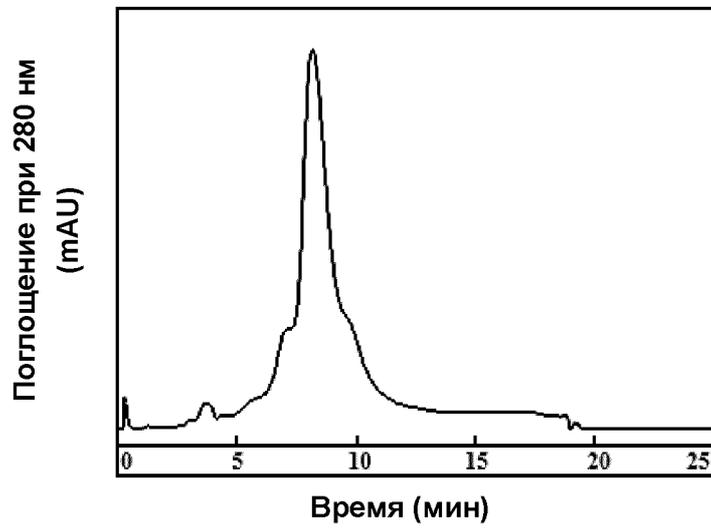
Фиг. 12А



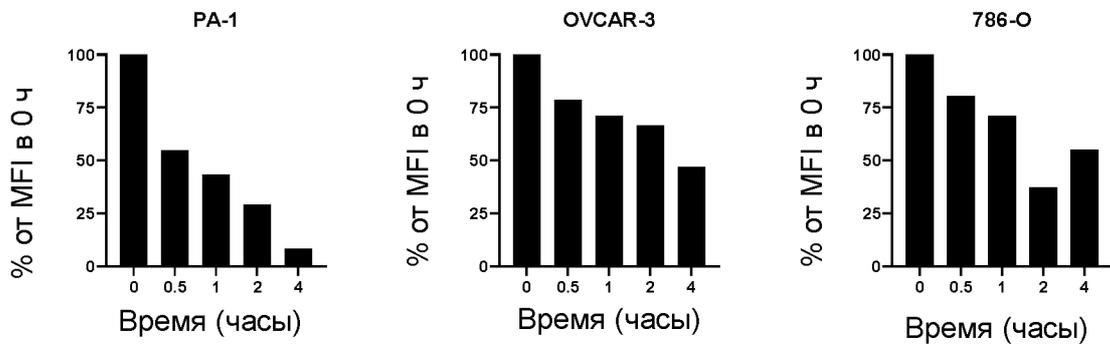
Фиг. 12В



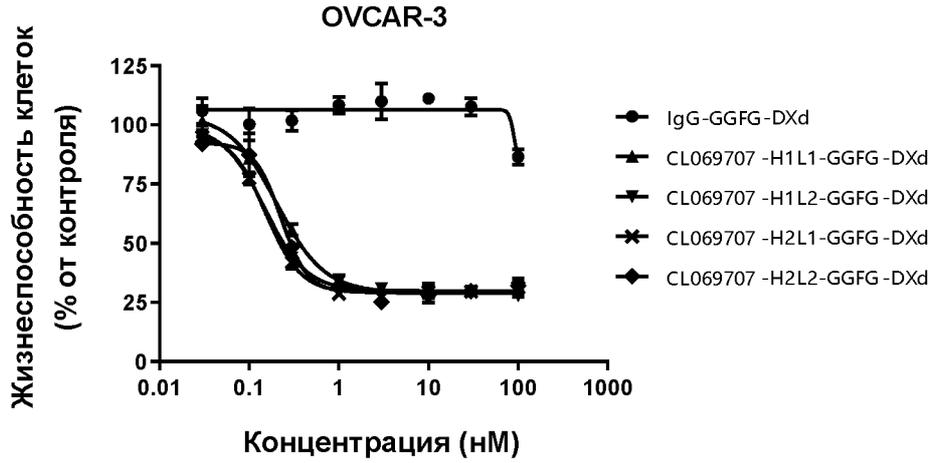
