

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202491487** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2024.07.24

(22) Дата подачи заявки
2022.12.03

(51) Int. Cl. *C07K 16/28* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(54) **КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА МАВ11-22.1 К Tfr1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА**

(31) 17/542,948

(32) 2021.12.06

(33) US

(86) PCT/CN2022/136411

(87) WO 2023/103922 2023.06.15

(71) Заявитель:

**НОРСИСТ ФАРМАСЬЮТИКАЛ
ГРУП КО., ЛТД (CN)**

(72) Изобретатель:

Лу Мейсон, Ма Циньхун (US)

(74) Представитель:

Кузнецова С.А. (RU)

(57) В настоящем изобретении предусмотрено терапевтическое средство для лечения, предупреждения и диагностики видов рака, ассоциированных с клетками, которые сверхэкспрессируют рецептор 1 трансферрина (Tfr1) и его варианты на поверхности клеток, в том числе без ограничения AML, ALL, лимфомы, множественной миеломы, рака молочной железы, рака желудка, глиобластомы, рака предстательной железы, уротелиального рака мочевого пузыря, рака поджелудочной железы, рака пищевода, колоректального рака, рака яичников, рака печени. Средство основано на аминокислотных последовательностях новых вариабельных областей легкой цепи и тяжелой цепи моноклонального антитела (mAb) к Tfr1, MAb11-22.1, которое характеризуется высокой специфичностью в отношении опухолевых клеток и в форме ADC может функционально подавлять пролиферацию нескольких линий раковых клеток человека и рост ксенотрансплантатных опухолей, полученных из линий клеток AML, на мышинных моделях.

A1

202491487

202491487

A1

КОНЬЮГАТЫ АНТИТЕЛА МАВ11-22.1 К TFR1 ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ РАКА

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ, К КОТОРОЙ ОТНОСИТСЯ ИЗОБРЕТЕНИЕ

Настоящее изобретение относится к применению антител для связывания и модуляции интернализации и активности рецептора 1 трансферрина (TfR1) и его изоформ в раковых клетках человека. Настоящее изобретение также относится к антителу или его конъюгату с малой молекулой (продукт конъюгации антитела и лекарственного средства, ADC), применяемым для *in vitro*, *in situ* и/или *in vivo* диагностики и/или лечения клеток млекопитающих или патологических состояний, связанных с TfR1 и его изоформами.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Рецептор 1 трансферрина (TfR1, CD71) представляет собой трансмембранный гликопротеин II типа, состоящий из 760 аминокислот, которые связаны двумя дисульфидными связями с образованием гомодимера массой 180 кДа, который играет критическую роль в регуляции поглощения железа и клеточного роста (BOMFORD and MUNRO. *Hepatology*. 5:870-875, 1985). Когда дижелезистый трансферрин (Tf) связывается с TfR1 на поверхности клеток, комплекс голо-Tf-TfR1 интернализируется через покрытые клатрином углубления и доставляется в кислые эндосомы, где комплекс железо-Tf-TfR1 претерпевает конформационные изменения, вызванные низким pH, а железо впоследствии высвобождается и транспортируется в цитозоль. Комплекс апо-Tf/TfR1 затем возвращается обратно на поверхность клетки, при этом апо-Tf диссоциирует от рецептора (WARD. *Invest Radiol*. 22:74-83, 1987; DANIELS et al. *Clin Immunol*. 121:144-158, 2006). Экспрессия TfR1 увеличивается на быстро пролиферирующих клетках, таких как предшественники клеток крови, гепатоциты, кератиноциты, в которых железо крайне необходимо для синтеза гема, тогда как его экспрессия снижена или отсутствует на неделящихся клетках. TfR1 сверхэкспрессируется в первичных и метастатических раковых клетках, которые происходят от лимфоцитов, клеток поджелудочной железы, желудка, толстой кишки, легкого, молочной железы, мочевого пузыря и кожи (GATTER et al. *J Clin Pathol*. 36:539-545, 1983; FAULK et al. *Lancet*. 2:390-392, 1980; SUTHERLAND et al. *Proc Natl*

Acad Sci USA 78:4515-4519, 1981; DANIELS et al. Clin Immunol. 121:144-158, 2006; JEONG et al. Biochem Biophys Res Commun. 471:373-379, 2016; PEER et al. Nat Nanotechnol. 2:751-760, 2007; QIAN et al. Pharmacol Rev. 54:561-587, 2002; RICHARDSON et al. Biochim Biophys Acta Gen Subj. 1790:702-717, 2009). Поскольку раковые клетки, по-видимому, более чувствительны к нехватке железа, нацеливание на Tf или TfR1 путем блокирования их связывания или препятствования интернализации комплекса голо-Tf/TfR1 может вызвать нехватку железа и, таким образом, уничтожить злокачественные клетки.

За последние тридцать лет в литературе было описано множество попыток лечения злокачественных заболеваний путем разработки антител к TfR1 человека или TfR1-связывающих пептидов, которые будут конкурировать с Tf за связывание с рецептором или мешать его интернализации (обзоры см. в TORTORELLA and KARAGIANNIS. J Membr Biol. 247:291-307, 2014; CANDELARIA et al. Front. Immunol. 17 March 2021. doi.org/10.3389/fimmu.2021.607692). TROWBRIDGE и LOPEZ (Proc. Natl Acad Sci USA, 79, 1175-1179, 1982; патент США № 4434156) сообщают о мышинном антителе к TfR1, обозначенном 42/6, которое блокирует связывание Tf с TfR1 за счет неконкурентного механизма и способно подавлять рост линии лейкозных Т-клеток человека в S-фазе клеточного цикла *in vitro*. Хотя в ходе клинического исследования фазы Ia было обнаружено, что 42/6 хорошо переносится пациентами, вследствие его изотипа мышинного IgA оно индуцировало выработку человеческого антитела к мышинному антителу (HSMS) и быстро выводилось почками, что приводило к недостатку эффективности (BROOKS et al. Clin Cancer Res. 1:1259-1265, 1995). MOURA и соавт. (J Exp Med, 194, 417-425, 2001) сообщали о более эффективном нейтрализующем мышинном IgG2b антителе к TfR1 (A24), которое подавляет пролиферацию Т-клеток путем прямой конкуренции с Tf при связывании с TfR1 с высокой аффинностью ($K_D=2,7$ нМ), снижая экспрессию TfR и нарушая рециркуляцию TfR. В отличие от 42/6, которое проявляет свои антипролиферативные эффекты путем блокирования клеток в S-фазе клеточного цикла, A24 оказывает свое действие путем индуцирования апоптоза клеток-мишеней и блокирует *ex vivo* пролиферацию клеток Т-клеточного лейкоза/лимфомы взрослых (ATLL), острого миелоидного лейкоза (AML) и лимфомы из клеток мантийной зоны (MCL) (Moura et al. Blood. 103:1838-1845, 2004; CALLENS et al. Leukemia. 22:42-48, 2008; LEPelletier. Cancer Res. 67:1145-1154, 2007).

Чтобы преодолеть недостаток эффективности и индуцирование ответа с участием НАМА у людей, в последние годы разработали несколько химерных, гуманизированных или полностью человеческих антител. Например, мышино-человеческое IgG3 химерное антитело, ch128.1, демонстрирует противораковую активность *in vivo* на моделях ксенотрансплантатов (CLDX), полученных из линии клеток множественной миеломы человека (MM) и неходжкинской лимфомы, связанной со СПИДом (AIDS-NHL) (DANIELS. J Immunother. 34:500-508, 2011; DANIELS-WELLS. J Immunother. 38:307-310, 2015.), а его гуманизированная версия, hu128.1 (IgG1), также эффективна на CLDX-моделях AIDS-NHL (DANIELS-WELLS. Cancer Res. 80(16 Suppl):5655, 2020). Полагают, что противораковая активность ch128.1 и hu128.1 зависит от Fc-опосредованной антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC), комплементзависимой цитотоксичности (CDC) и антителозависимого клеточного фагоцитоза (ADCP). Были описаны три полностью человеческих нейтрализующих антитела изотипа IgG1. PPMX-T003 и H7-IgG1 блокировали рост опухоли и продлевали выживаемость мышей при использовании различных моделях лейкоза или лимфомы (SHIMOSAKI et al. Biochem Biophys Res Commun. 485:144-151, 2017; ZHANG et al. Cancer Res. 77(13 Suppl):5586, 2017). Еще более поразительно то, что антитело к TfR1, разработанное NAGAI и соавт. (Cancer Med. 3:108-1099, 2014), подавляет пролиферацию клеток плоскоклеточной карциномы полости рта (OSCC) как *in vitro*, так и *in vivo* (NEIVEYANS et al. MAbs. 11:593-605, 2019.), что позволяет предположить, что TfR1 можно применять для лечения солидных опухолей в дополнение к злокачественным новообразованиям из гемопоэтических клеток.

Вследствие профиля повсеместной экспрессии TfR1 на делящихся клетках антитела к TfR1 могут обладать универсальной антипролиферативной активностью, что не является допустимым для пациентов с раковыми заболеваниями. Для антител к TfR1 сообщалось токсичности со степенью от легкой до умеренной в отношении предшественников эритроцитов (RBC) и миелоидных клеток-предшественников на животных моделях (CANDELARIA et al. Front. Immunol. 17 March 2021). Хотя многие антитела к TfR1 человека, помимо 42/6, демонстрировали многообещающие доклинические результаты только CX-2029, продукт конъюгации антитела к TfR1 и лекарственного средства (ADC), вступил в клиническую стадию, и у него наблюдается дозозависимая гематологическая токсичность (анемия, нейтропения и лейкопения), что можно контролировать с помощью переливания RBC (эритроцитов) в клиническом

исследовании фазы I (JOHNSON et al. Clin Cancer Res. 27:4521-4530, 2021). Следовательно, существует потребность в антителах к TfR1, которые специфически нацеливаются на раковые клетки с минимальной перекрестной реакцией с нормальными клетками, для применения при лечении рака.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

mAb MAb11-22.1, моноклональное антитело (IgG1, каппа), продуцируемое одной из гибридом, полученных от мыши, иммунизированной несколькими линиями живых клеток острого миелолейкоза (AML), идентифицировали как специфическое mAb к TfR1 человека, экспрессируемому на клетках AML и других видах рака. Аффинность между mAb MAb11-22.1 и TfR1 очень высокая ($K_D < 1 \times 10^{-12}$ M). По результатам *in vitro* анализов показано, что mAb MAb11-22.1 оказывает небольшое подавляющий эффект на пролиферацию раковых клеток. Конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) в форме химерного Ab MAb11-22.1 с мертанзином («DM1»), N2'-деацетил-N2'-(3-меркапто-1-оксопропил)майтантином (MAb11-22.1-S239C-DM1), значительно подавлял рост опухоли ксенотрансплантата OCI/AML2 в исследовании *in vivo*.

Кодирующая последовательность варибельной области легкой цепи mAb MAb11-22.1 представлена под SEQ ID NO: 1 ниже.

1 gacattgtga tgacacagtc tccatcctcc ctgactgtga cagcaggaga 50

51 gaaggtcact atgagctgca agtccagtca gactctgtta aatagtggaa 100

101 atcaaaagaa ctacttgacc tggtagcagc agaaaccagg acagcctcct 150

151 aaactgttga tctactgggc atccacttgg gaatctaggg tcctgatca 200

201 cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc atcagcagtg 250

251 tgcaggctga agacctggca gtctattact gtcagaatga ttatagttat 300

301 cctctcacgt tcggtgctgg gaccaagctg gagctgaaac gggctgatgc 350

351 tgca (SEQ ID NO: 1)

Транслированная аминокислотная последовательность в варибельной области легкой цепи прогнозируется под SEQ ID NO: 2 ниже, а три области антигенных детерминант (CDR1-3, слева направо) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

IVMTQSPSSL TVTAGEKVTM SCKSSQSLLN SGNQKNYLTW YQQKPGQPPK
LLIYWASTWE SRVPDHFTGS GSGTDFTLTI SSVQAEDLAV YYCQNDYSYP
LTFGAGTKLE LKRADAA (SEQ ID NO: 2)

Кодирующая последовательность варибельной области тяжелой цепи mAb MAb11-22.1 представлена под SEQ ID NO: 3 ниже.

1 gaggtccagc tgcagcagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc 50
51 agtgaggatt tctgcaaga ctctggcta cacctcaca aactactata 100
101 tacactggat gaagcagagg cctggacagg gacttgagtg gattggatgg 150
151 atttactctg gagatggtaa ttctcattac aatgagaagt tcaagggcaa 200
201 gaccacactg actgcagaca aatcctccag cacaggctac atattgctca 250
251 gcagcctgac ctctgaagac tctgcagtct atttctgtac aagagattat 300
301 gataactacg ggggatttgc ttactggggc caagggactc tggctactgt 350
351 ctct (SEQ ID NO: 3)

Транслированная аминокислотная последовательность в варибельной области тяжелой цепи прогнозируется под SEQ ID NO: 4 ниже, а три области антигенных детерминант (CDR1-3, слева направо) выделены жирным шрифтом и подчеркнуты.

EVQLQQSGPE LVKPGASVRI SCKTSGYTFT NYIHWMKQR PGQGLEWIGWI
YPGDGNSHYN EKFKGKTTLT ADKSSSTGYI LLSSLTSEDS AVYFCTTRDYD
NYGGFAYWGQG TLVTVSA (SEQ ID NO: 4)

Настоящее изобретение относится к связывающим средствам (определение которых приведено ниже), в том числе антителам (определение которых приведено ниже), таким как моноклональные антитела и их фрагменты и производные, которые содержат одну или несколько областей CDR легкой цепи, которые на по меньшей мере 70% (например,

70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичны областям CDR Tfr1-специфического mAb, обозначенного MAb11-22.1; в том числе вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 2. Необязательно, вариабельная область тяжелой цепи связывающего средства на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентична SEQ ID NO: 4. Связывающее средство может содержать область, подобную CDR1 легкой цепи MAb11-22.1, на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности QSLNSGNQKNYLT (SEQ ID NO: 5). Связывающее средство может содержать область, подобную CDR2 легкой цепи MAb11-22.1, на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности WASTWESR (SEQ ID NO: 6). Связывающее средство может содержать область, подобную CDR3 легкой цепи MAb11-22.1, на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности QNDYSYPLT (SEQ ID NO: 7). Связывающее средство может содержать область, подобную CDR1 тяжелой цепи MAb11-22.1, на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности KTSGYTFTNYIИH (SEQ ID NO: 8). Связывающее средство может содержать область, подобную CDR2 тяжелой цепи MAb11-22.1, на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности WIYPGDGNSHYNEKFKG (SEQ ID NO: 9). Связывающее средство может содержать область, подобную CDR3 тяжелой цепи MAb11-22.1, на по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичную последовательности TRDYDNYGGFAY (SEQ ID NO: 10).

Настоящая заявка относится к лечению нескольких видов рака, которые сверхэкспрессируют Tfr1, с помощью MAb11-22.1 и связывающих средств (определение которых приведено ниже), родственных MAb11-22.1, в том числе связывающих средств, полученных из частей или характеризующихся по меньшей мере 70% (например, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 97%, 98% или 99%) идентичности с одной или несколькими последовательностями CDR легкой цепи и тяжелой цепи MAb11-22.1. MAb11-22.1 специфически связывается с белком Tfr1 человека с высокой аффинностью и индуцирует интернализацию данного белка.

Связывающие средства предпочтительно применяют в лечении связанных с опухолью заболеваний, в том числе первичных и метастатических видов рака, например, лейкоза, лимфомы, множественной миеломы, рака молочной железы, глиобластомы, рака предстательной железы, уротелиального рака мочевого пузыря, рака пищевода, колоректального рака, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака печени, видов рака желудка, в том числе плоскоклеточной карциномы желудка, аденокарциномы желудка, мелкоклеточной карциномы желудка, плоскоклеточной карциномы желудка, карциноидных опухолей желудка и видов рака желудка и двенадцатиперстной кишки.

Конъюгаты связывающего средства предпочтительно содержат противоопухолевое средство, например, цитотоксин, включая майтанзин или его производное, ауристин или его производное, эпотилон или его производное, паклитаксел или его производное, или соединение алкалоида барвинка; или дополнительно включая фосфат комбретастатина А-4, комбретастатин А-4 и его производные, индолсульфамидные соединения, соединения алкалоидов барвинка, такие как винбластин, винкристин, виндезин, винорелбин, винфлунин, винглицинат, ангидровинбластин, доластатин 10 и аналоги, галихондрин В и эрибулин, индол-3-оксалиламиды, замещенные индол-3-оксалиламиды, подофиллотоксины, 7-диэтиламино-3-(2'-бензоксазолил)кумарин (DBC), дискодермолид, лаулималид; ингибиторы ДНК-топоизомеразы, такие как камптотецин и его производные, митоксантрон; митогуазон; азотистые аналоги иприта, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, циклофосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мустин, нитромин, мелфалан, новембихин, фенамет, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урамустин; нитрозомочевины, такие как кармустин, стрептозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин, ранимустин; антибиотики, такие как энединовые антибиотики, динемидин, эсперамицин, неокарциностаин, аклациномицин, актиномицин, антроамицин, азасерин, блеомицины, актиномицин С, карабицин, идарубицин, карзинофилин, карминомицин, актиномицин D, даунорубицин, доксорубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, адриамицин, эпирубицин, эзорубицин, идарубицин, марцелломицин, митомицины, микофенольная кислота, ногаламицин, оливомицин, пепломицин, бофеймейсу, пурамицин, адриамицин-Fe, родорубицин, стрептонигрин, стрептозотин, туберцидин, убенимекс, зиностаин, зорубицин; аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметрексат, эдатрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, гемцитабин, эноксапарин, азацитидин, 6-

азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, дезоксифторуридин, фторуридин; андрогены, такие как калуостерон, пропионат дромостанолон, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; соединения, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; трихотецены, такие как токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангуидин; азиридины, такие как бензодопа, карбоквон, метуредопа и уредопа; аналоги платины, такие как цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, мириплатин, этопозид; антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; ингибиторы протеинкиназ и протеасом.

Связывающее средство предпочтительно связано с противоопухолевым средством с применением линкера. Связывание можно осуществлять так, как описано ниже для связывания мертанзина (DM1), т. е. с применением сайт-специфической конъюгации для конъюгирования тиоловой группы в связывающем средстве с противоопухолевым средством. Можно применять ряд других способов связывания.

В некоторых вариантах осуществления для связывания конъюгата можно применять линкеры, которые могут состоять из гибких остатков, таких как глицин и серин (при этом один пример представляет собой четыре остатка глицина, за которыми следует серин в повторе; или просто повторяющиеся остатки глицина), так чтобы смежные белковые домены свободно двигались друг относительно друга. Если необходимо сохранить расстояние между доменами для того, чтобы они не могли взаимодействовать, предпочтительны жесткие линкеры; при этом одним примером являются (повторяющиеся) глутаминовая кислота, три остатка аланина, лизин. Другим жестким линкером являются (повторяющиеся) любой аминокислотный остаток и пролин. Линкеры могут быть либо нерасщепляемыми (например, тиоэфирными, SMCC-, PEG-линкерами), либо расщепляемыми линкерами, такими как дипептидные валин-цитруллин (Val-Cit, VC), трипептидные глутаминовая кислота-валин-цитруллин (Glu-Val-Cit, GVC) и дисульфидные линкеры. В патенте США № 9310373 «Molecular conjugate» раскрыт ряд гидразидтиоловых линкеров и получение конъюгатов с ними. В патенте США № 8518891 раскрыт линкер с аминоарилметильным или аминокетероарильным фрагментом. Также были описаны бифункциональные линкеры. См. патент США № 11040084.

Соответствующий диапазон доз и схемы введения доз можно экстраполировать на основе результатов экспериментов *in vivo* и *in vitro*, изложенных в данном документе.

Связывающие средства предпочтительно доставляют в фармацевтическом составе для терапии; и их также можно применять в диагностике, очистке или скрининге для выбора других связывающих средств.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один графический материал, выполненный в цвете. Копии публикации данного патента или заявки на патент с цветным(-и) графическим(-и) материалом(-ами) будут предоставлены Ведомством по запросу и после уплаты необходимого сбора.

На фиг. 1A-1C показано, что mAb MAb11-22.1 связывалось непосредственно с линиями клеток AML, но не с мононуклеарными клетками периферической крови здорового человека (PBMC).

На фиг. 1A проиллюстрировано, что mAb MAb11-22.1 взаимодействовало с девятью линиями клеток AML человека на поверхностях клеток, но не с PBMC человека в анализе сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) (левая панель). В данном анализе в качестве отрицательного контроля использовали Ab изотипического контроля (правая панель). Для обнаружения использовали меченное флуоресцеином антитело козы к IgG мыши AffiniPure, специфичное в отношении Fc γ -фрагмента (конъюгированное с FITC антитело к IgG Fc мыши, Jackson ImmunoResearch Laboratories) в разведении 1:800. Анализ проводили при 4°C. MFI: средняя интенсивность флуоресценции.

На фиг. 1B показаны фотографии результатов иммуноцитохимического (ICC) анализа mAb MAb11-22.1, связанного с поверхностью клеток NB4 или THP-1 (верхние панели), тогда как Ab изотипического контроля не окрашивало данные клетки (нижние панели). Клетки AML фиксировали на предметных стеклах с помощью Cytospin в 4% параформальдегиде. После удаления антигена клетки блокировали 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA) в PBST, а затем инкубировали с первичными антителами в течение одного часа с последующей инкубацией в течение одного часа с конъюгированным с пероксидазой антителом козы к IgG (подклассы 1+2a+2b+3) мыши AffiniPure, специфичным в отношении Fc γ -фрагмента (Jackson ImmunoResearch Laboratories), разведенным в соотношении 1:1000. Клетки окрашивали 3,3'-диаминобензидином (DAB) и докрашивали гематоксилином.

На фиг. 1С представлены результаты вестерн-блоттинга, показывающие, что mAb MAb11-22.1 гибридизовалось с полосой белка, присутствующей в цельноклеточных лизатах клеток ALL (Raji) и клеток AML (NB4, OCI/AML2 и THP-1). Этот нацеливающий белок характеризовался массой приблизительно 250 кДа в невосстанавливающих условиях (левая панель) или 110 кДа в восстанавливающих условиях (правая панель). В качестве отрицательного контроля использовали лизат клеток яичника китайского хомячка (CHO). В качестве контроля загрузки образца одновременно обнаруживали β -актин с помощью специфического mAb мыши. Для обнаружения использовали конъюгированное с пероксидазой антитело козы к IgG Fc μ мыши AffiniPure в разведении 1:10000.

На фиг. 2A-2D показана идентификация и подтверждение рецептора 1 трансферрина (TfR1) в качестве целевой молекулы для mAb MAb11-22.1.

На фиг. 2A представлена репрезентативная фотография результатов SDS-PAGE при окрашивании серебром образцов иммунопреципитации (IP), полученных в результате реакции mAb MAb11-22.1 с цельноклеточным лизатом AML. IP-образцы подвергали восстановлению и в равном количестве загружали на дорожки 1 и 2, а целевые полосы с массой примерно 110 кДа, как указано выше, вырезали для анализа методом LC-MS/MS. В качестве контроля восстановленные mAb MAb11-22.1 загружали в количестве 8 нг на дорожку 4. Полосы белка обнаруживали с помощью набора для окрашивания серебром ProteoSilver™ (MilliporeSigma) согласно протоколу производителя. MW: маркер молекулярной массы; HC: тяжелая цепь; LC: легкая цепь.

На фиг. 2B изображены результаты вестерн-блоттинга на образцах цельноклеточных лизатов ALL и AML в невосстанавливающих условиях, в анализе с одновременным зондированием с помощью mAb MAb11-22.1 и mAb к β -актину. На левую дорожку в качестве положительного контроля загружали рекомбинантно экспрессированный внеклеточный домен TfR1 (rTfR1-ECD, ACRO Biosciences) в количестве 1,2 мкг, а на две правые дорожки в качестве отрицательных контролей загружали лизат клеток CHO в двух концентрациях (1x и 2x). Для обнаружения использовали конъюгированное с пероксидазой антитело козы к IgG Fc μ мыши AffiniPure в разведении 1:20000.