Фиг. 13А



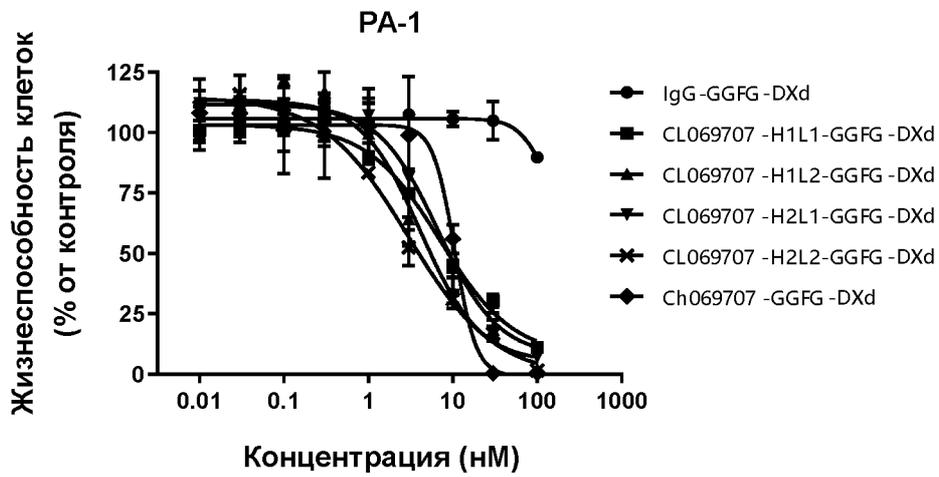
Фиг. 13В



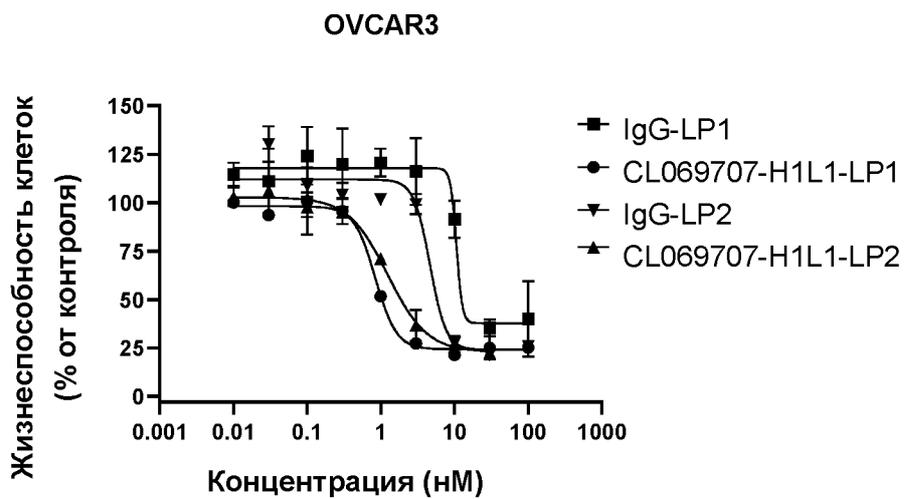
Фиг. 14



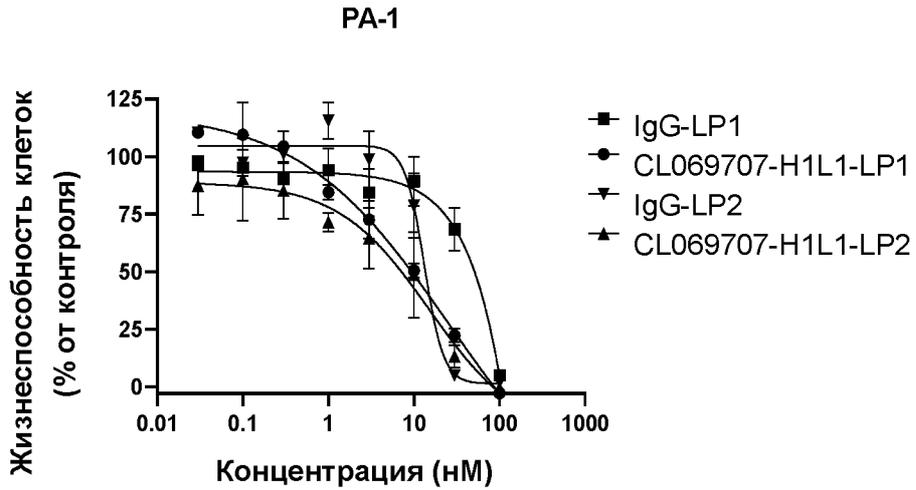
Фиг. 15А



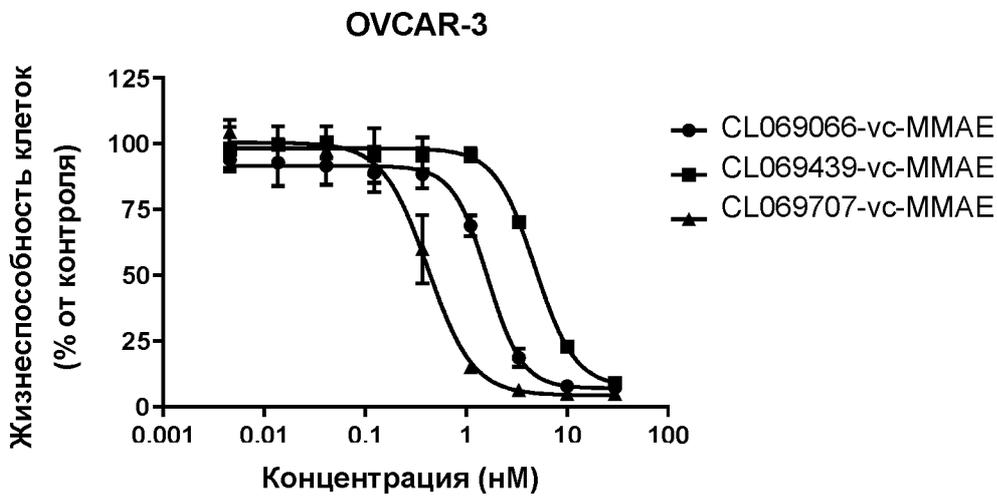
Фиг. 15В



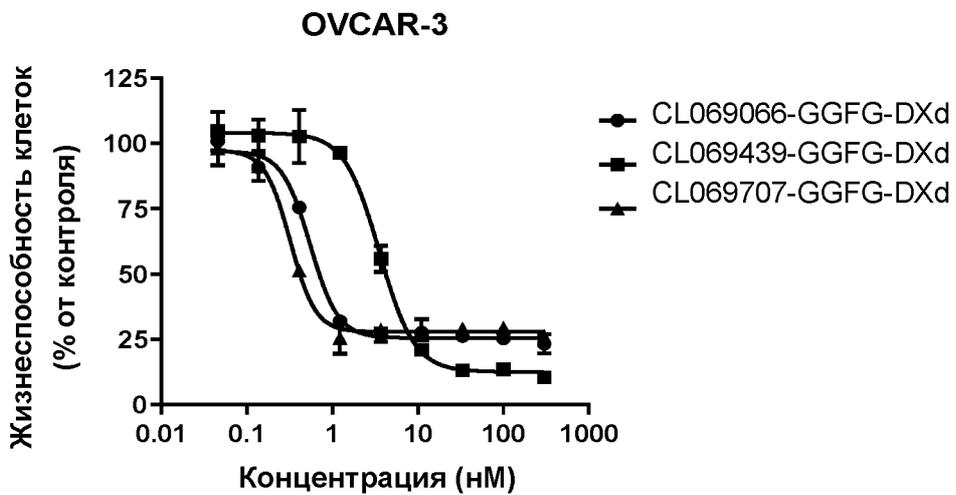
Фиг. 15С



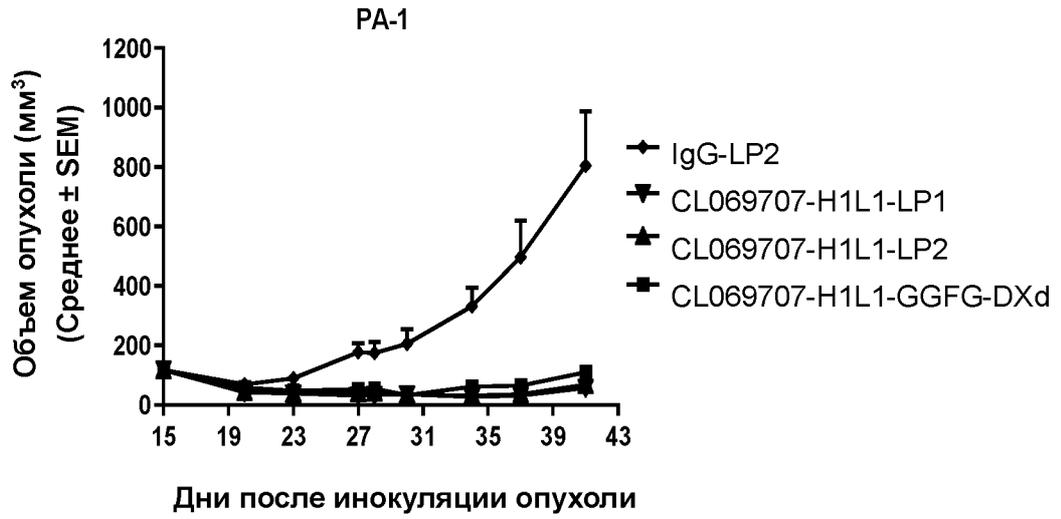