На фиг. 2C показано подтверждение непосредственного взаимодействия между mAb MAb11-22.1 и внеклеточным доменом TfR1 по результатам анализа методом ELISA.

Планшет покрывали 0,1 мкг/мл очищенного rTfR1-ECD, содержащего C-концевую бх His-метку. В качестве положительного и отрицательного контроля соответственно использовали mAb мыши к бхHis и Ab изотипического контроля. Все первичные антитела использовали в 3-кратных последовательных разведениях с начальной концентрацией, составляющей 3 мкг/мл. Для обнаружения использовали конъюгированное с пероксидазой антитело козы к IgG Fc γ мыши AffiniPure в разведении 1:6000.

На фиг. 2D продемонстрированы результаты анализа методом FACS клеток CHO с рекомбинантной экспрессией слитого белка TfR1-GFP человека (rTfR1-GFP) на клеточной мембране или без нее. Клетки CHO не реагировали с mAb MAb11-22.1 № 1 или № 2 (две разные партии очистки) или с коммерчески доступным контрольным mAb к TfR1 человека (R&D systems). Однако после воссоздания TfR1 на клеточной мембране mAb MAb11-22.1 № 1, № 2 и контрольное mAb к TfR1 могли связываться с поверхностью клетки. mAb MAb11-22.1 характеризовалось более высокой аффинностью, чем контрольное mAb к TfR1. В качестве вторичного антитела использовали конъюгированное с R-фикоэритрином (R-PE) антитело козы к IgG (подклассы 1+2a+2b+3) мыши, специфичное к Fc γ -фрагменту, AffiniPure (Jackson ImmunoResearch Laboratories) в разведении 1:800.

На фиг. 3A-3C представлены выходные данные, полученные из системы ForteBio Octet[®] QK, показывающие аффинность и кинетику между mAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD.

На фиг. 3A представлены выровненные кривые сенсограмм, показывающие кривые ассоциации и диссоциации для связывания mAb MAb11-22.1 с 20 нМ rTfR1-ECD (левая панель) или 300 нМ Fab козы к антителу (H+L) мыши (положительный контроль, правая панель), полученные из необработанных данных с помощью программного обеспечения ForteBio. Система ForteBio Octet[®] QK была оснащена биосенсорами захвата Fc мыши (AMC) для иммобилизации 10 нМ или 50 нМ mAb MAb11-22.1. Продолжительность ключевых этапов была следующей: 60 с (с: секунда или сек.) исходный уровень в буфере для кинетического анализа, 450 с иммобилизация mAb MAb11-22.1, 120 с исходный уровень/промывка в буфере для кинетического анализа, 450 с ассоциация антигена, а затем 3000 с диссоциация только в буфере для кинетического анализа. Верхняя кривая: 10 нМ mAb; нижняя кривая: 50 нМ mAb.

На фиг. 3B показаны данные по кинетике связывания между mAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD с исходной концентрацией 20 нМ и при серийном разведении в 2,5 раза. Ассоциация происходила быстро, и в пределах периода наблюдения (3000 секунд) диссоциацию не обнаруживали.

На фиг. 3C показаны данные по кинетике связывания между mAb MAb11-22.1 и положительным контролем, а именно Fab козы к IgG (H+L) мыши в последовательных разведениях для проверки надежности оборудования.

На фиг. 4 представлены результаты конкурентного ELISA, из которых видно, что mAb MAb11-22.1 и трансферрин (Tf) связывались с различными сайтами на rTfR1-ECD. Планшет для ELISA покрывали 0,1 мкг/мл rTfR1-ECD и инкубировали с набором из пяти концентраций очищенного белка Tf (по оси X), по отдельности смешанных с семью концентрациями конъюгированного с HRP mAb MAb11-22.1 в четырехкратных серийных разведениях, начиная от 2 мкг/мл, плюс Tf отдельно в различных концентрациях. Конъюгированное с HRP mAb MAb11-22.1 связывалось с rTfR1-ECD дозозависимым образом, но не зависело от присутствия Tf. Данные представлены в виде значений среднего \pm стандартное отклонение (SD) двух повторностей образцов.

На фиг. 5A-5C представлены результаты анализа методом FACS для mAb MAb11-22.1, связывающихся с РВМС человека и клетками костного мозга (ВМ), полученными от здоровых взрослых, а также с клетками ВМ, полученными от пациентов с АМЛ.

На фиг. 5A показано, что mAb MAb11-22.1 не связывалось ни с нормальными РВМС человека (Stanford Blood Center), ни с нормальными клетками ВМ человека (Human Cells, Фремонт, Калифорния), независимо от концентраций mAb. Отрицательным контролем служило Ab изотипического контроля. mAb серийно разводили в восемь раз, начиная с 20 мкг/мл, и обнаруживали с помощью конъюгированного с FITC антитела к IgG Fc мыши, разведенного в соотношении 1:800.

На фиг. 5B показано, что mAb MAb11-22.1 связывалось с клетками ВМ, полученными от пациента с АМЛ, дозозависимым образом.

На фиг. 5C представлены диаграммы рассеяния для клеток РВМС и ВМ, окрашенных различными mAb. Пороговые значения для оценки положительности или отрицательности по маркеру, показаны как сплошные линии и делят график на четыре

квадранта. FITC-меченные mAb мыши к CD34 человека (MilteNY, Кэмбридж, Массачусетс), которые были специфичны в отношении гемопоэтических стволовых клеток, подтверждали присутствие стволовых клеток в образце BM (нижняя левая панель). mAb MAb11-22.1 и Ab изотипического контроля окрашивали небольшую часть клеток BM по причине липкости клеток BM.

На фиг. 5D показано, что эритроциты, присутствующие в кластерах клеток PBMC и BM, которые были окрашены посредством конъюгированного с PE mAb к CD233 человека (MilteNY), не вступали в реакцию с mAb MAb11-22.1 или Ab изотипического контроля.

На фиг. 5E показано, что эритроциты и эритробласты, присутствующие в кластерах клеток PBMC или BM, которые были окрашены посредством конъюгированного с PE антитела к CD235a человека (MilteNY), не вступали в реакцию с mAb MAb11-22.1 или Ab изотипического контроля.

На фиг. 6A-6C представлены результаты анализа интернализации mAb MAb11-22.1 с линиями раковых клеток.

На фиг. 6A приведены результаты сравнения интенсивности флуоресценции на поверхности клеток трех линий клеток лейкоза (OCI/AML2, NB4 и Raji), по отдельности окрашенных с помощью mAb MAb11-22.1, mAb мыши к CD20 человека или Ab изотипического контроля в различных условиях в анализе методом FACS. Клетки инкубировали с каждым mAb в течение часа при 4°C с последующей промывкой холодным PBS и инкубацией в культуральной среде при 4°C или 37°C. Окрашивание клеток осуществляли с помощью конъюгированного с FITC антитела к IgG Fc мыши через 30 минут, 1 час и 2 часа соответственно. При температуре 4°C mAb MAb11-22.1 дозозависимым образом связывалось с поверхностями двух линий клеток AML, но не с клетками Raji, и оно быстро интернализировалось после переноса в условия 37°C (левые панели). mAb к CD20, которое взаимодействовало с клетками Raji, но не с клетками AML, могло частично интернализироваться клетками Raji при температуре 37°C (средние панели). В качестве отрицательного контроля (правые панели) использовали Ab изотипического контроля, которое не связывалось ни с одной линией клеток.

На фиг. 6B представлены репрезентативные флуоресцентные фотографии связывания mAb MAb11-22.1 с линией клеток OCI/AML2 и интернализации этими клетками.

Клетки в двух повторностях инкубировали в 96-луночных культуральных планшетах с различными концентрациями CF488-меченного mAb MAb11-22.1 или CF488-меченного Ab изотипического контроля в культуральной среде DMEM в течение одного часа при 4°C, а затем промывали ледяным PBS для удаления mAb. Клетки в одном планшете ресуспендировали в ледяном PBS для фотографирования с применением флуоресцентного микроскопа Keyence с 400× увеличением, тогда как клетки в двух повторностях ресуспендировали в планшете в теплом SFM и инкубировали при 37°C в течение часа для обеспечения интернализации mAb. Конъюгированное с CF488 mAb MAb11-22.1 связывалось с поверхностью клеток OCI/AML2 при 4°C, но в основном интернализировалось после инкубации при 37°C в течение одного часа. В качестве контроля CF488-меченное mAb изотипического контроля не окрашивало клетки и не поглощалось клетками (правые панели). Снимки сделаны с одинаковыми настройками. Масштабные линейки указывают 100 мкм.

На фиг. 6С представлены репрезентативные фотографии, показывающие дозозависимое увеличение связывания и интернализации конъюгированного mAb CF488 MAb11-22.1 клетками MDA-MB-231. Протокол анализа был таким же, как на фиг. 6В, за исключением того, что использовали более высокую концентрацию mAb (5 мкг/мл). При 4°C конъюгированное с CF488 mAb MAb11-22.1 не только локализовалось на поверхности клеток MDA-MB-231, но также присутствовало внутри клеток, что указывает на высокую тенденцию интернализации конъюгированного с CF488 mAb MAb11-22.1 линией клеток MDA-MB-231. После инкубации при 37°C в течение одного часа большая часть конъюгированного с CF488 mAb MAb11-22.1 была интернализирована. CF488-меченное mAb-CF488 изотипического контроля не окрашивало клетки и не поглощалось клетками (правые панели). Снимки были сделаны при 400х увеличении с одинаковым временем экспозиции. Масштабные линейки указывают 100 мкм.

На фиг. 7 проиллюстрировано частичный подавляющий эффект mAb MAb11-22.1 на пролиферацию клеток OCI/AML2. Клетки (2×10^4 клеток/мл) культивировали в присутствии 100 мкг/мл mAb MAb11-22.1 или Ab изотипического контроля в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Выживаемость клеток, которую отражает поглощение при 450 нм (OD450), отслеживали каждые 24 часа путем 4-часовой

обработки посредством 10 мкл раствора ССК-8. Данные представляют среднее \pm SD образцов в трех повторностях. * $P < 0,05$.

На фиг. 8А и 8В представлены выходные данные, полученные из системы ForteBio Octet[®] QK, показывающие аффинность и кинетику между химерным Ab MAb11-22.1 (сAb) и rTfR1-ECD.

На фиг. 8А показана аппроксимация кривых ассоциации и диссоциации, а также таблица с данными кинетики связывания между сAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD при 2,5-кратных последовательных разведениях (50, 20, 8, 3,2 и 1,28 нМ). Система Octet QK была оснащена биосенсорами для захвата Fc человека (АНС) для иммобилизации 50 нМ или 10 нМ сAb MAb11-22.1. Продолжительность ключевых этапов была следующей: 60 с исходный уровень в буфере для кинетического анализа, 450 с иммобилизация сAb MAb11-22.1, 120 с исходный уровень/промывка в буфере для кинетического анализа, 450 с ассоциация антигена с иммобилизованным сAb MAb11-22.1, а затем 3600 с диссоциация только в буфере для кинетического анализа. Никакого затухания сигнала связывания не обнаруживали в течение времени, отведенного для диссоциации, поэтому KD сAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD составляла < 1 пМ.

На фиг. 8В представлена аппроксимация результатов кинетического анализа положительного контроля, представлявшего собой Fab козы к антителу (H+L) человека, с 3-кратными последовательными разведениями (300, 100, 33,3, 11,1 и 3,7 нМ) при связывании с 50 нМ сAb MAb11-22.1. Расчетная KD составляла 2,18 нМ.

На фиг. 9 представлены гистограммы, иллюстрирующие эффект сAb MAb11-22.1 с мутацией S239C или без нее, а также Ab изотипического контроля на пролиферацию различных линий раковых клеток в условиях *in vitro*. Линии клеток OCI/AML2, Raji, HCC38 и MDA-MB-231 в оптимизированных количествах культивировали с отдельными антителами в течение пяти дней, а затем анализировали с помощью анализа с применением ССК-8. Две дозы (100 и 300 мкг/мл) сAb MAb11-22.1 (заштрихованные столбцы) и сAb MAb11-22.1-S239C (серые столбцы) обрабатывали с помощью DM1, на что указывает символ «+» под осью X; на антитела без обработки DM1 указывают символы «-». Неконъюгированное Ab изотипического контроля (белые столбцы) отражало исходный уровень пролиферации каждой линии клеток. Данные представляют среднее \pm SD образцов в трех повторностях.

На фиг. 10 показана *in vivo* эффективность MAb11-22.1-S239C-DM1 в отношении опухолевого роста на мышинной модели с использованием ксенотрансплантата, полученного от линии клеток OCI/AML2 (CLDX). MAb11-22.1-S239C-DM1 вводили инъекцией во внутрибрюшинную полость (i. p.) в дозе 10 мг/кг (низкая доза, n=5) или 20 мг/кг (высокая доза, n=6) по схеме Q4 × 7 (Дни 0-24). Группе отрицательного контроля вводили обработанное с помощью DM1 Ab изотипического контроля (без мутации S239C) в дозе 20 мг/кг/Q4 × 7/i. p. (n=5). Объемы опухолей измеряли каждые четыре дня. На левой панели изображен объем опухоли отдельной мыши в каждой группе, а на правой панели приведены результаты сравнения среднего объема опухоли ± SD между различными группами. Начиная со дня 16 после четырехкратной обработки с помощью Ab, средний объем опухоли в группе с низкой дозой значительно отличался от объема опухоли в группе изотипического контроля с DM1 (* P < 0,05).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

Следует понимать, что, если из контекста явно не следует иное, формы единственного числа включают формы множественного числа. Моноклональные антитела иногда называют «mAb». Термины «связывающее средство» и «антитело» в единственном и множественном числе используются взаимозаменяемо.

Связывающие средства по настоящему изобретению включают MAb11-22.1-подобные или полученные из MAb11-22.1 антитела, фрагменты антител, слитые белки или полученный из антитела или модифицированный химерный антигенный рецептор (CAR), в том числе одноцепочечные вариабельные фрагменты (scFv), слитые с внутриклеточными сигнальными доменами, например, с дзета-цепью CD3 (CD3ζ). CAR предпочтительно экспрессируется в CAR-содержащих иммунных эффекторных клетках, в том числе без ограничения Т-клетках, НК-клетках и макрофагах.

Термин «связывающее(-ие) средство(-а)» включает антитело (оба взаимозаменяемо используются во множественном числе), которое представляет собой молекулу иммуноглобулина, способную связываться с целевым антигеном, таким как антиген на клетках рака желудка, через по меньшей мере один антигенраспознающий сайт, расположенный в вариабельной области молекулы иммуноглобулина. Используемый в данном документе термин «антитело» охватывает не только интактные (т. е. полноразмерные) поликлональные или моноклональные антитела, но также их

антигенсвязывающие фрагменты (такие как Fab, Fab', F(ab')₂, Fv, Fd, rIgG, одноцепочечные (scFv) или sc(Fv)₂, их мутанты, слитые белки, содержащие часть антитела, гуманизированные антитела, химерные антитела, диатела, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), однодоменные антигенсвязывающие (SDAB) молекулы, домен VH или VL или домен VHH и любую другую модифицированную конфигурацию молекулы иммуноглобулина, которая содержит антигенраспознающий сайт необходимой специфичности, в том числе варианты гликозилирования антител, варианты аминокислотной последовательности антител и ковалентно модифицированные антитела. Также включены конъюгаты антитела и лекарственного средства.

Антитело включает антитела любого класса, такого как IgD, IgE, IgG, IgA или IgM (или их подкласс), и антитело не обязательно должно принадлежать к какому-либо конкретному классу. В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелых цепей антитела, иммуноглобулины можно отнести к разным классам. Выделяют пять основных классов иммуноглобулинов: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из них могут быть дополнительно разделены на подклассы (изоотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2.

Антитела, описанные в данном документе, могут являться мышинными, крысиными, человеческими или любого другого происхождения (включая химерные или гуманизированные антитела, в том числе описанные в патенте США № 7317091B2, и в том числе такие антитела, которые получены посредством созревания аффинности). В некоторых примерах антитело содержит модифицированную константную область, такую как константная область, которая является иммунологически инертной, например, не запускает опосредованный комплементом лизис или не стимулирует антителозависимую клеточно-опосредованную цитотоксичность (ADCC). Активность ADCC можно оценить с применением способов, раскрытых в патенте США № 5500362.

Гуманизированные антитела относятся к формам отличным от человеческих (например, мышинных) антител, которые представляют собой специфические химерные иммуноглобулины, цепи иммуноглобулинов или их антигенсвязывающие фрагменты, которые содержат минимальную последовательность, полученную из отличного от человеческого иммуноглобулина. По большей части гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (антитело-реципиент), в которых

остатки из определяющей комплементарность области (CDR) реципиента заменены остатками из CDR от отличного от человека вида (антитела-донора), такого как мышь, крыса или кролик, характеризующиеся требуемой специфичностью, аффинностью и связывающей способностью. В некоторых случаях остатки каркасной области Fv (FR) иммуноглобулина человека заменены соответствующими отличными от человеческих остатками. Более того, гуманизированное антитело может содержать остатки, которые не встречаются ни в антителе-реципиенте, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасной области, но включены для дополнительного улучшения структуры и оптимизации характеристик антитела. В целом, гуманизированное антитело будет содержать практически все из по меньшей мере одного и, как правило, двух переменных доменов, в которых все или практически все из областей CDR соответствуют областям отличного от человеческого иммуноглобулина, а все или практически все из областей FR представляют собой области с консенсусной последовательностью иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также оптимально будет содержать по меньшей мере часть константной области или домена (Fc) иммуноглобулина, как правило, таковой иммуноглобулина человека. Антитела могут содержать модифицированные области Fc, как описано в WO 99/58572. Другие формы гуманизированных антител содержат одну или несколько CDR (одну, две, три, четыре, пять, шесть), которые изменены по сравнению с исходным антителом. Гуманизированные антитела также могут предусматривать созревание аффинности. См. Jones et al., *Nature*, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., *Nature*, 332:323-327 (1988); Verhoeven et al., *Science*, 239: 1534-1536 (1988).

В другом примере антитело, описанное в данном документе, представляет собой химерное антитело, которое может содержать константную область тяжелой цепи и константную область легкой цепи из человеческого антитела. См., например, Morrison et al. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 6851; Neuberger et al. (1984) *Nature* 312, 604; и Takeda et al. (1984) *Nature* 314:452. Химерные антитела относятся к антителам, содержащим переменную область или часть переменной области от первого вида и константную область от второго вида. Как правило, в данных химерных антителах переменная область как легкой, так и тяжелой цепей имитирует переменные области антител, полученных от одного вида млекопитающих (например, отличного от человека млекопитающего, такого как мышь, кролик и крыса), тогда как константные части гомологичны последовательностям антител, полученных от другого

млекопитающего, такого как человек. В некоторых вариантах осуществления аминокислотные модификации могут быть произведены в вариабельной области и/или константной области. См. патент США № 4816567.

«Процент идентичности» двух аминокислотных последовательностей можно определить арифметически путем подсчета и сравнения для более коротких последовательностей, описанных или заявленных в данном документе или с применением алгоритма Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-68, 1990, модифицированного по Karlin and Altschul Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-77, 1993. Такой алгоритм включен в программы NBLAST и XBLAST (версии 2.0) Altschul et al. J. Mol. Biol. 215:403-10, 1990. Поиски белков BLAST можно выполнять с помощью программы XBLAST, балл = 50, длина слова = 3, с получением аминокислотных последовательностей, гомологичных представляющим интерес молекулам белка. Если между двумя последовательностями существуют гэпы, можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al, Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402, 1997. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно применять параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

Получение связывающих средств

Был разработан ряд методологий получения химерных, гуманизированных или человеческих антител для терапевтического применения *in vivo* на людях. Наиболее применяемый метод заключается в получении мышиных mAb с применением метода гибридомы, а затем в гуманизации mAb путем преобразования каркасных областей доменов VH и VL и константных доменов mAb в гомологичные человеческие каркасные области человеческих доменов VH и VL и константные области необходимого изотипа и подкласса γ -иммуноглобулина человека. См. патент США № 5225539.

Моноклональные антитела можно получить с помощью традиционной гибридомной технологии. Kohler et al., Nature, 256:495 (1975). В гибридном способе мышь или другое подходящее животное-хозяин, такое как хомяк или кролик, иммунизируют так, как описано выше, чтобы индуцировать образование лимфоцитов, которые продуцируют или способны продуцировать антитела, которые будут специфически

связываться с белком, применяемым для иммунизации. В качестве альтернативы лимфоциты можно иммунизировать *in vitro*.

Для получения моноклональных антител иммунные клетки собирают у млекопитающего, иммунизированного антигеном, и проверяют их на повышенный уровень требуемых антител в сыворотке крови, как описано выше, а также подвергают слиянию клеток. Иммунные клетки, применяемые для слияния клеток, предпочтительно получают из селезенки. К другим предпочтительным исходным клеткам, подлежащим слиянию с указанным выше иммуноцитом, относятся, например, клетки миеломы млекопитающих и более предпочтительно клетки миеломы, характеризующиеся приобретенным свойством для отбора слитых клеток с помощью лекарственных средств.

Предпочтительными клетками миеломы являются клетки, которые эффективно сливаются, поддерживают стабильный высокий уровень продукции антител выбранными антитело-продуцирующими клетками и чувствительны к такой среде, как среда НАТ. Среди них предпочтительными линиями клеток миеломы являются линии мышинной миеломы, такие как линии, полученные из опухолей мышей МОРС-21 и МРС-11, доступные из Центра распределения клеток Института Солка, Сан-Диего, Калифорния, США, и клетки SP-2, доступные из Коллекции американских типовых культур, Роквилл, Мэриленд, США. Также были описаны линии клеток миеломы человека и гетеромиеломы мыши-человека для продуцирования моноклональных антител человека (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Вышеуказанные иммуноциты и клетки миеломы можно слить согласно известным способам, например, способу Milstein и соавт. (Galfre et al., Methods Enzymol. 73:3-46, 1981). Лимфоциты сливают с клетками миеломы с применением подходящего средства для слияния, такого как полиэтиленгликоль, с образованием клетки гибридомы (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Итоговые гибридомы, полученные путем слияния клеток, можно отбирать путем их культивирования в стандартной среде для отбора, такой как среда НАТ (среда, содержащая гипоксантин, аминоптерин и тимидин). Культивирование клеток, как правило, продолжают в среде НАТ в течение периода от нескольких дней до

нескольких недель, этого времени достаточно для того, чтобы дать погибнуть всем остальным клеткам (неслитым клеткам), за исключением требуемой гибридомы. Затем проводят стандартное предельное разведение для скрининга и клонирования клетки гибридомы, продуцирующей требуемое антитело.

Полученные таким образом клетки гибридомы высевают и выращивают в подходящей культуральной среде, которая предпочтительно содержит одно или несколько веществ, подавляющих рост или выживание неслитых исходных клеток миеломы. Например, если в исходных клетках миеломы отсутствует фермент гипоксантингуанинфосфорибозилтрансфераза (HGPRT или HPRT), культуральная среда для гибридом, как правило, будет включать гипоксантин, аминоптерин и тимидин (среда HAT), эти вещества предотвращают рост клеток с дефицитом по HGPRT. Культуральную среду, в которой растут клетки гибридомы, анализируют на продуцирование моноклональных антител, направленных против антигена. Предпочтительно специфичность связывания моноклональных антител, продуцируемых клетками гибридомы, определяют посредством иммунопреципитации или анализа связывания *in vitro*. Для измерения антигенсвязывающей активности антитела можно использовать измерение поглощения с помощью твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), иммуноферментного анализа (EIA), радиоиммуноанализа (RIA) и/или иммунофлуоресценции.