Фиг. 15D



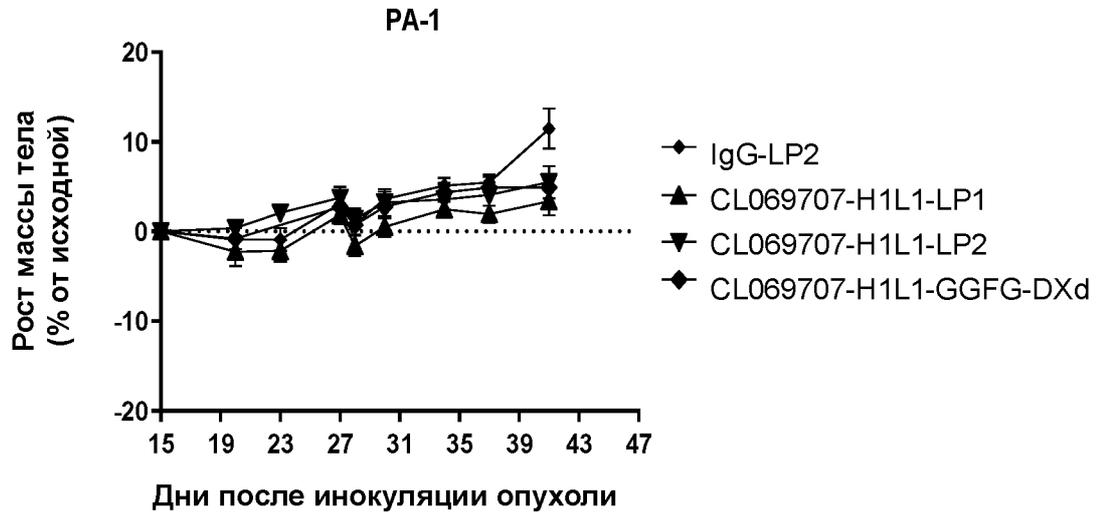
Фиг. 16A



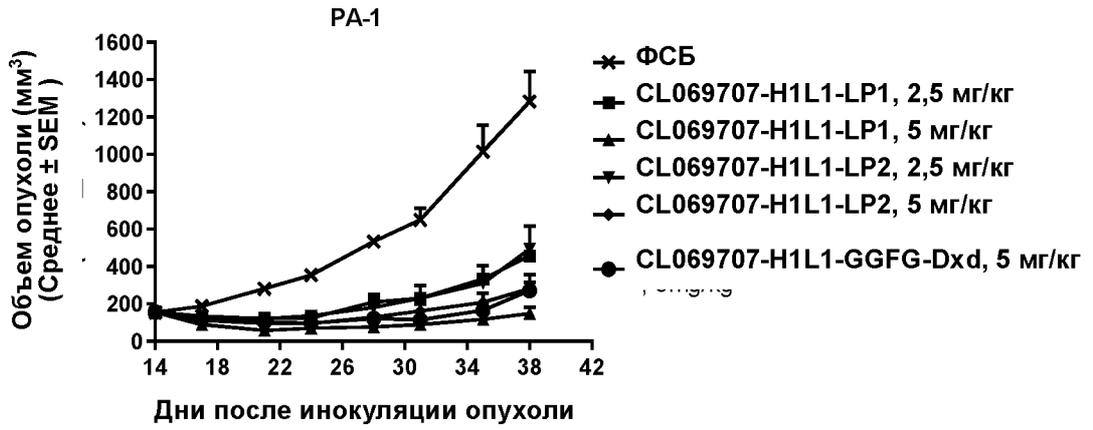
Фиг. 16B



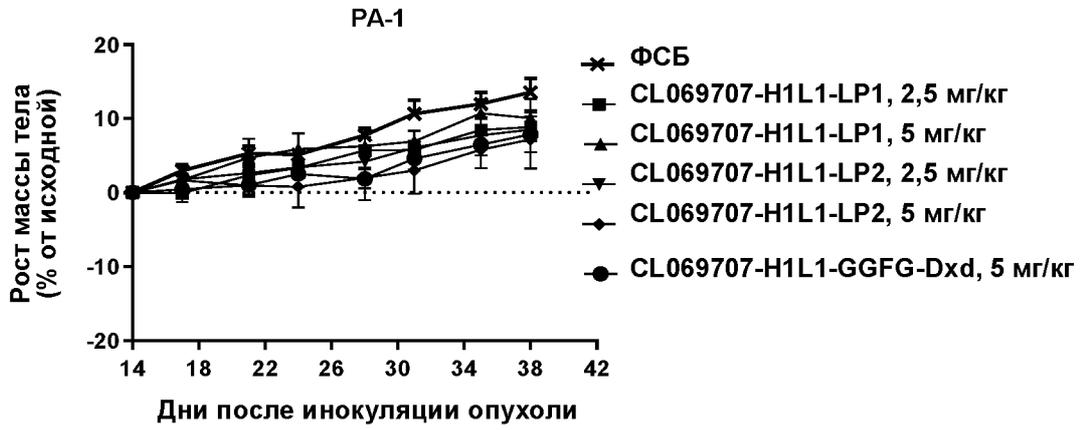
Фиг. 17А



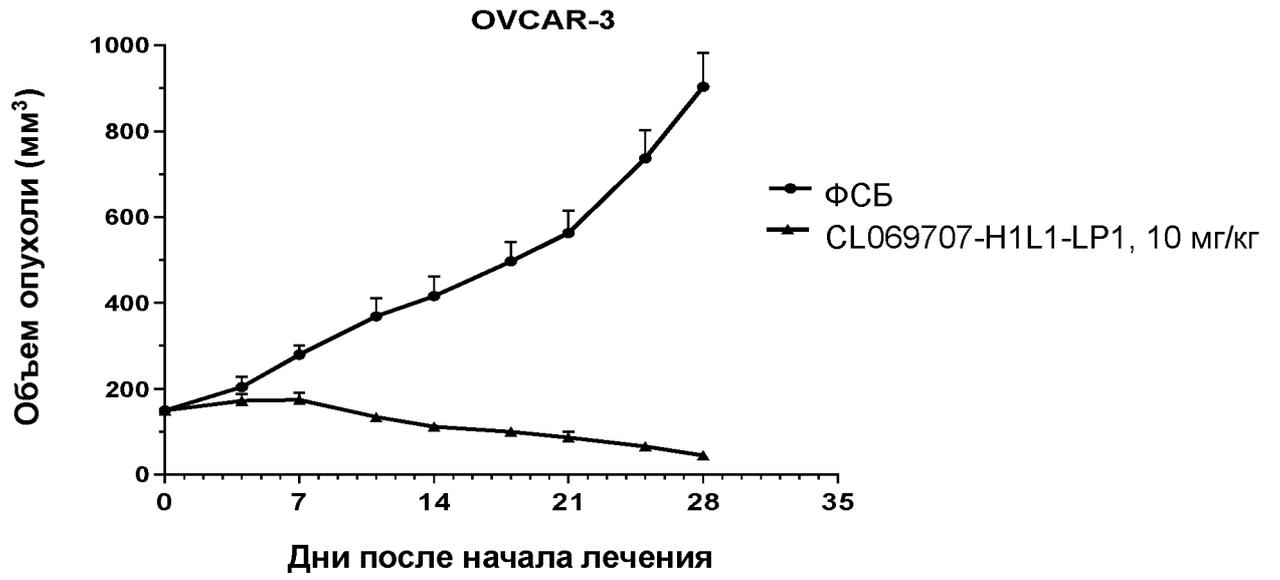
Фиг. 17В



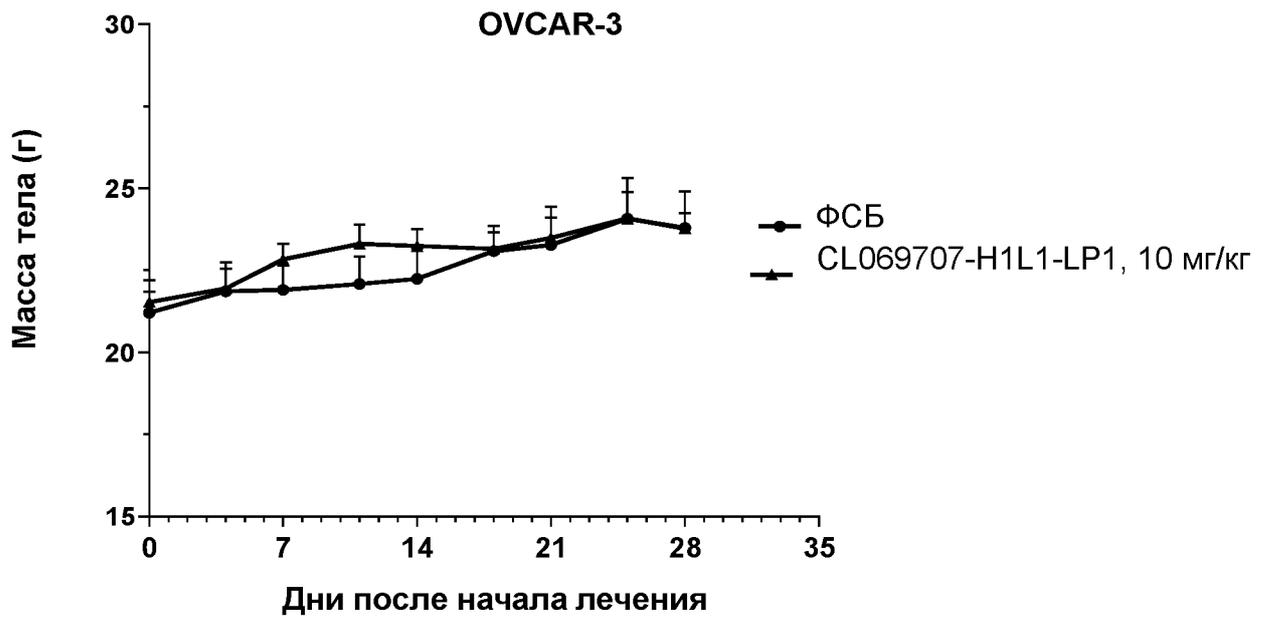
Фиг. 18А