После идентификации клеток гибридомы, которые продуцируют антитела с требуемой специфичностью, аффинностью и/или активностью, клоны можно субклонировать посредством процедур предельного разведения и выращивать стандартными способами (Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Подходящие для данной цели культуральные среды включают, например, среду D-MEM или RPMI-1640. Моноклональные антитела, секретируемые субклонами, подходящим образом отделяют от культуральной среды, асцитной жидкости или сыворотки крови с помощью стандартных процедур очистки иммуноглобулинов, таких как, например, сефароза с белком А, хроматография на гидроксилпатите, гель-электрофорез, диализ или аффинная хроматография. Кроме того, клетки гибридомы можно выращивать *in vivo* в виде асцитных опухолей у животного, например, в брюшной полости мыши.

Полученные моноклональные антитела можно очистить, например, с помощью осаждения сульфатом аммония, колонки с белком А или белком G, ионообменной хроматографии с DEAE или аффинной колонки, с которой связывается белок по настоящему изобретению.

Полученные таким образом моноклональные антитела также можно получить рекомбинантным методом с применением методик генной инженерии (см., например, *Borrebaeck C. A. K. and Larrick J. W. Therapeutic Monoclonal Antibodies*, опубликованную в Великобритании издательством MacMillan Publishers LTD, 1990). ДНК, кодирующую антитело, можно клонировать из иммунной клетки, такой как гибридома или иммунизированный лимфоцит, продуцирующий антитело, вставить в соответствующий вектор и ввести в клетки-хозяева с получением рекомбинантного антитела. Рекомбинантные методики описаны в литературе, в частности, в *Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL*, второе издание, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, и третье издание, 2001; *Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY*, John Wiley & Sons, New York, 1987 и периодические обновления; серию *METHODS IN ENZYMOLOGY*, Academic Press, San Diego; и *Kontermann and Dübel, ANTIBODY ENGINEERING*, Springer Lab manual, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001) и т. п.

Если полученное антитело необходимо вводить людям при лечении, для снижения иммуногенности предпочтительным является человеческое антитело или гуманизированное антитело. Например, трансгенные животные, имеющие репертуар генов человеческих антител, можно иммунизировать цельной клеткой или антигеном(-ами), выбранным(-и) из белков клеток человека, или их лизатами. Затем у животных собирают продуцирующие антитела клетки и сливают их с клетками миеломы с получением гибридом, из которых можно получить человеческие антитела к антигену. В качестве альтернативы иммунную клетку, такую как иммунизированный лимфоцит, продуцирующую антитела, можно иммортализовать онкогеном и применять для получения моноклональных антител.

ДНК, кодирующую моноклональные антитела, можно легко выделить и секвенировать с применением традиционных процедур (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые способны специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи мышиных антител). Предпочтительным

источником такой cDNA служат клетки гибридомы. После выделения ДНК можно поместить в векторы экспрессии, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки COS обезьяны, клетки яичника китайского хомячка (CHO) или клетки миеломы, которые в ином случае не продуцируют белок иммуноглобулина, чтобы продуцировать моноклональные антитела в рекомбинантных клетках-хозяевах. Обзорные статьи по рекомбинантной экспрессии в бактериях ДНК, кодирующей антитело, включают Skerra et al., *Curr. Opinion in Immunol.*, 5:256-262 (1993), и Pluckthun, *Immunol. Rev.*, 130: 151-188 (1992).

Молекулы ДНК, кодирующие антитела, продуцируемые описанными выше клетками гибридомы, можно генетически модифицировать с помощью стандартной технологии с получением генетически сконструированных антител. Генетически сконструированные антитела, такие как гуманизированные антитела, химерные антитела, одноцепочечные антитела, диатела, биспецифические антитела и полиспецифические антитела, можно получить, например, посредством традиционной рекомбинантной технологии. Затем ДНК можно модифицировать, например, путем замены кодирующей последовательностью константных доменов тяжелой и легкой цепи человека гомологичных мышинных последовательностей, Morrison et al., (1984) *Proc. Nat. Acad. Sci.* 81:6851, или путем ковалентного присоединения к последовательности, кодирующей иммуноглобулин, всей или части последовательности, кодирующей отличный от иммуноглобулина полипептид. Таким образом можно получить генетически сконструированные антитела, в том числе химерные или гуманизированные антитела, которые характеризуются специфичностью связывания целевого антигена.

В качестве альтернативы определенные трансгенные животные (например, мыши) после иммунизации способны продуцировать полный репертуар человеческих антител в отсутствие продуцирования эндогенного иммуноглобулина. Например, было описано, что гомозиготная делеция гена соединяющей области тяжелой цепи антитела (J_H) у химерных и мутантных по зародышевой линии мышей приводит к полному подавлению продуцирования эндогенных антител. Перенос массива генов иммуноглобулина зародышевой линии человека в таких мутантных по зародышевой линии мышам будет приводить к продуцированию антител человека после воздействия антигеном. См., например, Jakobovits et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., *Nature*, 362:255-258 (1993); Bruggermann et al., *Year in Immuno.*, 7:33

(1993). См. также Xenomouse от Amgen, Inc. (Фремонт, Калифорния) и HuMAb-MouseR™ и TC Mouse™ от Medarex, Inc. (Принстон, Нью-Джерси). В другой альтернативе антитела можно получить рекомбинантным методом с помощью технологии фагового дисплея. См, например, патент США №№ 5565332, 5580717, 5733743 и 6265150; и Winter et al., (1994) Annu. Rev. Immunol. 12:433-455; (Hoogenboom et al., J. Mol. Biol., 227:381 (1991); Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991). В качестве альтернативы технологию фагового дисплея (McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-553) можно применять для получения человеческих антител и фрагментов антител *in vitro* из репертуаров генов вариабельного (V) домена иммуноглобулина от неиммунизированных доноров.

F(ab')₂-фрагменты можно получить путем расщепления пепсином или расщепления другим протеолитическим ферментом интактных антител (см., например, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107-117 (1992) и Brennan et al., Science 229: 81 (1985)). Fab-фрагменты можно получить путем восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагментов. Теперь такие фрагменты также могут продуцироваться непосредственно рекомбинантными клетками-хозяевами. Например, фрагменты антител можно выделить из фаговой библиотеки антител. В качестве альтернативы F(ab')₂-SH-фрагменты можно непосредственно выделить из *E. coli* и соединить химическим путем с получением F(ab')₂-фрагментов (Carter et al., Bio/Technology 10: 163-167 (1992)). Согласно другому подходу, F(ab')₂-фрагменты можно выделить непосредственно из культуры рекомбинантных клеток-хозяев.

В патенте США № 5932448 раскрыто получение биспецифических антител с Fab'-частями, соединенными лейциновой застежкой; в патенте США № 7538196 раскрыто получение биспецифических антител, части которых соединены линкером; в патенте США № 8148496 раскрыта полиспецифическая конструкция Fv-антитела, содержащая по меньшей мере четыре вариабельных домена, которые соединены друг с другом посредством пептидных линкеров.

В публикации заявки на патент США № 20170335281 описано получение генетически модифицированных Т-клеток, экспрессирующих CAR, который содержит антигенсвязывающий домен, который связывается с ассоциированным с раком антигеном. Те же самые общие методики можно применять для модификации Т-клеток или других иммунных эффекторных клеток для экспрессии одной или нескольких из

CDR1, CDR2 и CDR3 MAb11-22.1 в качестве антигенсвязывающего домена для лечения рака. Антигенсвязывающий домен молекулы полипептида CAR может включать любое антитело, фрагмент антитела, scFv, Fv, Fab, (Fab')₂, однодоменное антитело (SDAB), домен VH или VL или домен VHH.

Молекулы однодоменных антител (sdAb) раскрыты в WO 9404678 и у Hamers-Casterman, C. et al. (1993) Nature 363:446-448. Молекула sdAb представляет собой встречающуюся в природе однодоменную антигенсвязывающую молекулу, известную как тяжелая цепь, лишенная легких цепей. В одном типе sdAb вариабельный домен получен из молекулы тяжелой цепи, естественным образом лишенной легкой цепи, которая может быть получена от видов Camelidae, например, от верблюда, ламы, дромадера, альпаки и гуанако. Другие виды, помимо Camelidae, также могут продуцировать молекулы тяжелой цепи, естественным образом лишенные легкой цепи. Молекулы sdAb могут быть рекомбинантными, с привитыми CDR, гуманизированными, камелизированными, деиммунизированными и/или созданными *in vitro* (например, отобранными с помощью фагового дисплея).

В конъюгате антитела и лекарственного средства (ADC), которое нацелено на раковые клетки, можно применять любое из вышеуказанных связывающих средств путем связывания его с цитотоксином для раковых клеток. См. патент США № 9764041, публикацию заявки на патент США № 20170151343.

Высокоаффинные варианты антител

Антитела с вариациями последовательностей, изложенными в данном документе, входят в объем настоящего изобретения. Одним типом варианта является высокоаффинный вариант, который изложен ниже.

Антитела должны быть гуманизированными с сохранением высокой аффинности в отношении антигена и других благоприятных биологических свойств. Для достижения данной цели согласно предпочтительному способу гуманизированные антитела получают с помощью способа анализа исходных последовательностей и различных концептуальных гуманизированных продуктов с применением трехмерных моделей исходных и гуманизированных последовательностей. Трехмерные модели иммуноглобулинов являются общедоступными. Доступны компьютерные программы, которые иллюстрируют и отображают вероятные трехмерные конформационные

структуры выбранных кандидатных последовательностей иммуноглобулинов. Проверка данных визуальных отображений позволяет проанализировать вероятную роль остатков в функционировании кандидатной последовательности иммуноглобулина, т. е. проанализировать остатки, которые влияют на способность кандидатного иммуноглобулина связывать свой антиген. Таким образом, можно отобрать и объединить остатки FR из реципиентных и импортируемых последовательностей таким образом, чтобы достигалась требуемая характеристика антитела, такая как повышенная аффинность в отношении целевого(-ых) антигена(-ов).

Примеры остатков каркасной области для модификации включают остатки, которые непосредственно нековалентно связываются с целевой молекулой (Amit et al. Science 233: 747-753 (1986)); взаимодействуют с конформацией CDR/влияют ее на конформацию (Chothia et al. J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987)) и/или принимают участие в поверхности контакта VL-VH (EP 239 400 B1). В определенных вариантах осуществления модификация одного или нескольких таких остатков каркасной области приводит к усилению аффинности связывания антитела с представляющей интерес целевой молекулой.

Молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие варианты аминокислотной последовательности, получают посредством ряда способов, которые известны из уровня техники. Такие способы включают без ограничения опосредованный (или сайт-направленный) мутагенез, мутагенез методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) и кассетный мутагенез ранее полученного варианта или отличной от варианта версии видозависимого антитела. Предпочтительным способом получения вариантов является опосредованный олигонуклеотидами синтез. В определенных вариантах осуществления вариант антитела будет содержать только замену одного остатка в гипервариабельной области, например, от приблизительно двух до приблизительно пятнадцати замен в гипервариабельной области.

Одним из способов получения библиотеки вариантов является опосредованный олигонуклеотидами синтез. Можно синтезировать три олигонуклеотида длиной примерно 100 нуклеотидов каждый, охватывающие всю вариабельную область легкой цепи или тяжелой цепи. Каждый олигонуклеотид может содержать следующее: (1) участок из 60 аминокислот, образованный триплетом $(NNK)_{20}$, где N представляет собой любой нуклеотид, а K представляет собой G или T, и (2) примерно 15-30

нуклеотидов, перекрывающихся либо со следующим олигонуклеотидом, либо с последовательностью вектора на каждом конце. После отжига этих трех олигонуклеотидов в ПЦР-реакции полимеразы будет заполнять противоположную нить, образуя полную двухнитевую последовательность вариабельной области тяжелой цепи или легкой цепи. Число триплетов можно откорректировать до любой длины повторов, а их положение в пределах олигонуклеотида может выбрать таким образом, чтобы заменить аминокислоты только в заданной CDR или каркасной области. При применении (NNK) в каждом положении кодируемых вариантов можно использовать все двадцать аминокислот. Перекрывающаяся последовательность из 5-10 аминокислот (15-30 нуклеотидов) не будет заменена, но она может быть выбрана такой, чтобы она попадала в упаковывающиеся области каркаса, или может быть заменена в ходе отдельного или последующего раунда синтеза. Способы синтеза олигонуклеотидов хорошо известны из уровня техники, а также коммерчески доступны. Способы получения вариантов антител из данных олигонуклеотидов также хорошо известны из уровня техники, например, ПЦР.

Библиотеку вариантов тяжелой и легкой цепей, отличающихся случайными положениями в своей последовательности, можно сконструировать в любом векторе экспрессии, таком как бактериофаг, каждый из которых содержит ДНК, кодирующую конкретный вариант тяжелой и легкой цепи.

После получения вариантов антител определяют биологическую активность варианта в сравнении с исходным антителом. Как отмечалось выше, это предусматривает определение аффинности связывания варианта с целевой молекулой. Существует множество высокопроизводительных способов для быстрого скрининга вариантов антител на предмет их способности связываться с представляющей интерес целевой молекулой.

Один или несколько вариантов антител, отобранных в результате данного первоначального скрининга, затем можно подвергнуть скринингу в отношении повышенной аффинности связывания по сравнению с исходным антителом. Одним распространенным способом определения аффинности связывания является оценка констант скорости ассоциации и диссоциации с применением системы поверхностного плазмонного резонанса BIAcore (BIAcore, Inc.). Биосенсорный чип активируют для ковалентного связывания целевой молекулы в соответствии с инструкциями

производителя (BIAcore). Затем целевую молекулу разводят и вводят инъекцией поверх чипа для получения сигнала в единицах ответа (RU) иммобилизованного материала. Поскольку сигнал в RU пропорционален массе иммобилизованного материала, он отражает диапазон плотностей иммобилизованных целевых молекул на матрице. Данные по диссоциации соответствуют односайтовой модели для получения $K_{off} \pm S.D.$ (стандартное отклонение измерений). Константу скорости кажущегося первого порядка (K_s) рассчитывают для каждой кривой ассоциации и наносят на график в виде зависимости от концентрации белка с получением $K_{on} \pm S.D.$ (стандартная ошибка аппроксимации). Равновесные константы диссоциации для связывания, K_d , рассчитывают по результатам измерений SPR как K_{off}/K_{on} . Поскольку равновесная константа диссоциации, K_D , обратно пропорциональна K_{off} , оценку улучшения аффинности можно произвести, предполагая, что скорость ассоциации (K_{on}) является постоянной для всех вариантов.

Полученный(-ые) кандидат(-ы) с высокой аффинностью необязательно может(-гут) быть подвергнут(-ы) одному или нескольким дополнительным анализам биологической активности для подтверждения того, что вариант(-ы) антитела с повышенной аффинностью связывания все еще сохраняет(-ют) требуемые терапевтические свойства, что можно протестировать в анализах, которые описаны ниже в примерах. Оптимальный вариант антитела сохраняет способность связывать целевую молекулу со значительно более высокой аффинностью связывания, чем исходное антитело.

Выбранный(-ые) таким образом вариант(-ы) антитела зачастую может(-гут) быть подвергнут(-ы) дополнительным модификациям в зависимости от предполагаемого применения антитела. Такие модификации могут предусматривать дополнительное изменение аминокислотной последовательности, слияние с гетерологичным(-ыми) полипептидом(-ами) и/или ковалентные модификации, такие как конкретизированные ниже. Например, любые остатки цистеина, не участвующие в поддержании надлежащей конформации варианта антитела, можно заменить обычно на серин для того, чтобы улучшить устойчивость молекулы к окислению и предупредить неправильное сшивание. И наоборот, цистеиновую(-ые) связь(-и) можно добавить в антитело для улучшения его стабильности (в частности, когда антитело представляет собой фрагмент антитела, такой как Fv-фрагмент).

Составы

После получения подходящего антитела его можно приготовить в виде состава для введения субъекту. Лиофилизированный состав является предпочтительным, при этом в качестве первого этапа требуется приготовление предварительного состава для лиофилизации. Количество антитела в предварительном составе для лиофилизации определяют с учетом требуемых объемов доз, способа(-ов) введения и т. д. Белок обычно присутствует в растворе. Например, белок может присутствовать в рН-буферном растворе при рН приблизительно 4-8 и предпочтительно приблизительно 5-7. Иллюстративные буферы включают гистидин, фосфат, трис, цитрат, сукцинат и другие органические кислоты. Концентрация буфера может составлять от приблизительно 1 мМ до приблизительно 20 мМ или от приблизительно 3 мМ до приблизительно 15 мМ, в зависимости, например, от буфера и требуемой изотоничности состава (например, восстановленного состава). Предпочтительным буфером является гистидин, поскольку он может характеризоваться лиопротекторными свойствами. Также применимым буфером является сукцинат.

Лиопротектор добавляют к предварительному составу для лиофилизации. В предпочтительных вариантах осуществления лиопротектор представляет собой невосстанавливающийся сахар, такой как сахароза или трегалоза. Количество лиопротектора в предварительном составе для лиофилизации обычно таково, что после восстановления полученный состав будет изотоническим, что предпочтительно, хотя подходящими также могут быть и гипертонические восстановленные составы. Кроме того, количество лиопротектора не должно быть слишком низким, таким, что после лиофилизации возникает неприемлемое количество деградации/агрегации белка.

Если лиопротектор представляет собой сахар (такой как сахароза или трегалоза), а белок представляет собой антитело, иллюстративные концентрации лиопротектора в предварительном составе для лиофилизации составляют от приблизительно 10 мМ до приблизительно 400 мМ, и предпочтительно от приблизительно 30 мМ до приблизительно 300 мМ, и наиболее предпочтительно от приблизительно 50 мМ до приблизительно 100 мМ.

Соотношение белка и лиопротектора подбирают для каждой комбинации белка и лиопротектора. В случае антитела в качестве предпочтительного белка и сахара

(например, сахарозы или трегалозы) в качестве лиопротектора для получения изотонического восстановленного состава с высокой концентрацией белка молярное соотношение лиопротектора и антитела может составлять от приблизительно 100 до приблизительно 1500 молей лиопротектора на 1 моль антитела и предпочтительно от приблизительно 200 до приблизительно 1000 молей лиопротектора на 1 моль антитела, в том числе от приблизительно 200 до приблизительно 600 молей лиопротектора на 1 моль антитела.

Было обнаружено, что в предпочтительных вариантах осуществления к предварительному составу для лиофилизации желательно добавлять поверхностно-активное вещество. В качестве альтернативы или дополнения поверхностно-активное вещество можно добавлять к лиофилизированному составу и/или восстановленному составу. Иллюстративные поверхностно-активные вещества включают неионогенные поверхностно-активные вещества, такие как полисорбаты (например, полисорбаты 20 или 80), полуксамеры (например, полуксамер 188), Triton, додецилсульфат натрия (SDS), лаурилсульфат натрия, октилгликозид натрия, лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсульфобетаин, лаурил-, миристил-, линолеил- или стеарилсаркозин, линолеил-, миристил- или цетилбетаин, лауроамидопропил-, кокамидопропил-, линоламидопропил-, миристамидопропил-, палнидопропил- или изостеарамидопропилбетаин (например, лауроамидопропил), миристамидопропил-, пальмидопропил- или изостеарамидопропилдиметиламин, натрийметилкокоил- или динатрийметилолеилтаурат, а также серия MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Патерсон, Нью-Джерси), полиэтиленгликоль, полипропиленгликоль и сополимеры этилена и пропиленгликоля (например, плуроники, PF68 и т. д.). Количество добавляемого поверхностно-активного вещества таково, что оно снижает агрегацию восстановленного белка и минимизирует образование частиц после восстановления. Например, поверхностно-активное вещество может присутствовать в предварительном составе для лиофилизации в количестве приблизительно 0,001-0,5% и предпочтительно приблизительно 0,005-0,05%.

При получении предварительного состава для лиофилизации можно применять смесь лиопротектора (такого как сахароза или трегалоза) и объемообразующего средства (например, маннита или глицина). Объемообразующее средство может обеспечивать получение однородной лиофилизированной массы без чрезмерных полостей в ней.

Другие фармацевтически приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы, такие как описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980), могут быть включены в предварительный состав для лиофилизации (и/или лиофилизированный состав, и/или восстановленный состав) при условии, что они не оказывают неблагоприятного воздействия на требуемые характеристики состава. Приемлемые носители, вспомогательные вещества или стабилизаторы не токсичны для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и включают дополнительные буферные средства, консерванты, соразтворители, антиоксиданты, в том числе аскорбиновую кислоту и метионин, хелатирующие средства, такие как EDTA, комплексы металлов (например, комплексы Zn и белков), биоразлагаемые полимеры, такие как сложные полиэфиры, и/или солеобразующие противоионы, такие как натрий.

Фармацевтические композиции и составы, описанные в данном документе, предпочтительно являются стабильными, так что они сохраняют свою физическую и химическую стабильность и целостность при хранении. Из уровня техники доступны различные аналитические методики измерения стабильности белков, и они рассмотрены в Peptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee Ed., Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y., Pubs. (1991) и Jones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993). Стабильность можно измерить при выбранной температуре в течение выбранного периода времени.

Составы, подлежащие применению для введения *in vivo*, должны быть стерильными. Это легко достигается путем фильтрации через мембраны для стерилизующей фильтрации до или после лиофилизации и восстановления. В качестве альтернативы стерильности всей смеси можно достичь автоклавированием ингредиентов, за исключением белка, при температуре приблизительно 120°C в течение приблизительно 30 минут.

После смешивания вместе белка, лиопротектора и других необязательных компонентов состав лиофилизируют. Для этой цели доступны различные сублимационные сушилки, такие как Hull50[®] (Hull, США) или GT20[®] (Leybold-Heraeus, Германия). Сублимационную сушку осуществляют путем замораживания состава и последующей сублимации льда из замороженного содержимого при температуре, подходящей для первичной сушки. При данном условии температура продукта находится ниже эвтектической точки или температуры разрушения состава.

Как правило, температура полки для первичной сушки будет находиться в диапазоне от приблизительно -30 до 25°C (при условии, что продукт остается замороженным во время первичной сушки) при подходящем давлении, как правило, находящемся в диапазоне от приблизительно 50 до 250 мТорр. Состав, размер и тип контейнера, содержащего образец (например, стеклянного флакона), а также объем жидкости в основном будут определять время, необходимое для сушки, которое может находиться в диапазоне от нескольких часов до нескольких дней (например, 40-60 часов). Вторичную стадию сушки можно осуществлять при температуре приблизительно 0 - 40°C , в зависимости, прежде всего, от типа и размера контейнера и типа используемого белка. Например, температура полки на протяжении всей фазы удаления воды при лиофилизации может составлять приблизительно 15 - 30°C (например, приблизительно 20°C). Время и давление, необходимые для вторичной сушки, будут такими, которые позволяют получить подходящую лиофилизированную массу, и зависят, например, от температуры и других параметров. Время вторичной сушки определяется требуемым уровнем остаточной влаги в продукте и, как правило, занимает по меньшей мере приблизительно 5 часов (например, 10-15 часов). Давление может быть таким же, которое используется в ходе этапа первичной сушки. Условия сублимационной сушки могут варьироваться в зависимости от состава и размера флакона.

В некоторых случаях, чтобы избежать этапа переноса, лиофилизация белкового состава может быть желательна в контейнере, в котором будет проводиться восстановление белка. Контейнером в данном случае может быть, например, флакон объемом 3, 5, 10, 20, 50 или 100 см^3 . В качестве общего плана, лиофилизация будет приводить к получению лиофилизованного состава, содержание влаги в котором составляет менее приблизительно 5% и предпочтительно менее приблизительно 3%.

На требуемой стадии, как правило, когда наступает время введения белка пациенту, лиофилизированный состав можно восстановить разбавителем, так что концентрация белка в восстановленном составе предпочтительно была аналогична концентрации белка в предварительном составе для лиофилизации.