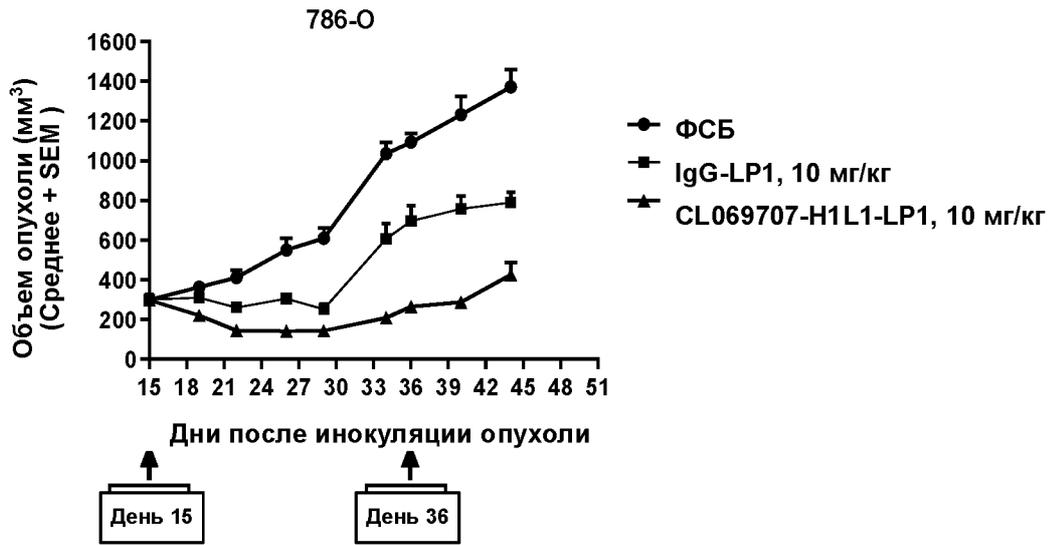
Фиг. 18В



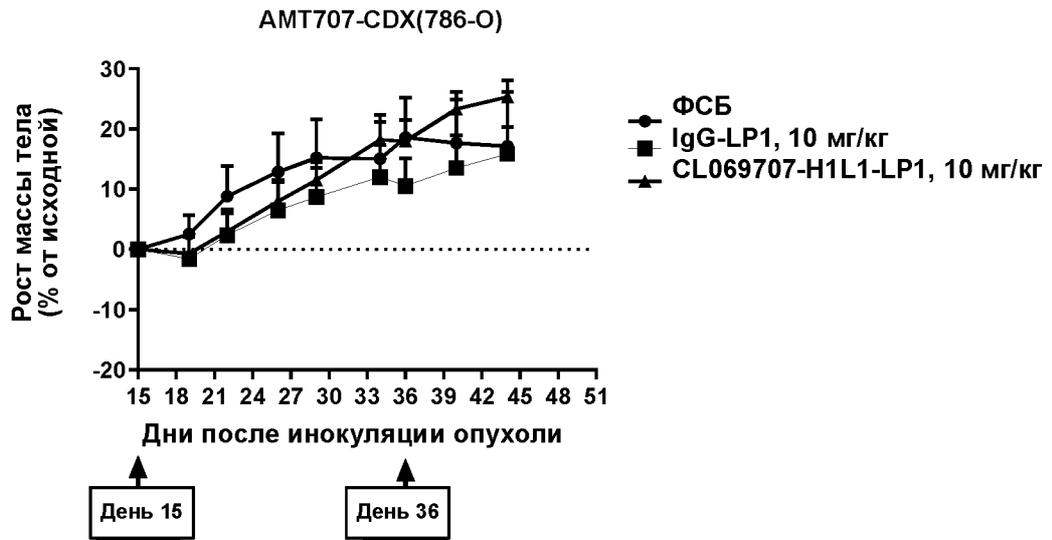
Фиг. 19А



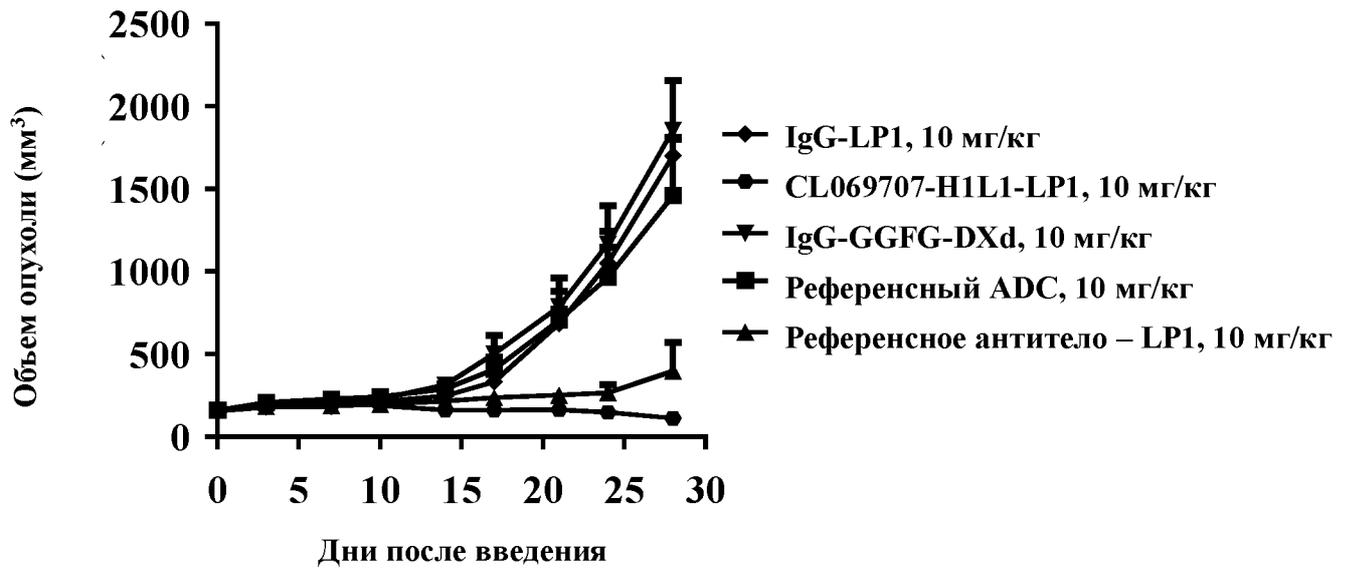
Фиг. 19В