Восстановление обычно происходит при температуре приблизительно 25°C для обеспечения полной гидратации, хотя при необходимости можно использовать и другие температуры. Время, необходимое для восстановления, будет зависеть, например, от типа разбавителя, количества вспомогательного(-ых) вещества(веществ) и

белка. Иллюстративные разбавители включают стерильную воду, бактериостатическую воду для инъекции (BWFI), pH-забуференный раствор (например, фосфатно-солевой буфер), стерильный солевой раствор, раствор Рингера или раствор декстрозы. Разбавитель необязательно содержит консервант. Иллюстративные консерванты были описаны выше, при этом предпочтительными консервантами являются ароматические спирты, такие как бензиловый или феноловый спирт. Количество используемого консерванта определяют путем оценки различных концентраций консерванта на совместимость с белком и тестирования эффективности консерванта. Например, если консервант представляет собой ароматический спирт (такой как бензиловый спирт), он может присутствовать в количестве приблизительно 0,1-2,0% и предпочтительно приблизительно 0,5-1,5%, но наиболее предпочтительно приблизительно 1,0-1,2%.

В качестве альтернативы можно применять нелиофилизированный состав, включающий связывающее средство и любое из хорошо известных носителей, вспомогательных веществ, буферов, стабилизаторов, консервантов, адъювантов и других добавок, описанных в данном документе и хорошо известных из уровня техники.

Дозировки и способ введения

Описанный выше состав можно вводить субъекту (например, человеку), нуждающемуся в лечении, подходящим путем, таким как внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, интрацереброспинальный, подкожный, внутрикожный, внутрисуставной, внутрисиновиальный, интратекальный, интрадермальный, внутриопухолевый, интранодальный, интрамедуллярный, пероральный, ингаляционный или местный пути, или его можно вводить перорально, с помощью ингаляционного спрея, местно, ректально, назально, трансбуккально, вагинально или через имплантированный резервуар, и в любом случае в виде болуса или путем непрерывной инфузии на протяжении определенного периода времени, или путем введения инъекционных депо-препаратов, таких как с применением 1-, 3- или 6-месячных инъекционных или биоразлагаемых материалов и способов.

Коммерчески доступные небулайзеры для жидких составов, в том числе струйные небулайзеры и ультразвуковые небулайзеры, являются применимыми для введения. Жидкие составы можно распылять непосредственно, а лиофилизированный порошок

можно распылять после восстановления. В качестве альтернативы антитела можно превращать в аэрозоль с применением фторуглеродного состава и дозирующего ингалятора или вводить путем ингаляции в виде лиофилизированного и измельченного порошка. Если в настоящем изобретении используется CAR, композиции с иммунными эффекторными клетками (например, Т-клетками, НК-клетками) можно вводить инъекцией непосредственно в опухоль, лимфатический узел, или участок инфекции, или в другое место.

Субъектом, подлежащим лечению с помощью способов, описанных в данном документе, может быть млекопитающее, более предпочтительно человек. Млекопитающие включают без ограничения сельскохозяйственных животных, спортивных животных, домашних животных, приматов, лошадей, собак, кошек, мышей и крыс.

«Эффективное количество» относится к количеству активного средства, необходимому для оказания терапевтического эффекта на субъекта, либо отдельно, либо в комбинации с одним или несколькими другими активными средствами. Эффективные количества варьируются в зависимости от конкретного состояния, подлежащего лечению, тяжести состояния, индивидуальных параметров пациента, в том числе возраста, физического состояния, размера, пола и веса, продолжительности лечения, природы сопутствующей терапии (если таковая имеется), конкретного пути введения и подобных факторов, все из которых хорошо известны специалистам средней квалификации в данной области техники и могут быть разрешены с помощью проведения не более чем стандартных исследований. Обычно предпочтительно применять максимальную дозу отдельных компонентов или их комбинаций, то есть наиболее высокую безопасную дозу с медицинской точки зрения. Также по медицинским причинам, психологическим причинам или другим причинам подходит более низкая доза или переносимая доза.

В определение дозировки обычно будут вносить вклад эмпирические соображения, такие как период полужизни антитела. Например, для продления периода полужизни антитела и предупреждения атаки на антитела иммунной системы хозяина можно применять антитела, совместимые с иммунной системой человека, такие как гуманизированные антитела или полностью человеческие антитела. Частоту введения можно определить и скорректировать на протяжении курса терапии, и обычно, но необязательно, она основана на лечении, и/или подавлении, и/или уменьшении

интенсивности, и/или замедлении развития рака желудка. В качестве альтернативы могут подходить составы на основе антител с замедленным непрерывным высвобождением. Из уровня техники известны различные составы и устройства для достижения замедленного высвобождения.

В одном примере дозировки антитела, описанного в данном документе, можно определить эмпирически у индивидуумов, которые получили одно или несколько введений антитела. Индивидуумы получают возрастающие дозы антитела. Для оценки эффективности антитела можно отслеживать показатель заболевания (например, рост опухоли) в соответствии со стандартной практикой.

В целом для введения любого из антител, описанных в данном документе, первоначальную возможную дозу можно экстраполировать из результатов экспериментов, описанных ниже. При повторных введениях на протяжении нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет требуемое подавление симптомов, или до тех пор, пока не будут достигнуты достаточные терапевтические уровни для облегчения рака. Иллюстративная схема введения доз предусматривает введение начальной более высокой дозы с последующим введением более низкой поддерживающей дозы. Однако могут быть применимы и другие схемы приема доз, в зависимости от характера фармакокинетического распада, которого хочет достичь врач. Например, предусматривается введение доз от одного до четырех раз в неделю. В некоторых вариантах осуществления частота введения доз составляет один раз в неделю, каждые 2 недели, каждые 4 недели, каждые 5 недель, каждые 6 недель, каждые 7 недель, каждые 8 недель, каждые 9 недель, или каждые 10 недель, или один раз в месяц, каждые 2 месяца, или каждые 3 месяца, или дольше. Ход данной терапии легко отслеживать с помощью традиционных методик и анализов. Схема введения доз (в том числе применяемых антител) может меняться со временем.

Для введения фармацевтической композиции субъекту можно применять традиционные способы, известные специалистам средней квалификации в области медицины, в зависимости от цели лечения и локализации рака.

Вводимые инъекцией композиции могут содержать различные носители, такие как растительные масла, диметилактаид, диметилформаид, этиллактат, этилкарбонат,

изопропилмиристат, этанол и полиолы (глицерин, пропиленгликоль, жидкий полиэтиленгликоль и т. п.).

При внутривенной инъекции водорастворимые антитела можно вводить капельным способом, при этом фармацевтический состав, содержащий антитело и физиологически приемлемые вспомогательные вещества, вводят инфузией. Физиологически приемлемые вспомогательные вещества могут включать, например, 5% раствор декстрозы, 0,9% солевой раствор, раствор Рингера или другие подходящие вспомогательные вещества.

Внутримышечные препараты, например стерильный состав подходящей растворимой солевой формы антитела, можно растворять и вводить в таком фармацевтическом вспомогательном веществе, как вода для инъекции, 0,9% солевой раствор или 5% раствор глюкозы.

В одном варианте осуществления антитело вводят с помощью методик сайт-специфической или нацеленной местной доставки. Примеры методик сайт-специфической или нацеленной местной доставки включают различные имплантируемые депо-источники антител или катетеры для местной доставки, такие как инфузионные катетеры, полостной катетер или игольчатый катетер, синтетические трансплантаты, адвентициальные повязки, шунты и стенты или другие имплантируемые устройства, сайт-специфические носители, прямую инъекцию или прямое нанесение. См., например, WO 00/53211 и патент США № 5981568,

В другом варианте осуществления настоящего изобретения предусмотрено готовое изделие, которое содержит любую из фармацевтических композиций и составов, описанных в данном документе (например, содержащих антитело или связывающее средство), и содержит инструкции по их применению и/или восстановлению. Готовое изделие содержит контейнер. Подходящие контейнеры включают, например, бутылки, флаконы (например, двухкамерные флаконы), шприцы (такие как двухкамерные шприцы) и пробирки. Контейнер может быть изготовлен из различных материалов, таких как стекло или пластик. Контейнер вмещает состав, а в этикетке на контейнере или связанной с ним могут быть указаны инструкции по восстановлению и/или применению. Например, на этикетке может быть указано, что состав восстанавливают до конкретных концентраций белка. Контейнер, вмещающий состав, может

представлять собой флакон для многоразового применения, который позволяет проводить повторные введения (например, от 2 до 6 введений) восстановленного состава. Готовое изделие может дополнительно содержать второй контейнер, содержащий подходящий разбавитель (например, BWFI). После смешивания разбавителя и лиофилизированного состава конечная концентрация белка в восстановленном составе обычно будет составлять по меньшей мере 50 мг/мл. Готовое изделие может дополнительно включать другие материалы, необходимые с коммерческой точки зрения и с точки зрения потребителя, в том числе другие буферы, разбавители, фильтры, иглы, шприцы и вкладыши с инструкциями по применению.

Примеры

Последующие примеры не являются ограничивающими, а являются лишь иллюстративными. Если не указано иное, все линии клеток были приобретены у Американской коллекции типовых культур (ATCC, Манассас, Вирджиния), а все вторичные антитела для обнаружения были приобретены у Jackson ImmunoResearch Laboratories (Вест-Гроув, Пенсильвания). Для работы с ДНК и РНК использовали стандартные способы, описанные в Sambrook et al., *Molecular Cloning: A laboratory manual*; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Если не указано иное, все коммерческие реагенты и наборы использовали в соответствии с инструкциями производителя.

Для исследования мишень-специфических антител для лечения рака авторы настоящего изобретения применяли технологию иммунизации живых клеток (LCI) и высокопроизводительного скрининга живых клеток (HTS) для получения антител, специфически нацеливающихся на поверхностные антигены опухолей человека, с последующей идентификацией целевых молекул с применением комбинации подходов протеомики и молекулярной биологии.

ПРИМЕР 1

Получение и изучение характеристик mAb MAb11-22.1, специфически нацеленных на линии клеток AML

Для получения mAb к конформационным эпитопам на антигенах поверхности клеток смесь из двух линий клеток AML человека, MV4-11 и THP-1, в фосфатно-солевом

буфере (PBS) для LCI и LC-HTS, как описано ранее (см: WO2014146487A1, WO2017114204, US20210139602A1; Li et al., PLoS One. 2013, 8:e77398). Надосадочные жидкости культуры гибридом подвергали скринингу в отношении взаимодействия со смесью данных двух живых линий клеток AML и подвергали параллельному скринингу с мононуклеарными клетками периферической крови человека (PBMC), полученными от здоровых взрослых доноров (Stanford Blood Center, Пало-Альто, Калифорния), в анализе сортировки флуоресцентно активированных клеток (FACS) с применением проточного цитометра BD FACSCalibur™ с высокопроизводительным пробоотборником (HTS), и данные анализировали с помощью программного обеспечения FlowJo™ (Becton Dickinson, Сан-Хосе, Калифорния). Колонии гибридом, у которых наблюдали сильную и специфическую активность связывания с линиями клеток AML человека, но не с PBMC человека, отбирали для размножения, вывода из кондиционированной среды и субклонирования в соответствии со стандартными протоколами (Kohler & Milstein, Nature 1975, 256:495-497; Winter & Milstein, Nature 1991, 349:293-299). Моноклональные антитела (mAb), продуцируемые данными колониями, очищали с применением смолы MabSelect™ SuRe™ LX с белком A (GE Healthcare, Мальборо, Массачусетс) для дополнительного изучения характеристик.

Для одного mAb, обозначенного как mAb MAb11-22.1, показана высокая способность связывания с почти всеми девятью протестированными линиями клеток AML человека, но не с PBMC человека (фиг. 1A, левая панель). Сигнал связывания с клетками NB4, подтипом M3 линии клеток AML, был особенно высоким, после чего шли линии клеток Kasumi-1 и HL-60. Чтобы гарантировать, что связывание не было опосредовано взаимодействием между mAb и Fc-рецепторами (FcR) на поверхности клеток AML, в анализах методом FACS использовали раствор, блокирующий Fc-рецепторы человека Human TruStain FcX™ (Biolegend, Сан-Диего, Калифорния). Поскольку mAb MAb11-22.1 относились к изотипу IgG1/каппа, как определено с помощью набора для изотипирования моноклональных антител мыши IsoStrip™ (Roche Molecular Systems, Плезантон, Калифорния), то в качестве отрицательного контроля использовали нерелевантное антитело мыши IgG1a/каппа, которое не взаимодействует с линиями клеток AML (Ab изотипического контроля, фиг. 1A, правая панель), для подтверждения того, что взаимодействие между mAb MAb11-22.1 и поверхностями клеток AML специфически опосредовалось вариабельными областями mAb MAb11-22.1.

Для визуализации связывания mAb MAb11-22.1 с поверхностью клеток AML проводили иммуногистохимические (ИСС) анализы связывания антител на поверхности клеток. Культивируемые клетки AML фиксировали на предметных стеклах с помощью Cytospin 4 (Thermo Fisher Scientific, Уолтем, Массачусетс) в 4% параформальдегиде. После удаления антигена путем нагревания клетки блокировали сывороткой крови козы (MilliporeSigma, Сент-Луис, Миссури), а затем инкубировали с mAb MAb11-22.1 или Ab изотипического контроля в течение одного часа с последующей инкубацией на протяжении одного часа с конъюгированным с пероксидазой антителом козы к IgG (подклассы 1+2a+2b+3) мыши AffiniPure, разведенным в соотношении 1:1000, специфичным в отношении Fc γ -фрагмента (конъюгированное с HRPpAb к IgG Fc мыши, Jackson ImmunoResearch Laboratories). Клетки окрашивали 3,3'-диаминобензидином (DAB) и докрасивали гематоксилином. Как показано на фиг. 1B, результаты ИСС-анализов подтверждали, что целевая молекула для mAb MAb11-22.1 локализовалась на поверхности клеток NB4 и THP-1. Интенсивность окрашивания DAB на поверхности клеток NB4 была намного выше, чем на поверхности клеток THP-1, что коррелирует со значениями средней интенсивности флуоресценции (MFI) в анализах методом FACS (фиг. 1A, левая панель).

Более того, вестерн-блоттинг нескольких лизатов клеток AML с одновременным зондированием посредством 5 мкг/мл каждого из mAb MAb11-22.1 и mAb мыши к β -актину человека/мыши (mAb к β -актину, Proteintech Group, Роузмонт, Иллинойс) с последующим обнаружением с помощью конъюгированного с HRP pAb к IgG Fc мыши в разведении 1:20000 показал общую полосу массой примерно 250 кДа в невозстанавливающих условиях и слабую полосу массой примерно 110 кДа в восстанавливающих условиях (фиг. 1C). В цельноклеточном лизате Raji, линии клеток острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), также показаны блоты в тех же положениях, хотя и с низкими значениями интенсивности. Напротив, mAb MAb11-22.1 не смогло обнаружить никакой полосы в клетках яичника китайского хомячка (CHO) (фиг. 1C) или лизате клеток РВМС человека (данные не представлены) в ходе вестерн-блоттинга. Значения относительной интенсивности этих полос гибридного белка в клетках AML соответствовали MFI в анализах методом FACS (фиг. 1A) и значениям интенсивности ИСС-окрашивания (фиг. 1B), что указывает на то, что данный белок может быть целевой молекулой для mAb MAb11-22.1.

ПРИМЕР 2

Идентификация и проверка рецептора 1 трансферрина человека (TfR1) в качестве целевой молекулы для mAb MAb11-22.1

Лизаты клеток AML получали с применением лизирующего буфера для IP (Thermo Fisher Scientific) согласно инструкциям производителя. Микроносители Dynabead™ с белком А для иммунопреципитации (Thermo Fisher Scientific) инкубировали с 50 мкг mAb MAb11-22.1 или Ab изотипического контроля в PBS при комнатной температуре (RT) в течение 30 минут. Связанные с антителом микроносители Dynabead™ промывали и инкубировали с каждым лизатом клеток при RT в течение 30 минут, а затем последовательно промывали посредством 0,5% TritonX-100/PBS и PBS-буфера. Подвергнутый(-ые) иммунопреципитации (IP) белок(белки) и антитело отделяли от микроносителей с помощью 4 × денатурирующего образцы буфера Лэммли с 2-меркаптоэтанолом и нагревали до 95°C в течение пяти минут. Белки разделяли с помощью электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и обнаруживали с помощью набора для окрашивания серебром ProteoSilver™ (MilliporeSigma) согласно протоколу производителя. При окрашивании серебром выявили единственную белковую полосу в IP-образце с той же молекулярной массой, которую выявили в вестерн-блоттинге (фиг. 2А). Полосы вырезали из геля и расщепляли трипсином. В жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (LC-MS/MS), проведенной BGI Americas Corporation (Кембридж, Массачусетс), идентифицировали TfR1 как наиболее распространенный белок в вырезанном участке геля (#PSM = 32, покрытие = 29,6%).

Чтобы подтвердить TfR1 в качестве целевой молекулы для mAb MAb11-22.1, внеклеточный домен рекомбинантно экспрессированного TfR1 человека с N-концевой His-меткой (rTfR1-ECD, ACRO Biosystems, Ньюарк, Дэлавер) вместе с образцами цельноклеточного лизата клеток AML и ALL (положительные контроли) и лизатами клеток CHO (отрицательный контроль) анализировали методом SDS-PAGE в невозстанавливающих условиях с последующим проведением вестерн-блоттинга с одновременным зондированием посредством 5 мкг/мл каждого из mAb MAb11-22.1 и mAb к β-актину в качестве первичных антител и конъюгированным HRP pAb к IgG Fc мыши в разведении 1:20000 (фиг. 2В). Результат показал, что mAb MAb11-22.1 могло обнаружить единственную полосу массой примерно 80 кДа, которая коррелировала с

расчетной молекулярной массой 77,0 кДа для rTfR1-ECD. Лизаты клеток Raji, NB4, OCI/AML2 и CHO показали согласованный результат в реакции с mAb MAb11-22.1, как показано на фиг. 1С.

Для проверки взаимодействия между mAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD проводили анализ методом прямого ELISA. Титрационные микропланшеты Immulon[®] (Thermo Fisher), покрытые с помощью 0,1 мкг/мл rTfR1-ECD, подвергали непосредственной реакции с mAb MAb11-22.1, моноклональным антителом к 6*His-метке (mAb к His, Proteintech) или Ab изотипического контроля в последовательных разведениях в течение одного часа при RT с последующим проведением реакции с конъюгированным с HRP pAb к IgG Fc мыши в разведении 1:2000 в течение одного часа. Добавляли субстрат 3,3',5,5'-тетраметилбензидин (TMB) и измеряли поглощение при длине волны 450 нм с применением микропланшетного ридера SpectraMax (Molecular Device, Сан-Хосе, Калифорния). На фиг. 2С проиллюстрировано прямое взаимодействие между 6His-меченным rTfR1-ECD с mAb MAb11-22.1 или mAb к His, но не с Ab изотипического контроля, что демонстрирует, что TfR1 был целевой молекулой для mAb MAb11-22.1.

Для дополнительного подтверждения того, что mAb MAb11-22.1 распознает TfR1 человека, TFRC, cDNA, кодирующую полноразмерный белок TfR1, амплифицировали из клеток OCI/AML2 и THP-1 с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (RT-PCR) с применением пары праймеров (SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12), заказанной у Integrated DNA Technologies (Коралвилл, Айова). cDNA сливали в рамке считывания с фрагментом ДНК, кодирующим GFP, на ее С-конце, а затем клонировали в вектор экспрессии собственной разработки, содержащий промотор CMV человека и ген устойчивости к пурамицину (PuroR) для отбора. Клетки CHO-DG44, которые не окрашивались посредством mAb MAb11-22.1 в FACS, трансфицировали с помощью экспрессионной плазмиды TFRC-GFP и выращивали в бессывороточной среде (SFM) EX-CELL[®] CD для клеток CHO, дополненной пурамицином. Колонии клеток CHO, стабильно экспрессирующие высокий уровень EGFP, выделяли и субклонировали. При 4°C клетки CHO/rTfR1-GFP окрашивали двумя партиями очищенного mAb MAb11-22.1, контрольным mAb к TfR1 человека (R&D Systems, Миннеаполис, Миннесота) и Ab изотипического контроля в течение 30 минут с последующим обнаружением с помощью конъюгированного с R-фикоэритрином (PE) антитела козы к IgG мыши (подклассы 1+2a+2b+3) AffiniPure, специфичным к Fcγ-фрагменту pAb (конъюгированное с PE антитело к IgG Fc мыши, Jackson

ImmunoResearch). Результат показал, что при гейтировании FL1 (GFP) клетки CHO/rTfR1-GFP окрашивались как mAb MAb11-22.1, так и контрольным mAb к TfR1, тогда как любое из данных антител не было способным связываться с клетками CHO без экспрессии rTfR-GFP на поверхности клетки (фиг. 2D). Значение IC_{50} у mAb MAb11-22.1 составляло 0,03-0,04 мкг/мл, что намного ниже, чем значение у контрольного mAb к TfR1, которое составляло примерно 0,1 мкг/мл. Окрашивание клеток CHO/rTfR-GFP с различными активными молекулами GFP посредством mAb MAb11-22.1 выявляло положительную корреляцию между значениями MFI-PE и значениями MFI-FITC (данные не представлены), что доказывает прямое взаимодействие между mAb MAb11-22.1 и внеклеточным доменом TfR1 человека.

Прямой праймер: 5'-GAATGATGGATCAAGCTAGATCAGC-3' (SEQ ID NO: 11)

Обратный праймер: 5'-CTCATGGAAGCTATGGGTATCAC-3' (SEQ ID NO: 12)

ПРИМЕР 3

Измерение аффинности связывания между mAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD

Для определения аффинности связывания между mAb MAb11-22.1 и внеклеточным доменом TfR1 применяли технологию биослойной интерферометрии (BLI) без использования меток с применением системы Octet[®] QK (Molecular Devices, Сан-Хосе, Калифорния). mAb MAb11-22.1 иммобилизовали на биосенсорах для захвата IgG Fc мыши (AMC) в течение 450 секунд и промывали буфером для кинетического анализа в течение 120 секунд с последующей 450-секундной ассоциацией, а затем диссоциацией rTfR1-ECD в последовательных разведениях в буфере для кинетического анализа. В качестве положительного контроля при связывании с mAb MAb11-22.1 использовали Fab козы к антителу (H+L) мыши (Jackson ImmunoResearch). Анализ повторяли несколько раз с применением различных концентраций rTfR1-ECD от 300 нМ до 0,08 нМ, полученных путем последовательного разведения, но затухания сигнала не наблюдали, даже если время диссоциации было увеличено до 60 минут (фиг. 3А, левая панель) или температура реакции была повышена до 37°C (данные не представлены). В результате этого, аффинность взаимодействия между mAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD была чрезвычайно высокой с расчетным значением $K_D < 1$ пМ (фиг. 3В). Связывание между mAb MAb11-22.1 и Fab к антителу (H+L) мыши показало нормальную кинетическую кривую (фиг. 3А, правая панель) и достаточно высокую аффинность (K_D

= 1,04-1,45 нМ) (фиг. 3С), что указывает на то, что чрезвычайно высокая аффинность между mAb MAb11-22.1 и rTfR1-ECD не была артефактом.

ПРИМЕР 4

ELISA с конкуренцией mAb MAb11-22.1 и трансферрина за связывание с TfR1 человека

Для определения того, связывается ли mAb MAb11-22.1 с TfR1 человека, который перекрывался сайтом связывания Tf, проводили конкурентный ELISA. mAb MAb11-22.1 метили непосредственно с помощью HRP с применением набора активированной малеимидом HRP EZ-Link (Thermo Fisher Scientific) в соответствии с инструкцией производителя. Титрационный микропланшет Immunlon покрывали с помощью 0,1 мкг/мл rTfR1-ECD и инкубировали в течение часа с HRP-конъюгированным mAb MAb11-22.1 в четырехкратных разведениях, начиная с 2 мкг/мл, которые по отдельности смешивали с Tf человека (MilliporeSigma) в 2,5-кратных последовательных разведениях, начиная с 2 мкг/мл. В качестве отрицательного контроля вносили различные концентрации Tf отдельно. После тщательной промывки вносили ТМВ для обнаружения связывания HRP-конъюгированного mAb MAb11-22.1. Поглощение при 450 нм измеряли с помощью микропланшетного ридера SpectraMax после добавления стоп-раствора.

На фиг. 4 проиллюстрировано дозозависимое связывание mAb-HRP MAb11-22.1 с rTfR1-ECD, которое не зависело от наличия Tf после различных концентраций. Добавление до 2 мкг/мл (25 мкМ) Tf значимо не препятствовало связыванию конъюгированного с HRP mAb MAb11-22.1 с rTfR1-ECD, что позволяет предположить, что сайт связывания Tf не перекрывается с эпитопами mAb MAb11-22.1.

ПРИМЕР 5

Анализ методом FACS связывания mAb MAb11-22.1 с PBMC и клетками костного мозга (BM)

Другие исследователи показали, что большинство антител к TfR1 препятствовали поглощению Tf и вызывали у пациентов системную гематологическую токсичность, в том числе анемию, нейтропению и лейкопению (CANDELARIA et al. Front. Immunol. 17 March 2021). Чтобы решить проблему безопасности mAb MAb11-22.1 в качестве

терапевтического средства-кандидата, несколько партий свежих PBMC от здоровых доноров приобретали у Stanford Blood Center (Пало-Альто, Калифорния), а замороженные клетки BM от здоровых доноров или пациентов с AML приобретали у HumanCells Bioscience (Фремонт, Калифорния). Клетки промывали с помощью PBS и блокировали ледяным PBS и 1% бычьим сывороточным альбумином (BSA). mAb MAb11-22.1 и Ab изотипического контроля в последовательных разведениях, начиная с 20 мкг/мл, использовали для окрашивания этих клеток при 4°C с последующим обнаружением с помощью FITC- или PE-конъюгированных pAb козы к IgG Fc мыши в разведении 1:800 (Jackson ImmunoResearch). В дополнение, конъюгированное с FITC антитело к CD34 человека (REAL487), конъюгированное с PE антитело к CD233 человека (REA368) и конъюгированное с PE антитело к CD235a человека (REA1092) приобретали у Miltenyi Biotec (Сан-Хосе, Калифорния) для одновременного окрашивания клеток с помощью mAb MAb11-22.1.

Результаты FACS показали, что mAb MAb11-22.1 не связывалось с нормальными клетками PBMC или нормальными клетками BM независимо от применяемых концентраций mAb (фиг. 5A). Согласованные результаты получали с различными партиями (донорами) клеток PBMC и BM (данные не представлены). В отличие от этого, клетки BM от пациента с AML реагировали с mAb MAb11-22.1, но не с Ab изотипического контроля (фиг. 5B), что позволяет предположить, что mAb MAb11-22.1 может различать здоровый BM от разновидности BM с AML. В образцах здорового BM свыше 20% клеток представляли собой гемопоэтические стволовые клетки, которые могли окрашиваться посредством конъюгированного с FITC mAb к CD34 человека (фиг. 5C, левые панели), но лишь немногие из них реагировали с mAb MAb11-22.1 и Ab изотипического контроля (фиг. 5C, средняя и правая панели). TfR1 обычно рассматривается как маркер ядродержащих эритроцитов, однако ни CD233-положительные эритроциты, ни CD235a-положительные эритроциты и эритробласты не реагировали с mAb MAb11-22.1 (фиг. 5D и 5E, левые панели), что подразумевает то, что mAb MAb11-22.1 может распознавать только TfR1, экспрессированный на злокачественных клетках, и будет обуславливать низкий риск супрессии костного мозга.

ПРИМЕР 6

Анализ интернализации mAb MAb11-22.1 опухолевыми клетками

Клетки OCI/AML2, NB4 или Raji в DMEM, дополненной 10% фетальной бычьей сыворотки Gibco (FBS, Thermo Fisher Scientific), высевали в количестве 1×10^5 /лунка в два 96-луночных культуральных планшета и инкубировали при 4°C в течение часа совместно с mAb MAb11-22.1, mAb к CD20 (R&D Systems) или mAb изотипического контроля с серией последовательных разведений 1:10, начиная с 10 мкг/мл. Клетки дважды промывали ледяным PBS посредством центрифугирования при $500 \times g$ для удаления несвязавшихся mAb. Клетки в одном 96-луночном планшете ресуспендировали теплой культуральной средой и инкубировали при 37°C для обеспечения возможности интернализации mAb, тогда как клетки в другом планшете ресуспендировали в ледяной культуральной среде и инкубировали при 4°C для предотвращения интернализации антител. Образцы, взятые через 30 минут, один час и два часа, дважды промывали ледяным PBS/1% BSA, а впоследствии инкубировали с конъюгированным с FITC антителом к IgG Fc мыши, разведенным в соотношении 1:800, в течение 30 минут при 4°C. После трехкратной промывки ледяным PBS/1% BSA клетки ресуспендировали в 150 мкл фиксирующего раствора, содержащего 1% параформальдегид, и хранили в темноте до проведения анализа методом FACS.

Результаты FACS показали, что mAb MAb11-22.1 связывалось с поверхностями двух линий клеток AML, OCI-AML2 и NB4, дозозависимым образом при 4°C, но оно быстро интернализировалось при 37°C. Хотя клетки Raji, вероятно, имели очень низкое число копий TfR1 на поверхности клетки, они все еще были способны интернализировать mAb MAb11-22.1 при 37°C (фиг. 6A, левая панель). Напротив, mAb к CD20 связывалось только с клетками Raji, но не с клетками AML при 4°C, и частично интернализировалось клетками Raji при 37°C (средние панели на фиг. 6A). Как и ожидалось, Ab изотипического контроля не окрашивало ни одну из трех линий клеток (правые панели на фиг. 6A).

Анализ интернализации на основе FACS мог предоставить лишь косвенное свидетельство эндоцитоза комплексов антитело-антиген и не позволял отличить интернализацию антител от сбрасывания антител. Для непосредственного наблюдения интернализации mAb проводили анализ интернализации на флуоресцентном

микроскопе с применением меченных флуоресцентной меткой mAb. Вкратце, mAb метили красителем CF488 с применением набора для мечения антител Mix-n-Stain™ (MilliporeSigma) в соответствии с протоколом производителя. Связывание клеток проводили в 96-луночных культуральных планшетах с различными концентрациями mAb в ледяной среде DMEM при 4°C в течение одного часа. После двукратной промывки клеток ледяным PBS один планшет инкубировали при 37°C в течение еще одного часа за счет добавления теплой DMEM, тогда как клетки в другом планшете ресуспендировали в холодном PBS для флуоресцентной визуализации с применением флуоресцентного микроскопа Keyence BZ-X800 All-in-one (Keyence, Итаска, Иллинойс). Ab изотипического контроля метили с помощью CF488 и параллельно инкубировали с клетками в качестве отрицательного контроля.

Обнаружили, что после инкубации в течение одного часа при 4°C mAb-CF488 MAb11-22.1 связывалось с поверхностью клеток OCI/AML2, образуя кольца высокоинтенсивной флуоресценции, образующие контур клеток (фиг. 6B, верхние панели). Значения интенсивности флуоресценции были пропорциональны значениям концентрации применяемого mAb. После инкубации в течение одного часа при 37°C большая часть флуоресцентных сигналов смещалась с поверхности клеток во внутреннее пространство клеток, что позволяет предположить, что связанные с поверхностью молекулы конъюгированного с CF488 mAb MAb11-22.1 в основном интернализировались клетками OCI/AML2 (фиг. 6B, нижние панели). Данное явление постоянно наблюдалось при различных концентрациях (1, 0,5, 0,1 и 0,05 мкг/мл) конъюгированного с CF488 mAb MAb11-22.1 в других линиях клеток AML, в том числе NB4 и THP-1 (данные не представлены). CF488-меченное Ab изотипического контроля не связывалось ни с одной из протестированных клеток (фиг. 6B, правые панели).

Аналогичные результаты дозозависимого связывания и интернализации наблюдали с клетками MDA-MB-231, линией клеток трижды негативного рака молочной железы (TNBC), которые сильно реагировали с mAb MAb11-22.1 при 4°C, как было выявлено в анализе методом FACS. Однако, как и ожидалось, флуоресцентные сигналы в клетках MDA-MB-231 были намного сильнее, чем сигналы клеток AML (фиг. 6C). Кроме того, частичная интернализация происходила даже при 4°C, а после инкубации в течение одного часа при 37°C интернализировались большинство молекул конъюгированного с CF488 mAb MAb11-22.1, что позволяет предположить, что белки TfR1,

экспрессированные на клеточной мембране MDA-MB-231, характеризовались более высокой тенденцией к интернализации после связывания с mAb MAb11-22.1.

ПРИМЕР 7

In vitro эффект mAb MAb11-22.1 на пролиферацию линий клеток AML

Эффект mAb MAb11-22.1 на пролиферацию линий клеток AML оценивали с помощью клеточных анализов *in vitro*. Для определения жизнеспособности клеток использовали набор для подсчета клеток 8 (ССК-8, Dojindo Molecular Technologies, Роквилл, Мэриленд) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, клетки AML, выращиваемые в DMEM/10% FBS, и 100 мкг/мл mAb MAb11-22.1 или Ab изотипического контроля высевали в количестве 5×10^3 клеток/лунку в трех повторностях в семь 96-луночных планшетов для культивирования клеток и инкубировали в увлажненной атмосфере с 5% CO₂ при 37°C. Жизнеспособность клеток оценивали каждые 24 часа путем инкубации с 10 мкл/лунка раствора из ССК-8 в течение четырех часов с последующим измерением OD₄₅₀.

Как показано на фиг. 7, клетки OCI/AML2 в обеих группах продолжали расти, но скорость пролиферации клеток, обработанных посредством mAb MAb11-22.1, была намного ниже, чем у клеток, обработанных посредством Ab изотипического контроля ($P < 0,05$). Аналогичные данные были получены с другими линиями клеток AML (данные не представлены). Следовательно, хотя mAb MAb11-22.1 и могло частично подавлять пролиферацию клеток OCI/AML2, само по себе mAb не было надежным терапевтическим средством-кандидатом. Фактически, mAb MAb11-22.1 не показало никакого эффекта в предварительном исследовании *in vivo* с участием мышинной модели CLDX. Поскольку mAb MAb11-22.1 характеризовалось чрезвычайно высокой аффинностью с TfR1 человека и показало сильную тенденцию к интернализации раковыми клетками, оно показало большой потенциал для разработки в качестве ADC для противораковой терапии.

ПРИМЕР 8

Секвенирование cDNA варибельной области гибридомы MAb11-22.1

Молекулы cDNA, кодирующие варибельные области легкой цепи (VL) и тяжелой цепи (VH) mAb MAb11-22.1, амплифицировали из общей РНК клеток гибридомы MAb11-

22.1 за счет методики 5'-быстрой амплификации концов cDNA (5'-RACE) с применением набора SMARTer RACE 5'/3' (Takara Bio USA, Сан-Хосе, Калифорния). Праймеры для 5'-RACE представлены под SEQ ID NO: 13 и SEQ ID NO:14. Фрагменты cDNA амплифицировали с помощью высокоточной ДНК-полимеразы Q5[®] и клонировали в вектор pMiniT2.0 (New England Biolabs, Ипсвич, Массачусетс) в соответствии с протоколом производителя. По десять колоний *E. coli* каждого трансформанта отбирали случайным образом для очистки плазмид с помощью мининаборов для высокоскоростной очистки плазмид (IBI Scientific, Дубьюк, Айова) и секвенирования ДНК по Сэнгеру (Genewiz, Южный Сан-Франциско, Калифорния). Все последовательности проверяли с помощью поиска BLAST по адресу <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> и международной информационной системы ImMunoGeneTics (IMGT)[®] (<http://www.imgt.org>) в отношении уникальности V-доменов. Консенсусные последовательности VL и VH для mAb MAb11-22.1 представлены в разделе «СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ» под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 3 соответственно. Кодируемые аминокислотные последовательности представлены под SEQ ID NO: 2 и SEQ ID NO: 4 соответственно.

Праймер для легкой цепи: 5'-CTGCTCACTGGATGGTGGGAAGATGG-3' (SEQ ID NO: 13)

Праймер для тяжелой цепи: 5'-AGCTGGGAAGGTGTGCACAC-3' (SEQ ID NO: 14)

Конструирование и экспрессия химерного Ab MAb11-22.1 (cAb)

Гены VL и VH mAb MAb11-22.1 амплифицировали с помощью ПЦР из секвенированных плазмид с применением пар праймеров, представленных под SEQ ID NO: 15-18 ниже. ПЦР-фрагменты расщепляли рестриктазами SpeI-NarI (VL) или XbaI-NheI (VH) (New England Biolabs) и лигировали в рамке считывания с константными областями легкой каппа-цепи человека (CL) или тяжелой цепи IgG1 человека (CH1-CH3) соответственно, содержащимися в векторе экспрессии собственной разработки, который содержал промотор CMV мыши и промотор IE1 CMV человека для контроля экспрессии легкой цепи и тяжелой цепи соответственно.

Прямой праймер для ПЦР VL: 5'-AGCACTAGTGCCGCCACCATGGAATCACAGACTCAGG-3' (SEQ ID NO: 15)

Обратный праймер для ПЦР VL: 5'-
CTGGGCGCCGCTACAGTCCGTTTCAGCTCCAGCTTGG-3' (SEQ ID NO: 16)

Прямой праймер для ПЦР VH: 5'-
AGCTCTAGAGCCGCCACCATGGAGACAGACACACTCCTG-3' (SEQ ID NO: 17)

Обратный праймер для ПЦР VH: 5'-
GCSTTTGGTGCTAGCAGAGACAGTGACCAGAGTC-3' (SEQ ID NO: 18)

После подтверждения за счет секвенирования ДНК экспрессионную плазмиду трансфицировали в клетки Dux-1S-HD, полученные из CHO-DG44 клетки собственной разработки, которые могли вырастать до высокой плотности в EX-CELL[®] CD CHO SFM, с применением реагента для трансфекции FectoPro (Polyplus-transfection[®] SA, Илькирш, Франция) согласно инструкции производителя. Транзиентную экспрессию и секрецию сAb MAб11-22.1 в EX-CELL[®] CD CHO SFM проверяли с помощью анализа методом FACS в отношении связывания с линиями клеток AML с последующей аффинной очисткой с помощью смолы MabSelect[™] SuRe[™] с белком А (GE Healthcare).

ПРИМЕР 9

Изучение характеристик сAb MAб11-22.1

Очищенное сAb показало подобные признаки со своим аналогом mAb в таких анализах, как SDS-PAGE, ELISA и FACS (данные не представлены). Также определяли кинетику связывания между сAb MAб11-22.1 и rTfR1-ECD с помощью системы Octet[®] QK. Для иммобилизации сAb MAб11-22.1 использовали биосенсоры для захвата IgG Fc человека (АНС) в течение 450 секунд, а в качестве контроля системы для связывания сAb MAб11-22.1 использовали Fab козы к антителу (H+L) человека (Jackson ImmunoResearch). Концентрации rTfR1-ECD при 2,5-кратных последовательных разведениях находились в диапазоне от 50 нМ до 1,28 нМ. Что касается mAb MAб11-22.1, представленного на фиг. 3А-3С, диссоциация (K_{off}) сAb MAб11-22.1 не поддавалась обнаружению в пределах 60 минут наблюдения, и, следовательно, аффинность между сAb MAб11-22.1 и rTfR1-ECD была чрезвычайно высокой ($K_D < 1$ пМ, фиг. 8А). Как и ожидалось, связывание между сAb MAб11-22.1 и Fab к антителу (H+L) человека показало нормальную кинетическую кривую с K_D , составляющей 2,18 нМ (фиг. 8В).

ПРИМЕР 10**In vitro эффект MAb11-22.1-S239C-DM1 на линиях раковых клеток**

Несмотря на то, что mAb MAb11-22.1 не характеризовалось сильной цитотоксической активностью, его чрезвычайно высокая аффинность с TfR1 человека и высокая специфичность в отношении опухоли делало его хорошим ADC-кандидатом для лечения рака. Чтобы изучить, можно ли применять его в качестве ADC-средства, проводили цистеиновое сканирование по экспонированным на поверхности остаткам константных областей легкой цепи и тяжелой цепи сAb MAb11-22.1 для исследования противоопухолевого эффекта при сайт-специфической конъюгации различных полезных нагрузок. При сайт-направленном мутагенезе заменяли сериновый кодон в положении 239 (TCC) на цистеиновый кодон (TGC) области Fc тяжелой цепи сAb MAb11-22.1 с применением пары праймеров, представленных под SEQ ID NO: 19 и 20 ниже. Вариант сAb MAb11-22.1-S293C транзientно экспрессировали и очищали с применением смолы MabSelect™ SuRe™ с белком А. Цистеин или глутатион, присутствующие в культуральной среде, которые связывались с Cys239 из сAb MAb11-22.1-S293C, удаляли обработкой 10-кратным молярным избытком дитиотреитола (DTT) в PBS при комнатной температуре, как описано у JUNUTULA и соавт. (Nat Biotechnol. 26:925-932, 2008). Антитело подвергали рефолдингу для экспонирования свободных тиоловых групп S239C и целостность сAb анализировали с помощью SDS-PAGE. Сайт-специфическую конъюгацию осуществляли посредством реакции между свободными тиоловыми группами Cys239 и DM1 в PBS с медленным перемешиванием при комнатной температуре в течение 10-60 минут с получением MAb11-22.1-S293C-DM1, что придавало ADC активность при теоретическом отношении лекарственного средства к антителу (DAR), составляющим 2. Свободный DM1 удаляли путем проведения диафильтрации против десятикратного объема PBS трижды с применением резервуара для перемешивания клеток Amicon®, оснащенного ультрафильтрационным диском с NMW 30 кДа (MilliporeSigma). Затем MAb11-22.1-S293C-DM1 стерилизовали фильтрацией с помощью 0,2-мкм шприцевого фильтра (VWR International, Раднор, Пенсильвания). Немутантное сAb MAb11-22.1 и Ab изотипического контроля также параллельно обрабатывали посредством DM1 в качестве отрицательных контролей для исключения эффекта, вызываемого сайт-неспецифической конъюгацией. Целостность и связывающую способность антител, обработанных DM1, анализировали с помощью SDS-PAGE, ELISA и FACS. Эндотоксин анализировали с помощью набора для

хромогенной количественной оценки эндотоксина Pierce™ (Thermo Fisher). По аффинности связывания с TfR1 и линиями раковых клеток никакой выраженной разницы между сAb-DM1 MAb11-22.1 и MAb11-22.1-S239C-DM1 не наблюдали. Как и ожидалось, MAb11-22.1-S239C-DM1 демонстрировало незначительное замедление миграции в геле по сравнению с MAb11-22.1-S239C без обработки.

Прямой праймер для последовательности с S239C: 5'-AACTCCTGGGTGGACCTTGCGTGTTTCTGTTCCCCCCTAAGC-3' (SEQ ID NO: 19)

Обратный праймер для последовательности с S239C: 5'-AACACGCAAGGTCCACCCAGGAGTTCAGGAGCAGGGCAAGG-3' (SEQ ID NO: 20)

Репрезентативные линии раковых клеток, в том числе OCI/AML2 (AML, подтип M4), Raji (ALL), HCC38 (TNBC) и MDA-MB-231 (TNBC), культивировали в культуральной среде DMEM/10% FBS до логарифмической фазы роста. В день 0 оптимизированное количество каждой линии клеток смешивали с отдельными антителами в трех повторностях в 96-луночных планшетах для культивирования клеток до достижения исходной OD₄₅₀, составляющей примерно 0,4 в анализе с применением ССК-8. Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере 5% CO₂. Пролиферацию клеток отслеживали в день 3 и день 5 с помощью анализа с применением ССК-8. Аб изотипического контроля без обработки DM1 отражало исходный уровень пролиферации клеток. В данном исследовании сравнивали оба MAb11-22.1-S239C и сAb MAb11-22.1 с обработкой DM1 или без нее.

Как проиллюстрировано на фиг. 9, пролиферация клеток всех четырех линий клеток подавлялась под действием MAb11-22.1-S239C-DM1, но не сAb MAb11-22.1-S239C без обработки. сAb MAb11-22.1 дикого типа не оказывало выраженного эффекта на пролиферацию клеток независимо от обработки DM1. Линии клеток AML и ALL были высокочувствительными к MAb11-22.1-S239C-DM1, поскольку как 100 мкг/мл, так и 300 мкг/мл полностью подавляли пролиферацию клеток. Две линии клеток TNBC были менее чувствительны к MAb11-22.1-S239C-DM1, поскольку концентрация 100 мкг/мл оказывала лишь частичные подавляющие эффекты.

ПРИМЕР 11**Оценка MAb11-22.1-S239C-DM1 *in vivo* с помощью мышинной модели с ксенотрансплантатом AML**

Создавали модель с ксенотрансплантатом с применением *nu/nu* мышей для оценки эффекта MAb11-22.1-S239C-DM1 на рост опухоли AML. Каждому самцу бестимусной «голой» мыши в возрасте 6 недель (Charles River Laboratories, Уилмингтон, Массачусетс) инъекцией вводили $1,5 \times 10^6$ клеток OCI/AML2 в 0,1 мл PBS в подкожное пространство правого бока. Когда все опухолевые узлы становились видимыми, мышей случайным образом разделяли на три различные группы ($n=5$ или 6), подлежащие обработке один раз в четыре дня в течение семи раз ($Q4 \times 7$) путем внутрибрюшинной (*i.p.*) инъекции MAb11-22.1-S239C-DM1 (10 мг/кг массы тела для низкой дозы или 20 мг/кг массы тела для высокой дозы) или Ab изотипического контроля (без мутации S239C), которых также обрабатывали с помощью DM1 (20 мг/кг массы тела). Значения объема опухолей и значения массы тела измеряли один раз в четыре дня непосредственно перед введением лекарственного средства. Значения объема опухолей рассчитывали с применением формулы: $\text{объем} = \frac{1}{2} \times (\text{ширина})^2 \times \text{длина}$. Животных умерщвляли, если объем опухоли превышал 2000 мм^3 или если опухоль становилась некротической или изъязвлялась через кожу.

Ксенотрансплантат OCI/AML2 представляет собой мышиную модель агрессивного CLDX. Ни mAb MAb11-22.1, ни cAb MAb11-22.1 отдельно не смогли заметно снизить рост опухолей ксенотрансплантата OCI/AML2 ($P > 0,05$, данные не представлены). В настоящем исследовании 10 мг/кг массы тела (низкая доза) MAb11-22.1-S239C-DM1 вызывала полную регрессию и стойкие ответы после одного или двух введений лекарственного средства (фиг. 10). У мышей в группе с обработкой 20 мг/кг массы тела (высокая доза) MAb11-22.1-S239C-DM1 ($n=6$) показаны переменные ответы: у трех мышей было 100% уменьшение объема опухоли с дня 4 или дня 8, как и в группе с низкой дозой; у другой мыши показана регрессия опухоли в день 4 и 8, но после этого опухоль возобновила рост; оставшиеся две мыши не отвечали на MAb11-22.1-S239C-DM1, и одна из них была умерщвлена в день 24 вследствие прогрессирования опухоли. В группе изотипического контроля ($n=5$) все опухоли росли постоянно, и две мыши были умерщвлены в день 20 по причине того, что их опухоли превысили 2000 мм^3 . Хотя и были использованы очень высокие дозы ADC, во время исследования не

наблюдали никаких системных побочных эффектов, таких как изменение жизненно важных показателей, потеря подвижности, аппетита или общей массы тела.

Эффект MAb11-22.1-S239C-DM1 на рост опухоли был очевиден при сравнении с группой изотипического контроля, что подтверждает, что сAb MAb11-22.1 может быть хорошим кандидатом в качестве ADC для лечения рака. Обладая высокой аффинностью и специфичностью к TfR1 человека, MAb11-22.1-S239C в кровотоке могут накапливаться на TfR1-положительных опухолевых клетках и доставлять DM1 внутриклеточно посредством эндоцитоза. В условиях наличия высокой концентрации глутатиона (GSH) в опухолевых клетках DM1 может высвобождаться из ADC и оказывать сторонний цитолитический эффект на окружающие клетки в ксенотрансплантатной опухоли, что означает, что ADC на основе MAb11-22.1 можно применять не только при злокачественных новообразованиях крови, но также и при солидных опухолях.