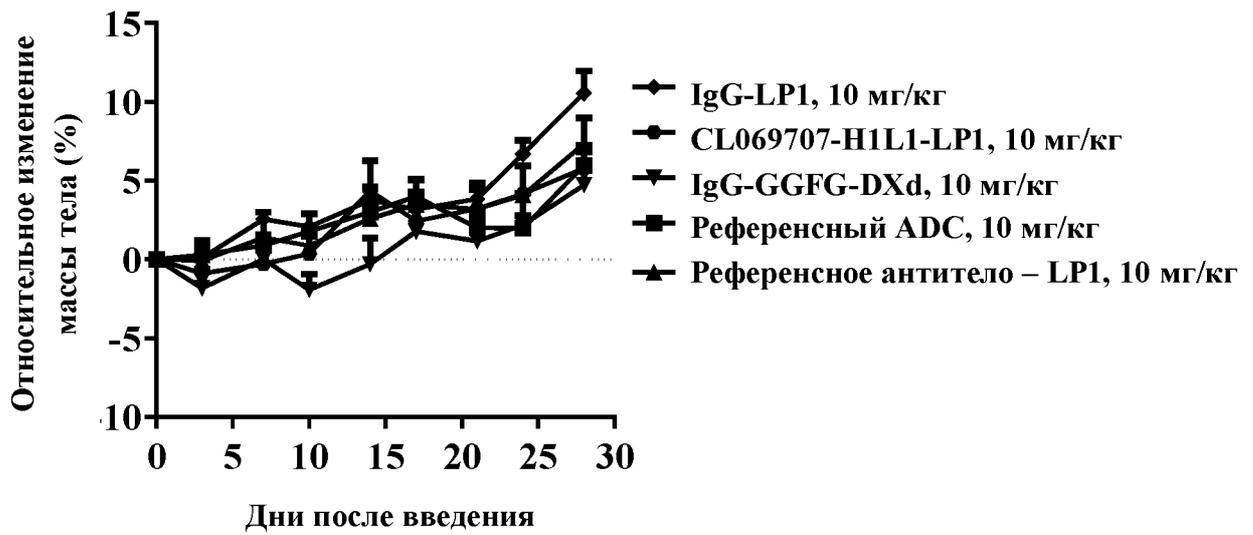
Фиг. 20А



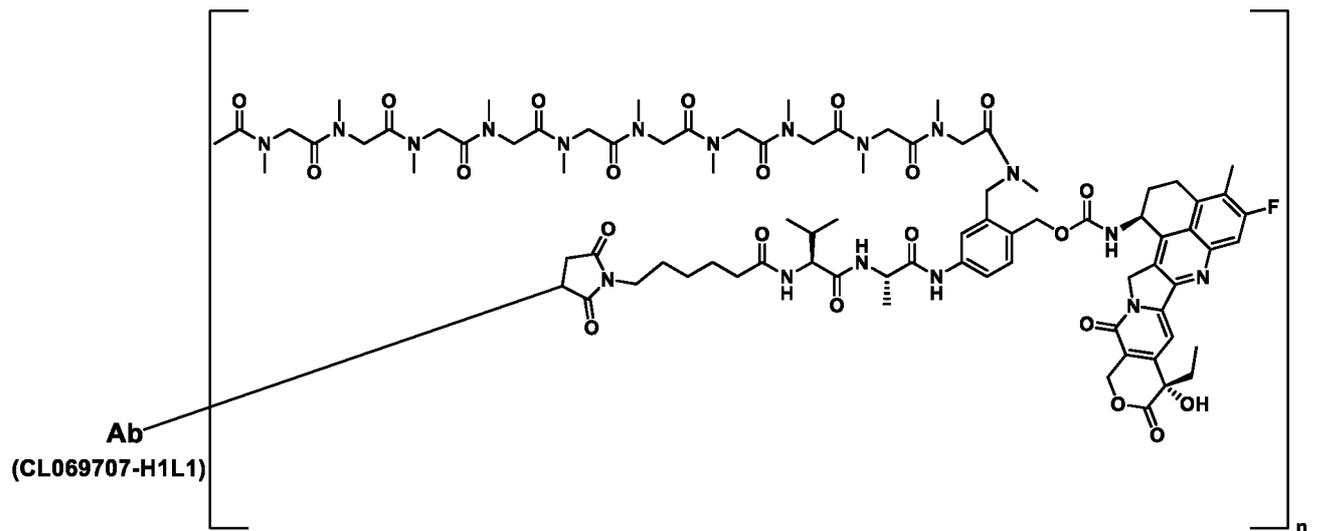
Фиг. 20В



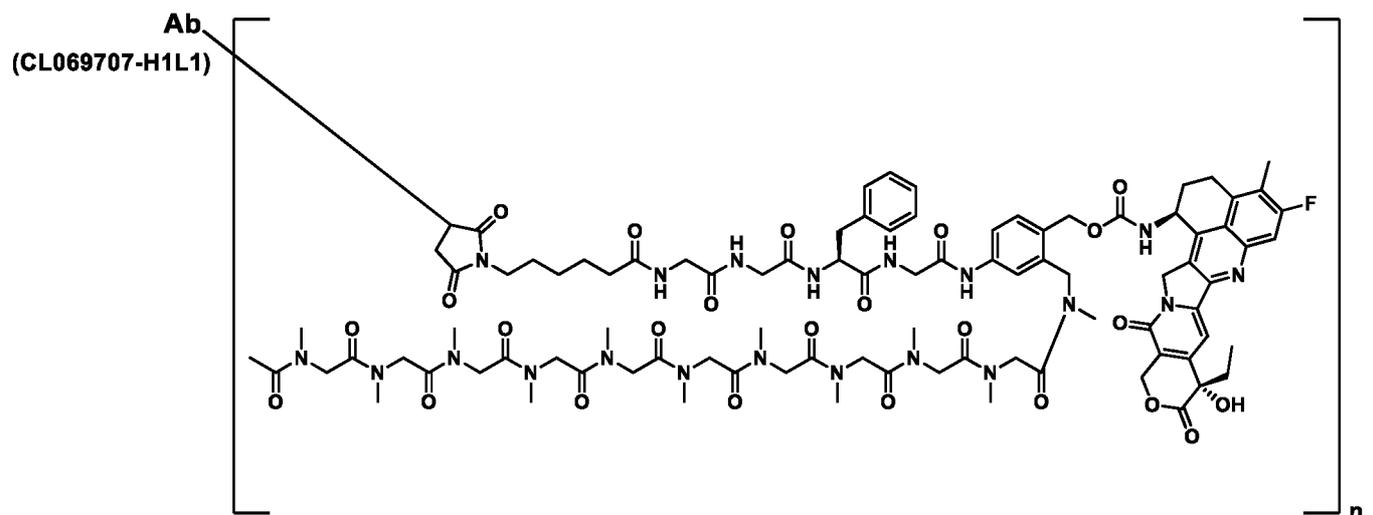
Фиг. 21А