Механизм, лежащий в основе различной эффективности в группе высоких доз, остается неясным. В это могли внести вклад выборки небольшого размера и индивидуальные вариации в ответ на соединения вследствие различных уровней экспрессии TfR1 на поверхности клеток опухолей. Иногда высокие дозы лекарственного средства, представляющего собой ADC, могут быстро выводиться из организма или индуцировать устойчивость к лекарственному средству, и поэтому необходима оптимизация диапазона доз MAb11-22.1-S239C-DM1. Тем не менее, исходя из данных о его высокой специфичности в отношении опухоли и противоопухолевой активности, MAb11-22.1 является идеальным антителом к TfR1 для разработки ADC. В настоящее время исследуются технологии конъюгации с активными полезными нагрузками и идеальными линкерами для ADC MAb11-22.1 с целью достижения стойкого DAR и оптимального диапазона доз для лечения рака.

Конкретные способы и композиции, описанные в данном документе, отражают предпочтительные варианты осуществления, а также являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема настоящего изобретения. После рассмотрения данного описания специалистам в данной области техники станут очевидны и другие объекты, аспекты и варианты осуществления, и они охватываются сутью настоящего изобретения, которая определяется объемом формулы изобретения. Специалисту в данной области техники будет очевидно, что в настоящем изобретении, раскрытом в

данном документе, можно осуществить различные замены и модификации без отступления от объема и сути настоящего изобретения. Настоящее изобретение, иллюстративно описанное в данном документе, может быть реализовано на практике соответствующим образом при отсутствии какого-либо элемента или элементов либо ограничения или ограничений, которые в данном документе конкретно не раскрыты как существенные. Таким образом, например, в каждом случае в данном документе в вариантах осуществления или примерах настоящего изобретения любой из терминов «предусматривающий», «включающий», «содержащий», «имеющий» и «иметь» следует толковать как синонимы и расширительно и без ограничения. Способы и процессы, иллюстративно описанные в данном документе, могут быть реализованы на практике с различными порядками этапов, и они не обязательно ограничены порядком этапов, указанным в данном документе или в формуле изобретения.

Ни при каких обстоятельствах настоящий патент не может интерпретироваться как ограниченный конкретными примерами, или вариантами осуществления, или способами, конкретно раскрытыми в данном документе. Ни при каких обстоятельствах настоящий патент не может быть истолкован как ограничивающий какое-либо заявление, сделанное каким-либо Экспертом или любым другим должностным лицом или сотрудником Ведомства по патентам и товарным знакам, за исключением случаев, когда такое заявление специально и без допущений или оговорок прямо принято в ответном письме Заявителей.

Настоящее изобретение было описано в данном документе в широком смысле и в общих чертах. Каждая из более узких разновидностей и подродовых групп, подпадающих под общее раскрытие, также составляет часть настоящего изобретения. Термины и выражения, которые были использованы в данном документе, используются в качестве описательных, а не ограничивающих терминов, и такие термины и выражения не предназначены для исключения какого-либо эквивалента показанных и описанных элементов или их частей, а подразумевается, что различные модификации являются возможными в пределах объема заявляемого изобретения. Таким образом, будет понятно, что, хотя настоящее изобретение было конкретно раскрыто с помощью предпочтительных вариантов осуществления и необязательных признаков, специалисты в данной области техники смогут прибегнуть к модификации и изменению раскрытых в данном документе идей, и что такие модификации и

изменения считаются подпадающими под объем настоящего изобретения, определяемый прилагаемой формулой изобретения.

ВКЛЮЧЕНИЕ ПОСРЕДСТВОМ ССЫЛКИ

Все патенты и патентные заявки, процитированные в данном документе, настоящим включены посредством ссылки, как и все остальные процитированные источники литературы.

Упомянутые патенты

В целом касательно Ab:

патент США № 7317091B2;

патент США № 5500362;

патент США № 4816567;

патент США № 5225539;

патенты США №№ 5565332, 5580717, 5733743 и 6265150;

патент США № 5932448;

патент США № 7538196;

патент США № 8148496;

патент США № 8518891;

патент США № 9310373;

патент США № 9764041;

патент США № 11040084;

EP 239400 B1;

WO 00/53211 и патент США № 5981568;

WO2014146487A1;

публикация заявки на патент США № 20170151343;

публикация заявки на патент США № 20170335281;

WO2017114204;

публикация заявки на патент США № 20210139602 A1.

Библиографические ссылки на непатентную литературу, цитируемую в описании только по имени автора(-ов):

Bomford AB and Munro HN. *Hepatology*. (1985) 5:870-875.

Brooks D, Taylor C, Dos Santos B, Linden H, Houghton A, Hecht TT. *Clin Cancer Res*. (1995) 1:1259-1265.

Callens, C, Moura IC, Lepelletier Y, Coulon S, Renand A, Dussiot M, Ghez D, Benhamou M, Monteiro RC, Bazarbachi A, and Hermine O. *Leukemia*. (2008) 22:42-48.

Candelaria PV, Leoh LS, Penichet ML, and Daniels-Wells TR. *Front. Immunol*. 17 March 2021. doi.org/10.3389/fimmu.2021.607692

Daniels TR, Delgado T, Rodriguez JA, Helguera G, and Penichet ML. *Clin Immunol*. (2006) 121:144-158.

Daniels TR, Ortiz-Sanchez E, Luria-Perez R, Quintero R, Helguera G, Bonavida B, Martínez-Maza O, and Penichet ML. *J Immunother*. (2011) 34:500-508.

Daniels-Wells TR, Candelaria PV, Emiko K, Wen J, Weng L, Kamata M, Almagro JC, Martínez-Maza O, and Penichet ML. *Cancer Res*. (2020) 80(16 Suppl):5655.

Daniels-Wells TR, Widney DP, Leoh LS, Martinez-Maza O, Penichet ML. *J Immunother*. (2015) 38:307-310.

Faulk WP, Hsi BL, Stevens PJ. *Lancet*. (1980) 2:390-392.

Feng R, Wang Y, Ramachandran V, Ma Q, May MM, Li M, Zhou JX, Xu X, Xu K, Fang S, Xia W, Sui D, Liu H, Gao X, Prieto V, Blacklow SC, Lu M, Lee JE. *J Exp Clin Cancer Res*. (2020) 39:273.

Gatter KC, Brown G, Trowbridge IS, Woolston RE, Mason DY. *J Clin Pathol.* (1983) 36:539-545.

Jeong SM, Hwang S, Seong RH. *Biochem Biophys Res Commun.* (2016) 471:373-379.

Johnson M, El-Khoueiry A, Hafez N, Lakhani N, Mamdani H, Rodon J, Sanborn RE, Garcia-Corbacho J, Boni V, Stroh M, Hannah AL, Wang S, Castro H, Spira A. *Clin Cancer Res.* (2021) 27:4521-4530.

Junutula JR, Raab H, Clark S, Bhakta S, Leipold DD, Weir S, Chen Y, Simpson M, Tsai SP, Dennis MS, Lu Y, Meng YG, Ng C, Yang J, Lee CC, Duenas E, Gorrell J, Katta V, Kim A, McDorman K, Flagella K, Venook R, Ross S, Spencer SD, Lee Wong W, Lowman HB, Vandlen R, Sliwkowski MX, Scheller RH, Polakis P, Mallet W. *Nat Biotechnol.* (2008) 26:925-932.

Kohler & Milstein. *Nature* 1975;256:495-497

Lepelletier Y, Camara-Clayette V, Jin H, Hermant A, Coulon S, Dussiot M, Arcos-Fajardo M, Baude C, Canionni D, Delarue R, Brousse N, Benaroch P, Benhamou M, Ribrag V, Monteiro RC, Moura IC, Hermine O. *Cancer Res.* (2007) 67:1145-1154.

Li M, Gao J, Feng R, Wang Y, Chen X, Sun J, Zhang D, Zhu Z, Ellis LM, Lu M, Lee JE, Feng Z, Liu B. *PLoS One.* 2013;8:e77398

Moura IC, Centelles MN, Arcos-Fajardo M, Malheiros DM, Collawn JF, Cooper MD, Monteiro RC. *J Exp Med.* (2001) 94:417-425.

Moura, I.C., Y. Lepelletier, B. Arnulf, P. England, C. Baude, C. Blood. (2004) 103:1838-1845.

Nagai K, Nakahata S, Shimosaki S, Tamura T, Kondo Y, Baba T, Taki T, Taniwaki M, Kurosawa G, Sudo Y, Okada S, Sakoda S, Morishita K. *Cancer Med.* (2014) 3:1085-1099.

Neiveyans M, Melhem R, Arnoult C, Bourquard T, Jarlier M, Busson M, Laroche A, Cerutti M, Pugnière M, Ternant D, Gaborit N, Chardès T, Poupon A, Gouilleux-Gruart V, Pèlerin A, Poul MA. *MAbs.* (2019) 11:593-605.

Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. *Nat Nanotechnol.* (2007) 2:751-760.

Qian Z, LI H, SUN H, HO K. *Pharmacol Rev.* (2002) 54:561-587.

Richardson DR, Kalinowski DS, Lau S, Jansson PJ, Lovejoy DB. *Biochim. Biophys. Acta Gen Subj.* (2009) 1790:702-717.

Shimosaki S, Nakahata S, Ichikawa T, Kitanaka A, Kameda T, Hidaka T, Kubuki Y, Kurosawa G, Zhang L, Sudo Y, Shimoda K, Morishita K. *Biochem Biophys Res Commun.* (2017) 485:144-151.

Sutherland R, Delia D, Schneider C, Newman R, Kemshead J, Greaves M. *Proc Natl Acad Sci USA* (1981) 78:4515-4519.

Trowbridge IS and Lopez F. *Proc Natl Acad Sci USA.* (1982) 79:1175-1179.

Ward JH. *Invest Radiol.* (1987) 22:74-83.

Winter & Milstein. *Nature* 1991;349:293-299

Zhang L, Nomura F, Aikawa Y, Kurosawa Y, Morishita K, Sudo Y. *Cancer Res.* (2017) 77(13 Suppl):5586.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область легкой цепи, где CDR1-CDR3 имеют последовательности, которые на по меньшей мере 70% идентичны SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно.
2. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где CDR1-CDR3 вариабельной области легкой цепи имеют последовательности, которые идентичны SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно.
3. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO: 2.
4. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, где CDR1-CDR3 имеют последовательности, которые на по меньшей мере 70% идентичны SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.
5. Конъюгат связывающего средства по п. 4, где CDR1-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи имеют последовательности, которые идентичны SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.
6. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO: 4.
7. Выделенная молекула ДНК или РНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи связывающего средства по п. 2.
8. Выделенная молекула ДНК, имеющая нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1.
9. Выделенная молекула ДНК или РНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи связывающего средства по п. 5.

10. Выделенная молекула ДНК, имеющая нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3.
11. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где связывающее средство представляет собой моноклональное антитело.
12. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где моноклональное антитело представляет собой мышинное, человеческое, гуманизированное, химерное, биспецифическое или полиспецифическое антитело.
13. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где связывающее средство представляет собой диатело, однодоменную антигенсвязывающую (SDAB) молекулу, домен VH или VL или домен VHH.
14. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь и легкую к-цепь IgG1.
15. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где связывающее средство представляет собой Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, rIgG-, Fv- или Fd-фрагмент.
16. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где связывающее средство представляет собой scFv или sc(Fv)₂.
17. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где моноклональное антитело относится к классу IgD, IgE, IgG, IgA или IgM или к подклассу одного из указанных классов.
18. Конъюгат связывающего средства по п. 17, где подкласс моноклонального антитела представляет собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2.
19. Конъюгат связывающего средства по п. 17, где моноклональное антитело содержит легкую к-цепь.
20. Вектор, содержащий выделенные молекулы ДНК по п. 8.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область легкой цепи, где CDR1-CDR3 имеют последовательности, которые на по меньшей мере 70% идентичны SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно.
2. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где CDR1-CDR3 вариабельной области легкой цепи имеют последовательности, которые идентичны SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно.
3. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область легкой цепи, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO: 2.
4. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, где CDR1-CDR3 имеют последовательности, которые на по меньшей мере 70% идентичны SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.
5. Конъюгат связывающего средства по п. 4, где CDR1-CDR3 вариабельной области тяжелой цепи имеют последовательности, которые идентичны SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.
6. Конъюгированное с противоопухолевым средством связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая на по меньшей мере 70% идентична SEQ ID NO: 4.
7. Выделенная молекула ДНК или РНК, кодирующая вариабельную область легкой цепи связывающего средства по п. 2.
8. Выделенная молекула ДНК, имеющая нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 1.
9. Выделенная молекула ДНК или РНК, кодирующая вариабельную область тяжелой цепи связывающего средства по п. 5.

10. Выделенная молекула ДНК, имеющая нуклеотидную последовательность под SEQ ID NO: 3.
11. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где связывающее средство представляет собой моноклональное антитело.
12. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где моноклональное антитело представляет собой мышинное, человеческое, гуманизированное, химерное, биспецифическое или полиспецифическое антитело.
13. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где связывающее средство представляет собой диатело, однодоменную антигенсвязывающую (SDAB) молекулу, домен VH или VL или домен VHH.
14. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где моноклональное антитело содержит тяжелую цепь и легкую к-цепь IgG1.
15. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где связывающее средство представляет собой Fab-, Fab'-, F(ab')₂-, rIgG-, Fv- или Fd-фрагмент.
16. Конъюгат связывающего средства по п. 1, где связывающее средство представляет собой scFv или sc(Fv)₂.
17. Конъюгат связывающего средства по п. 11, где моноклональное антитело относится к классу IgD, IgE, IgG, IgA или IgM или к подклассу одного из указанных классов.
18. Конъюгат связывающего средства по п. 17, где подкласс моноклонального антитела представляет собой IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 или IgA2.
19. Конъюгат связывающего средства по п. 17, где моноклональное антитело содержит легкую к-цепь.
20. Вектор, содержащий выделенные молекулы ДНК по п. 8.
21. Связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, где CDR1-CDR3, входящие в состав легкой цепи с вариабельной областью, имеют последовательности, идентичные SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7 соответственно.

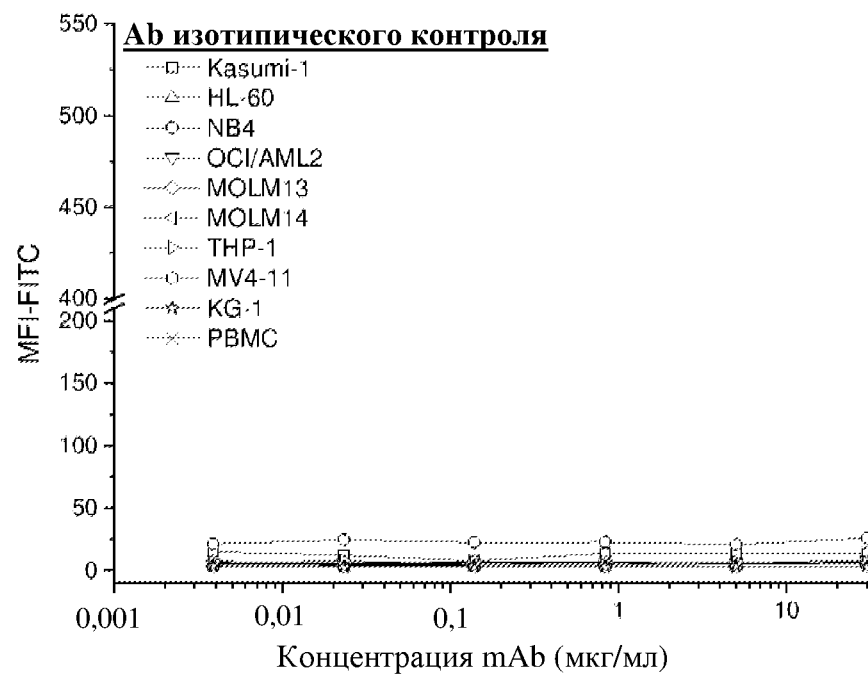
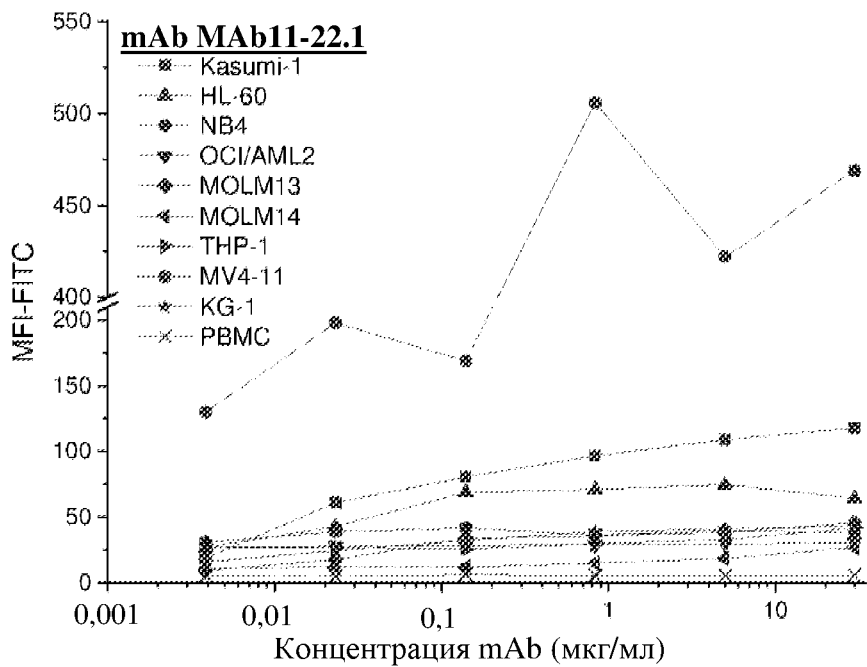
22. Связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, где CDR1-CDR3, входящие в состав вариабельной области тяжелой цепи, имеют последовательности, идентичные SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10 соответственно.

23. Связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее легкую цепь с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 2.

24. Связывающее средство, нацеливающееся на TfR1, содержащее тяжелую цепь с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 4.

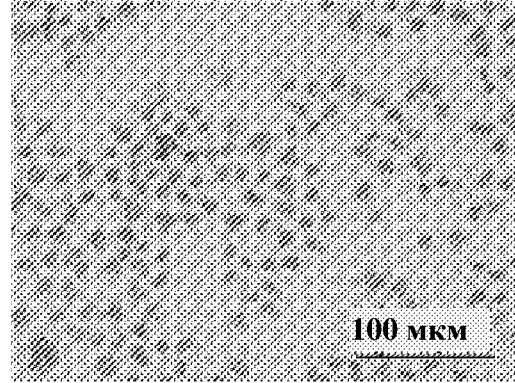
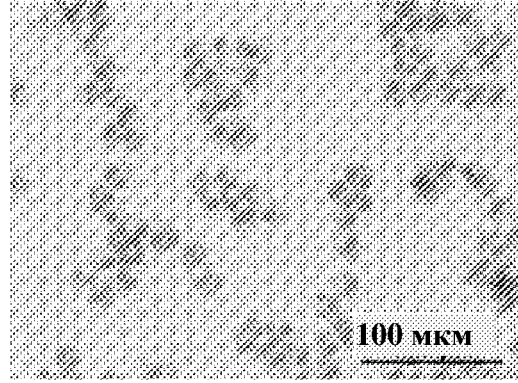
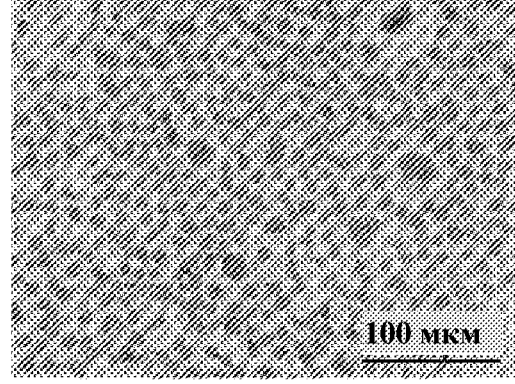
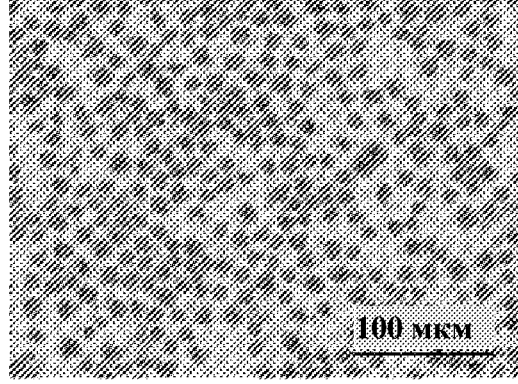
25. Связывающее средство по п. 24, содержащее легкую цепь с последовательностью, идентичной SEQ ID NO: 2.

Фиг. 1А



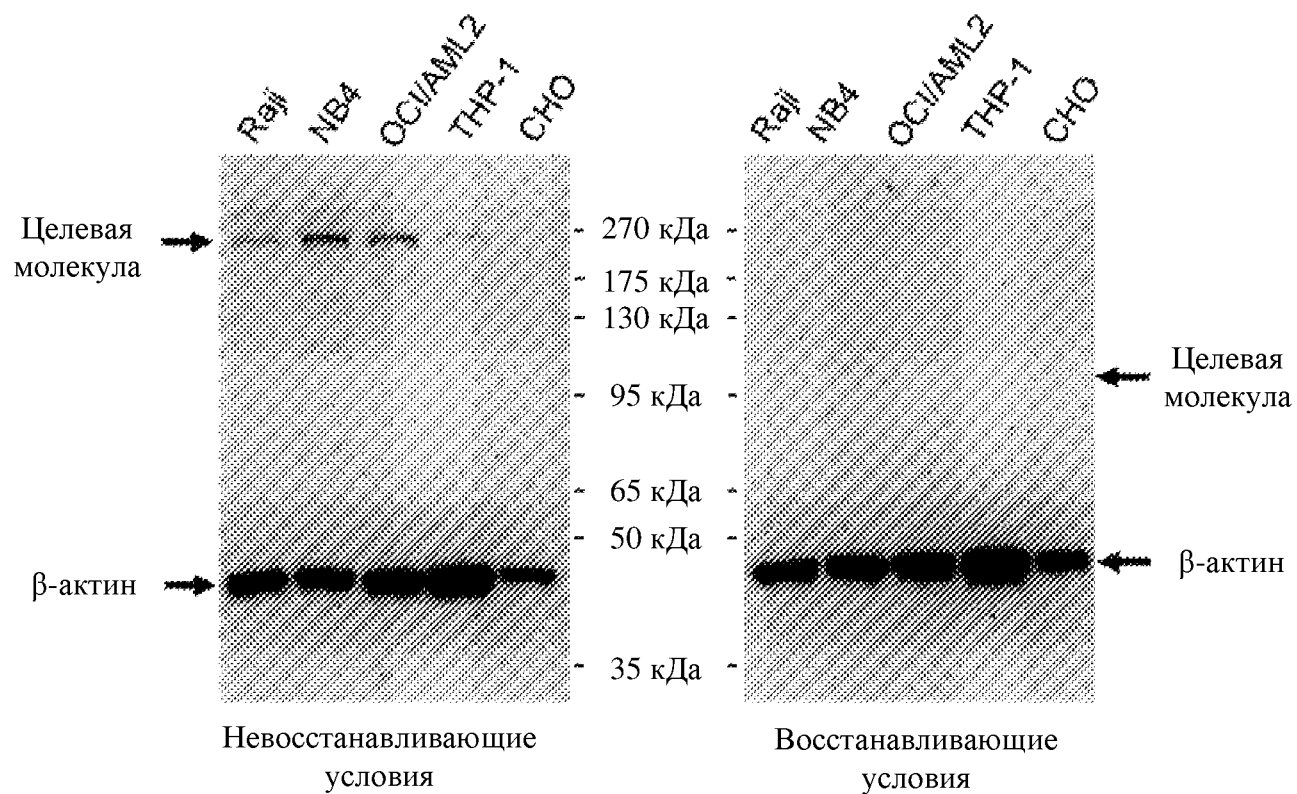
MAb11-22.1

Изотипический контроль

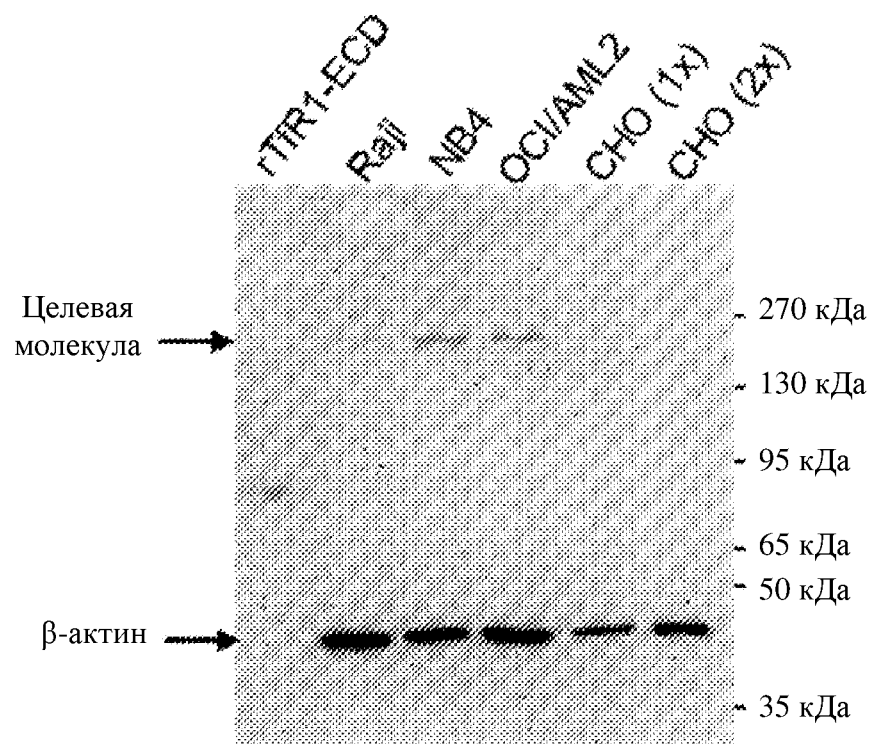


Фиг. 1В

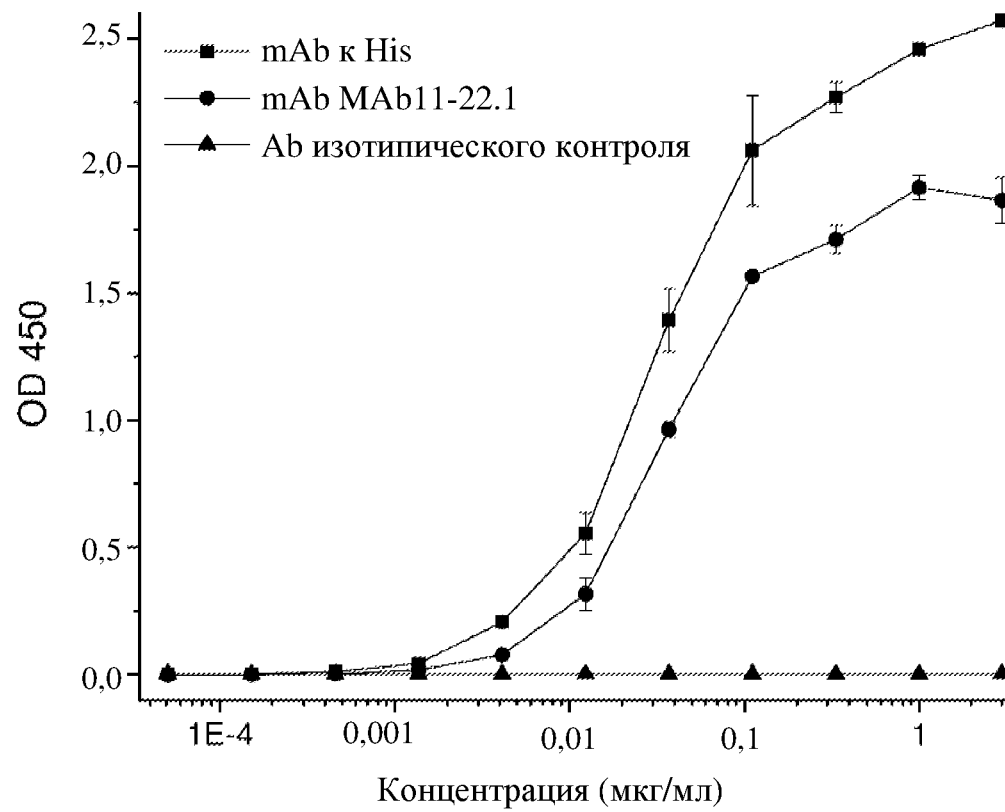
Фиг. 1С



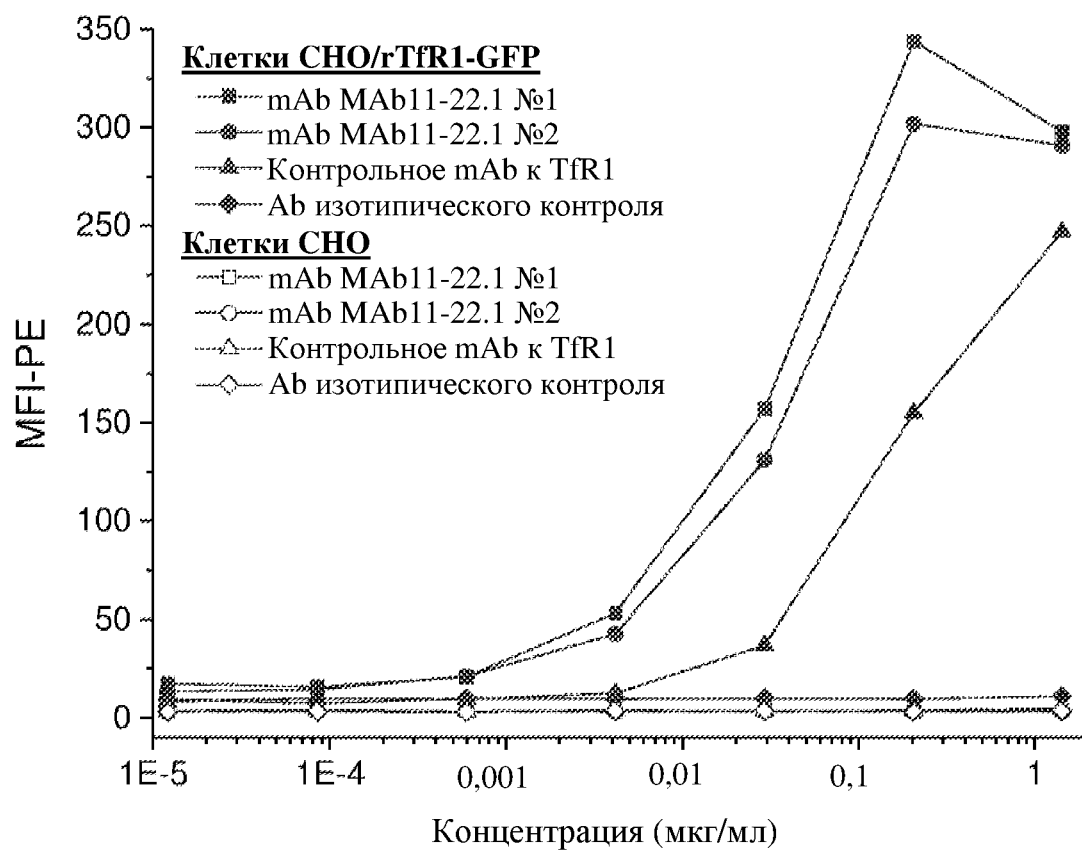
Фиг. 2В



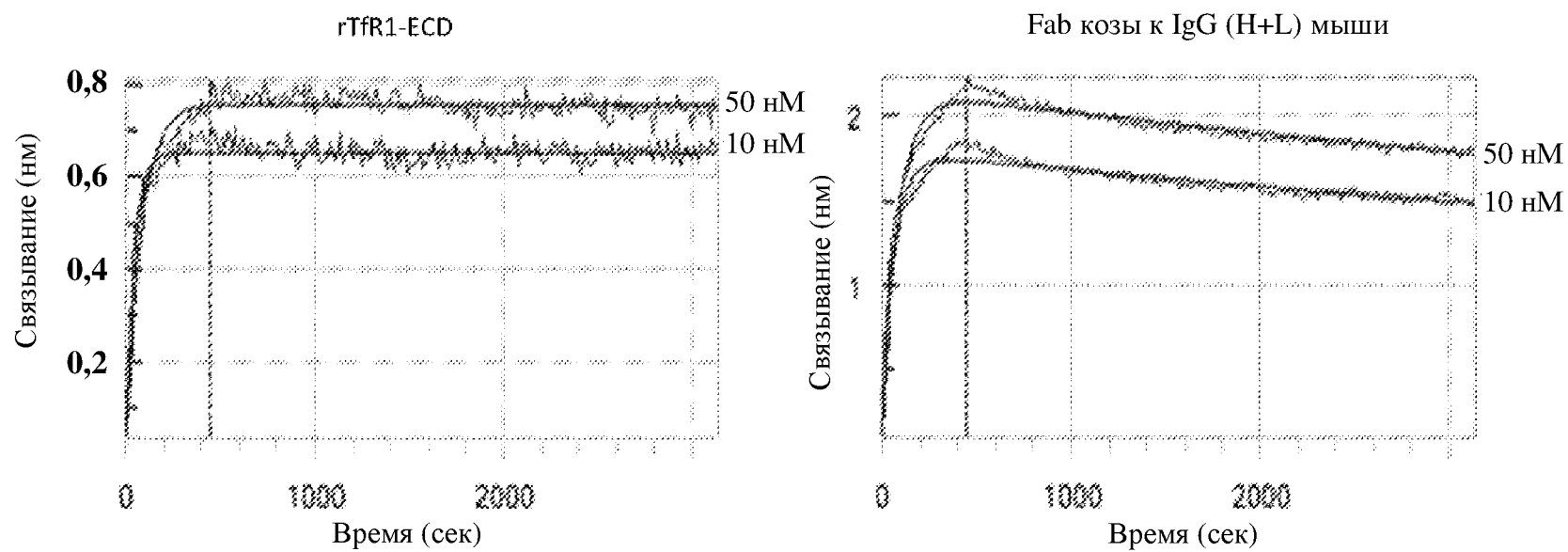
Фиг. 2С



Фиг. 2D



Фиг. 3А



Фиг. 3В

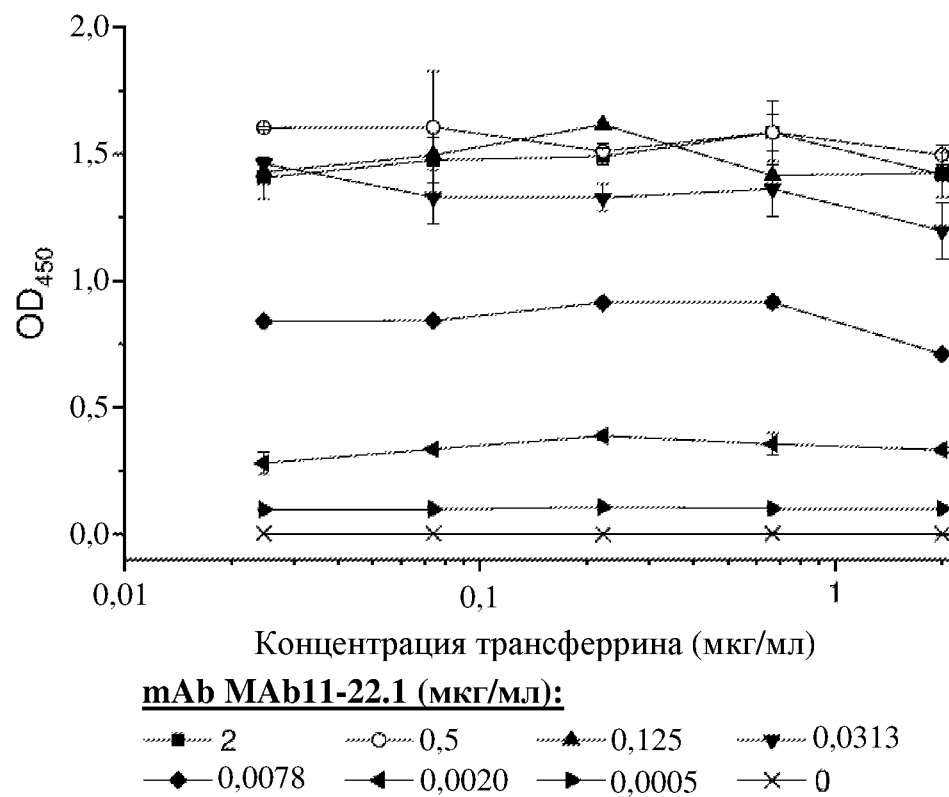
Загрузка	rTfR1-ECD	K_D (M)	Ошибка K_D	k_{on} (1/Мс) [†]	Ошибка k_{on}	k_{off} (1/с)	Ошибка k_{off}	Полный χ^2	Полный R^2
mAb MAb11-22.1, 50 нМ	20 нМ	<1,0E-12	2,01E-12	6,04E+05	9,80E+03	<1,0E-07		0,7868	0,9909
	8 нМ	<1,0E-12	2,01E-12	6,04E+05	9,80E+03	<1,0E-07		0,7868	0,9909
	3,2 нМ	<1,0E-12	2,01E-12	6,04E+05	9,80E+03	<1,0E-07		0,7868	0,9909
	1,28 нМ	<1,0E-12	2,01E-12	6,04E+05	9,80E+03	<1,0E-07		0,7868	0,9909
mAb MAb11-22.1, 10 нМ	20 нМ	<1,0E-12	1,14E-12	1,16E+06	2,12E+04	<1,0E-07		1,035	0,989
	8 нМ	<1,0E-12	1,14E-12	1,16E+06	2,12E+04	<1,0E-07		1,035	0,989
	3,2 нМ	<1,0E-12	1,14E-12	1,16E+06	2,12E+04	<1,0E-07		1,035	0,989
	1,28 нМ	<1,0E-12	1,14E-12	1,16E+06	2,12E+04	<1,0E-07		1,035	0,989

Фиг. 3С

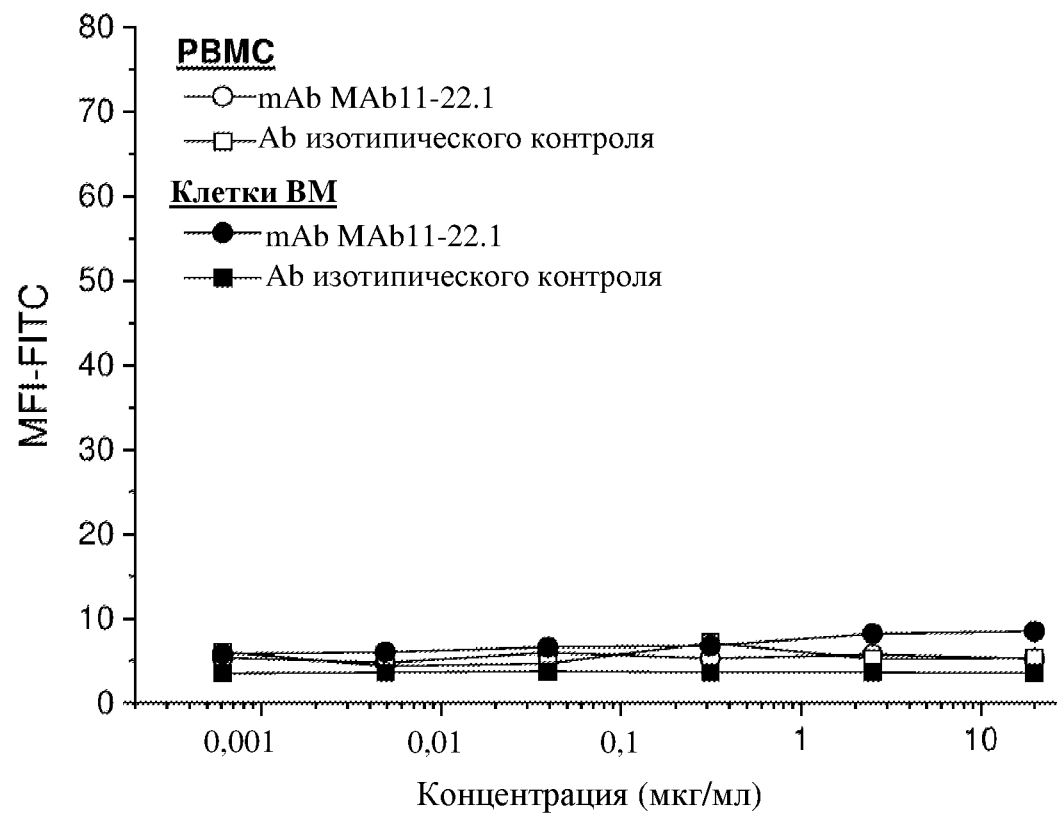
Загрузка	Fab*	K_D (M)	Ошибка K_D	k_{on} (1/Мс)	Ошибка k_{on}	k_{off} (1/с)	Ошибка k_{off}	Полный χ^2	Полный R^2
mAb MAb11-22.1, 50 нМ	300	1,45E-09	4,43E-11	4,17E+04	7,00E+02	6,03E-05	1,55E-06	2,8165	0,9956
	100	1,45E-09	4,43E-11	4,17E+04	7,00E+02	6,03E-05	1,55E-06	2,8165	0,9956
	33,3	1,45E-09	4,43E-11	4,17E+04	7,00E+02	6,03E-05	1,55E-06	2,8165	0,9956
mAb MAb11-22.1, 10 нМ	300	1,04E-09	2,75E-11	5,71E+04	8,81E+02	5,92E-05	1,28E-06	1,5033	0,9957
	100	1,04E-09	2,75E-11	5,71E+04	8,81E+02	5,92E-05	1,28E-06	1,5033	0,9957
	33,3	1,04E-09	2,75E-11	5,71E+04	8,81E+02	5,92E-05	1,28E-06	1,5033	0,9957

*Fab козы к антителу (H+L) мыши

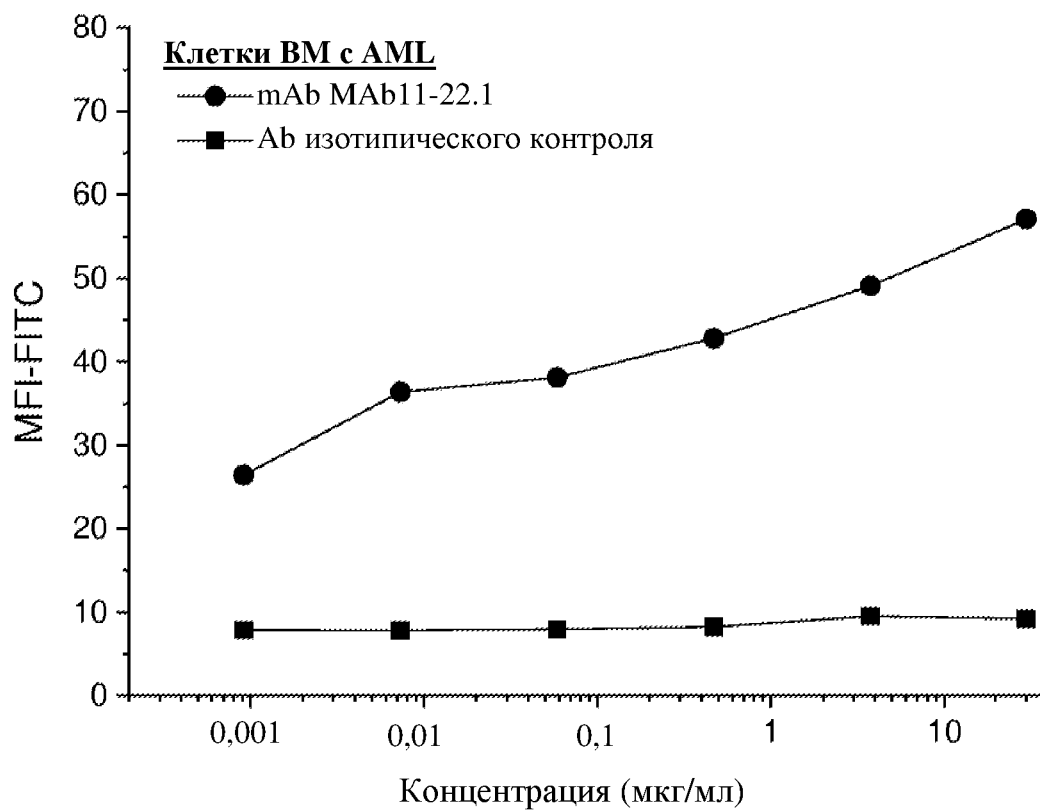
Фиг. 4



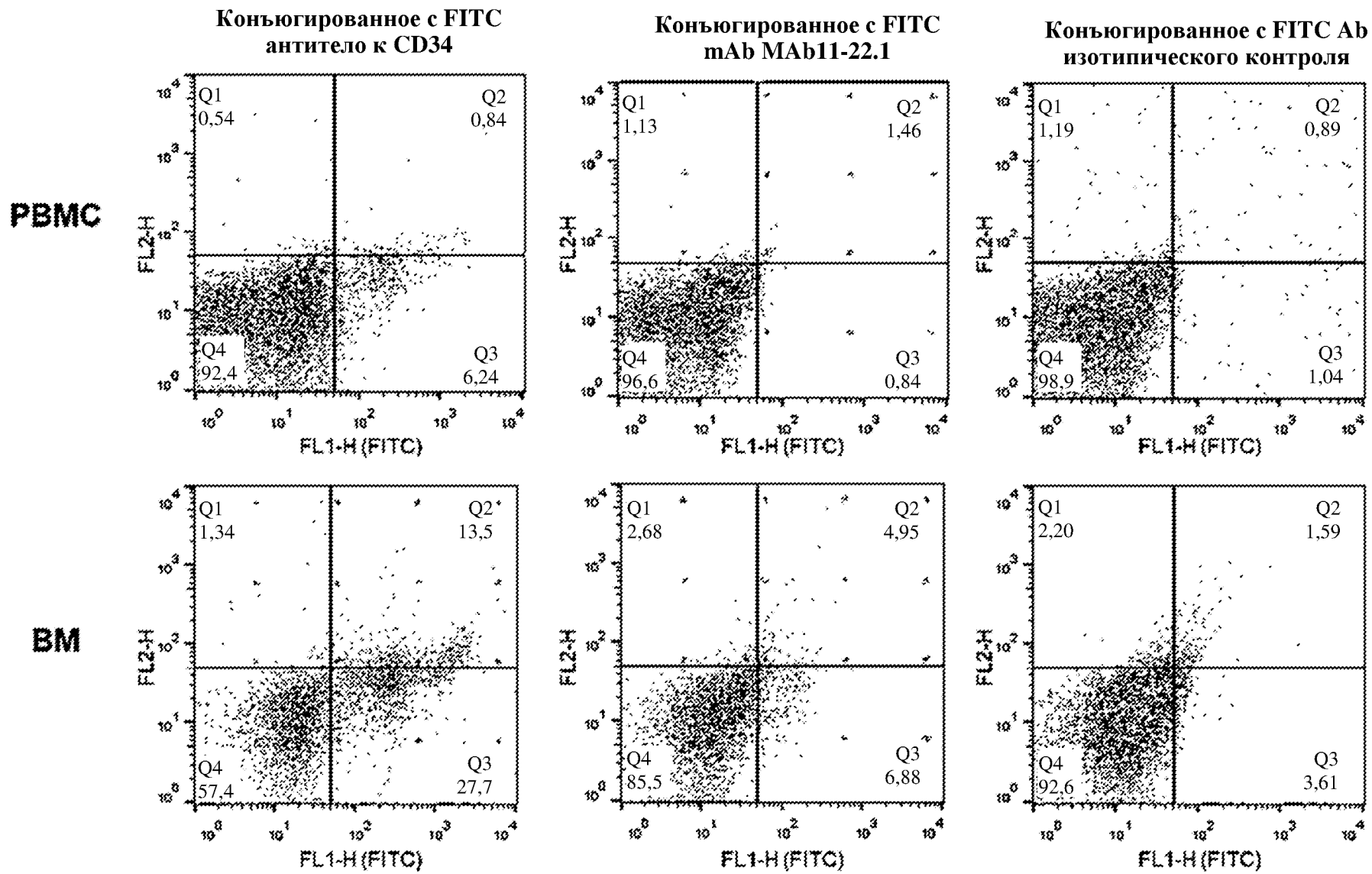
Фиг. 5А



Фиг. 5В



Фиг. 5С

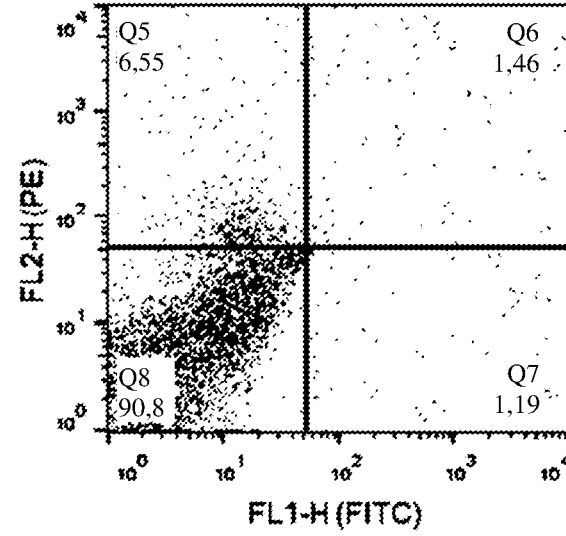
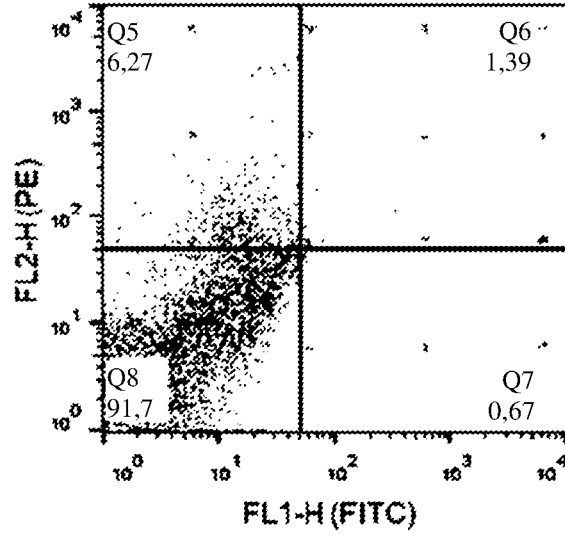