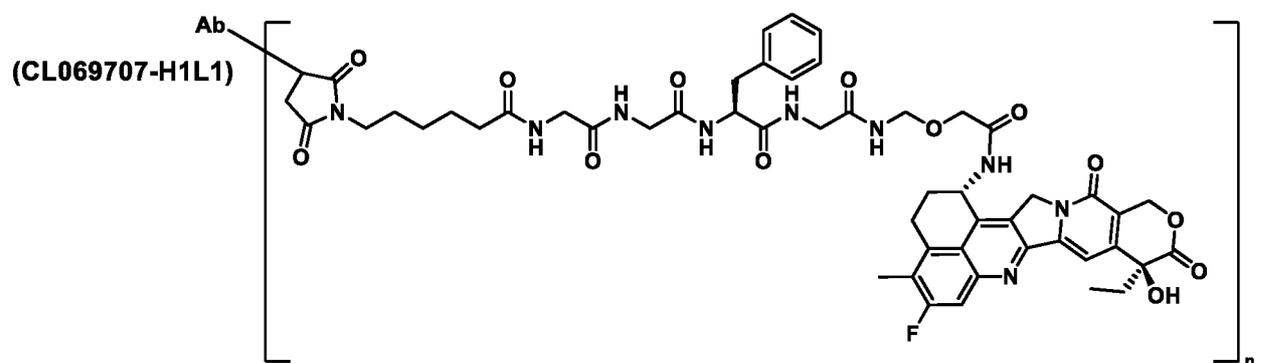
Фиг. 21В



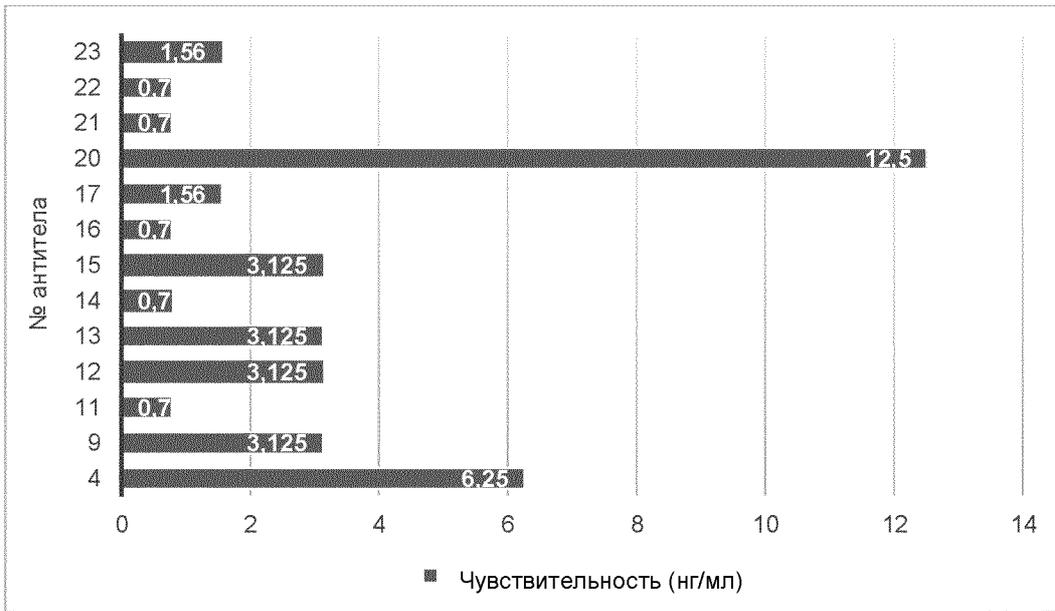
Фиг. 22А



Фиг. 22В



Фиг. 22С



Фиг. 23



Фиг. 24.