Фиг. 5D

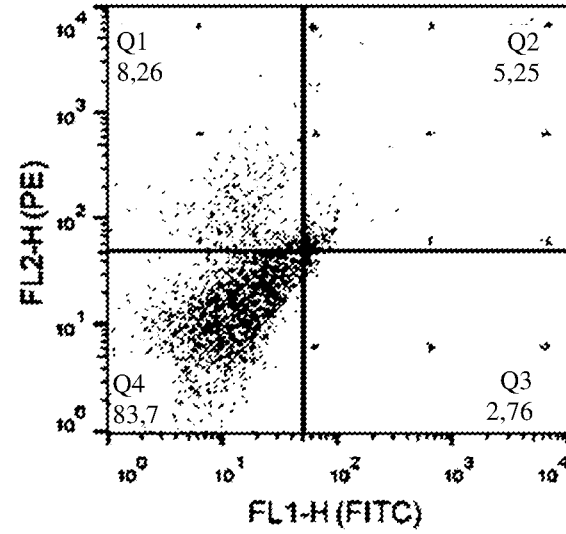
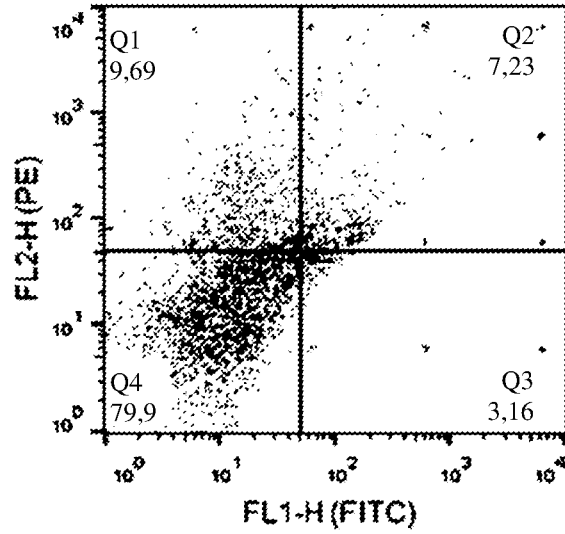
Конъюгированное с FITC
mAb МАВ11-22.1

Конъюгированное с FITC Аб
изотипического контроля

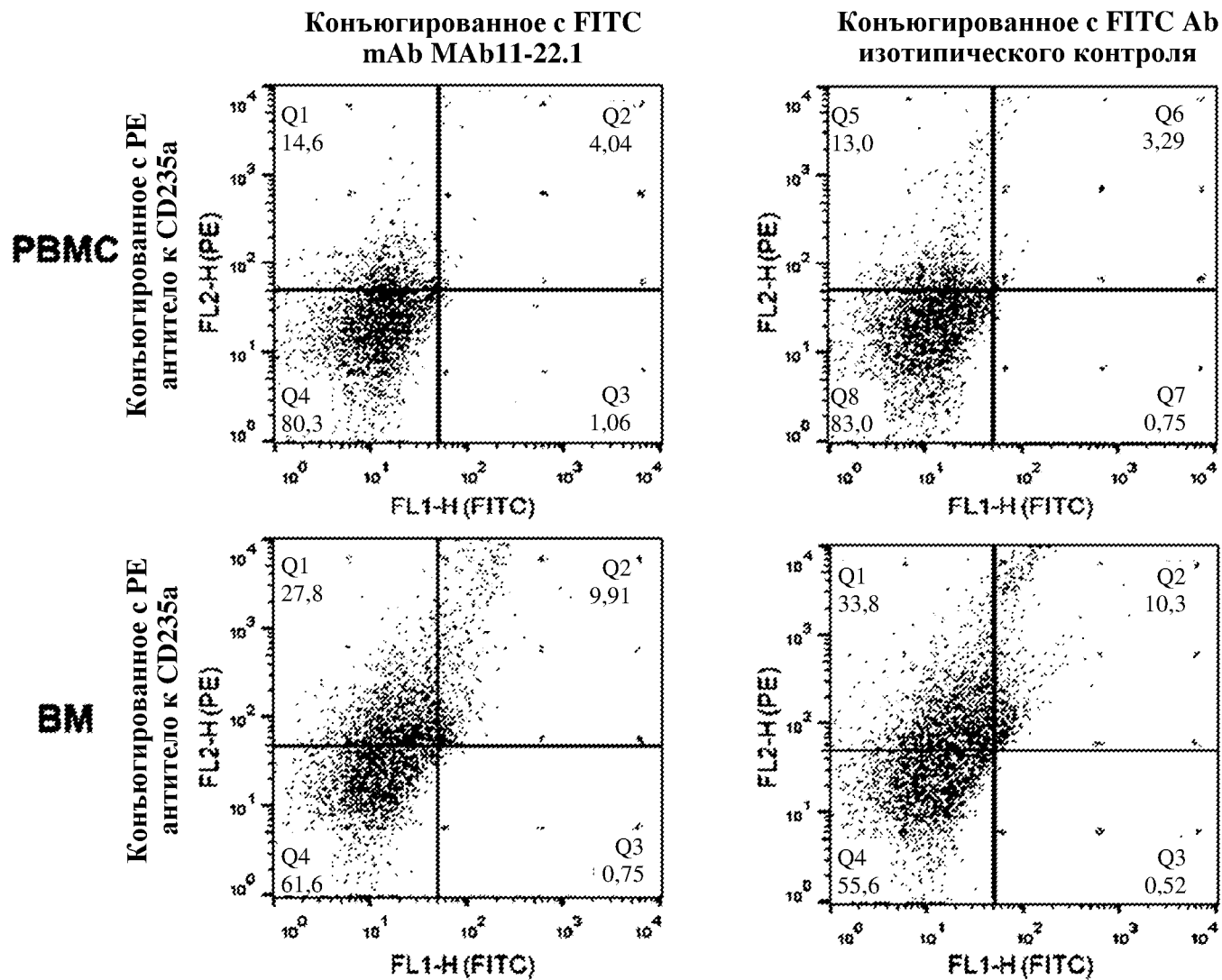
PBMC
Конъюгированное с PE
антитело к CD233



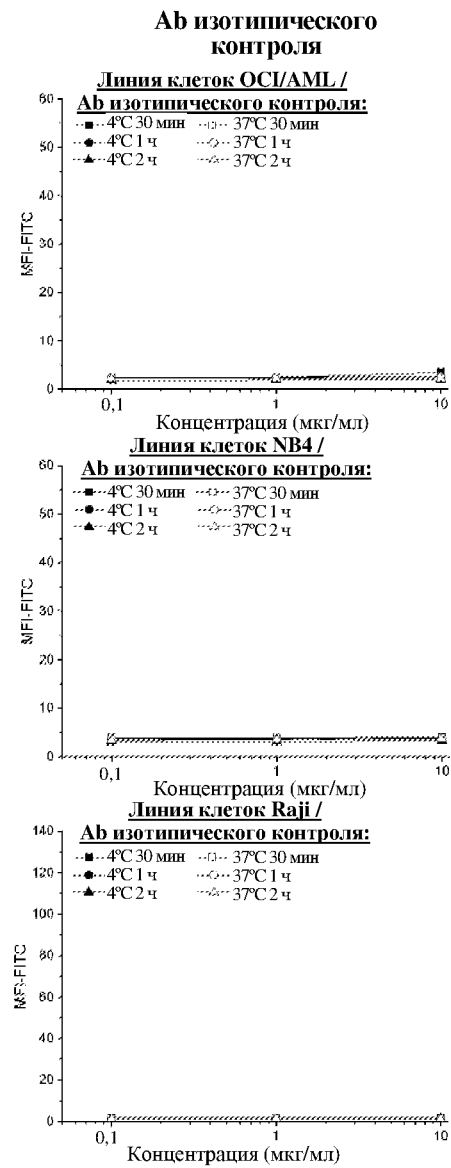
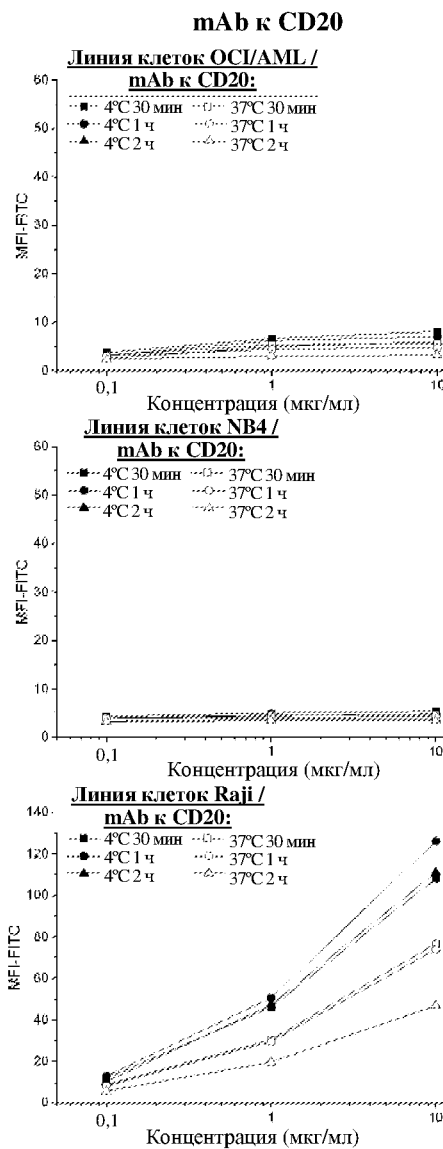
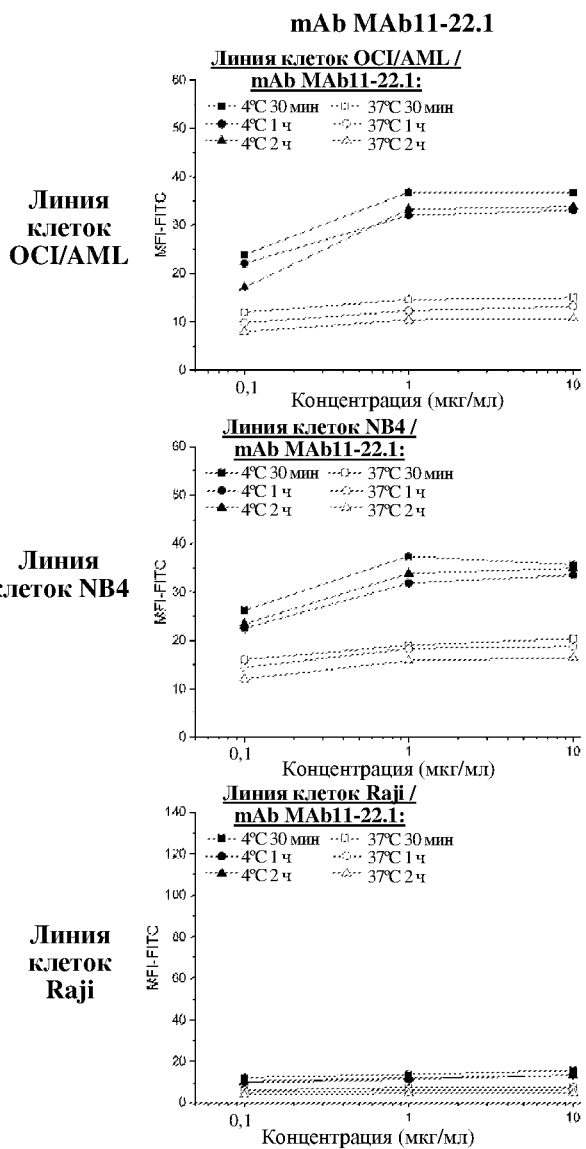
BM
Конъюгированное с PE
антитело к CD233



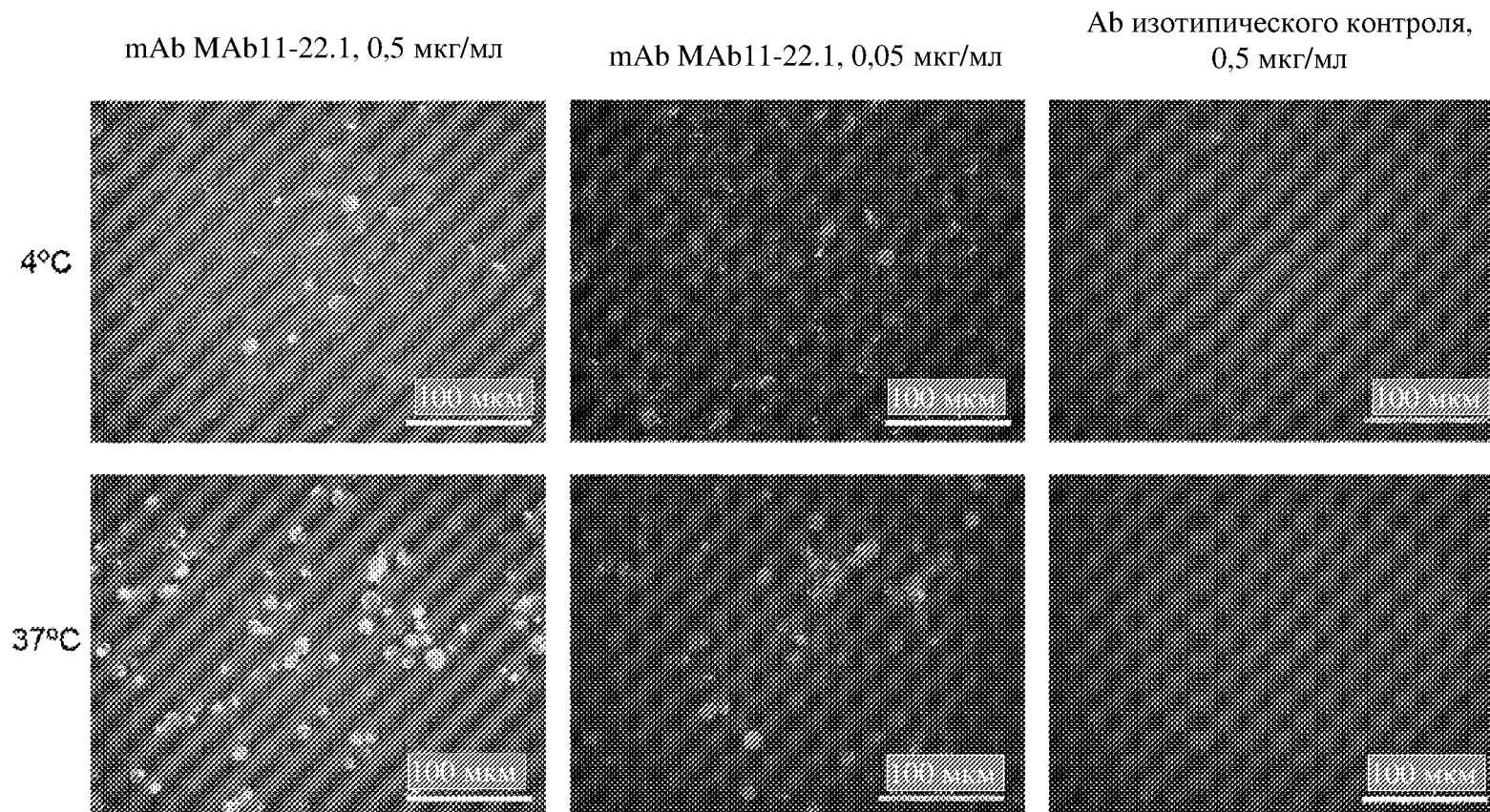
Фиг. 5Е



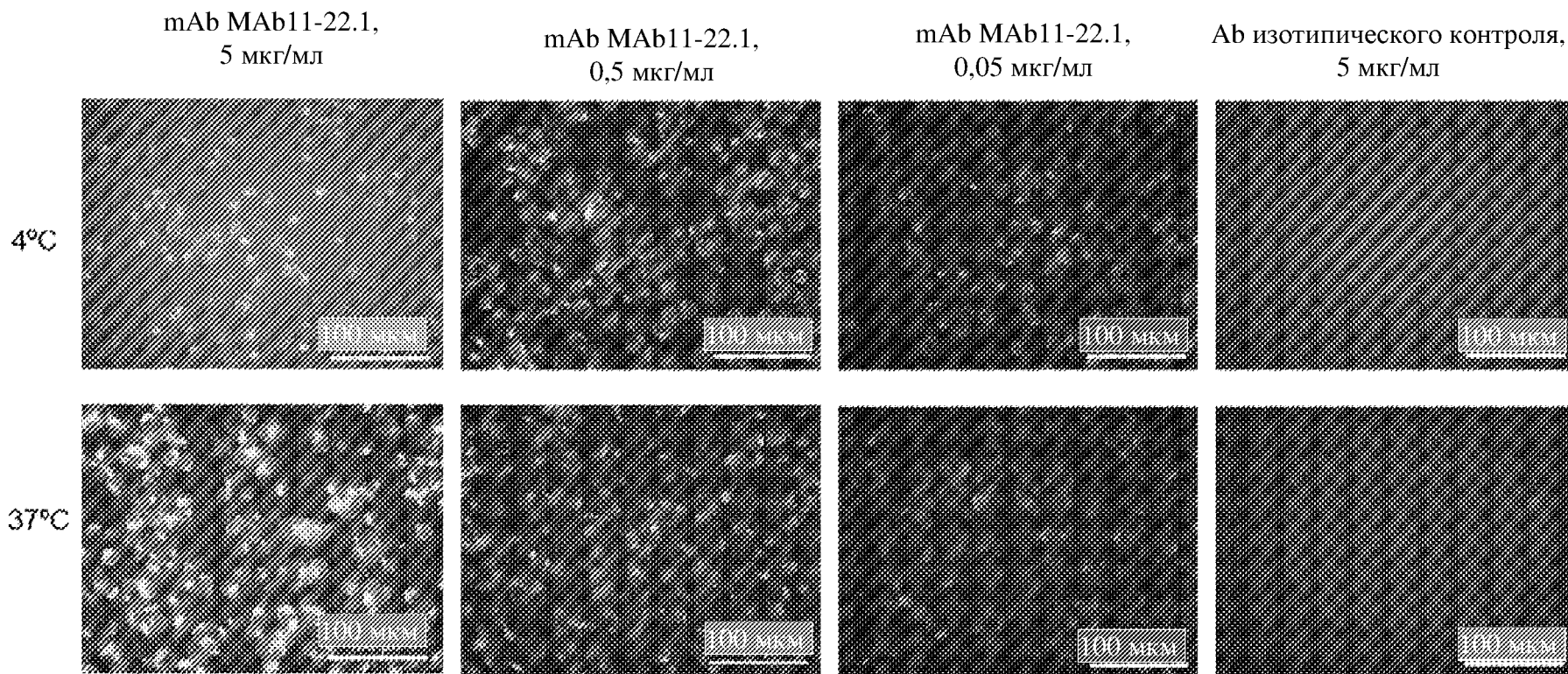
Фиг. 6А



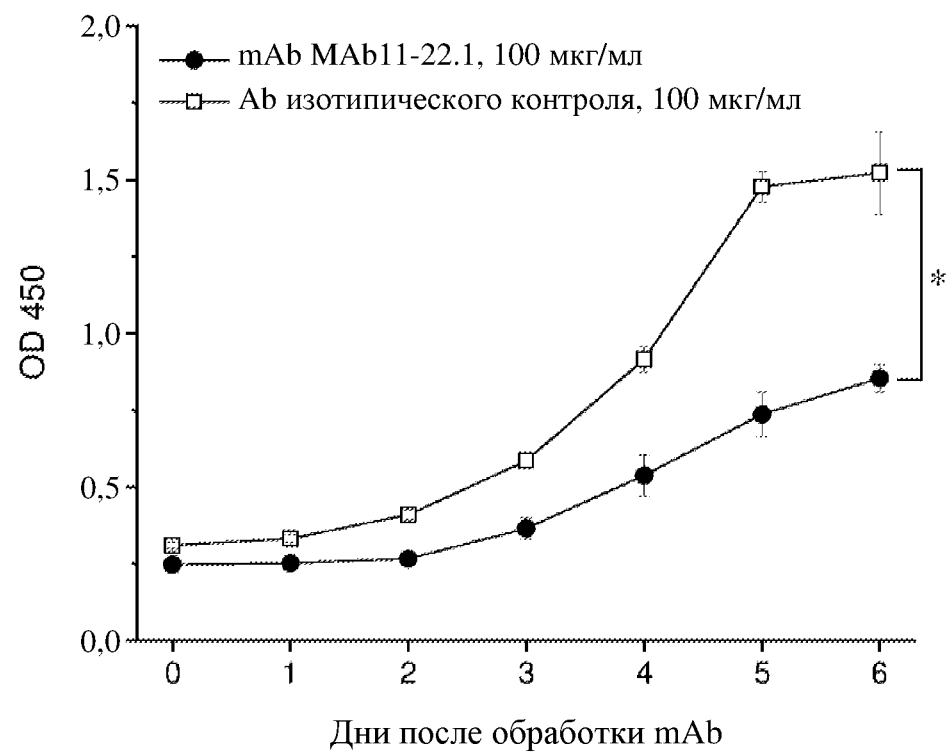
Фиг. 6В



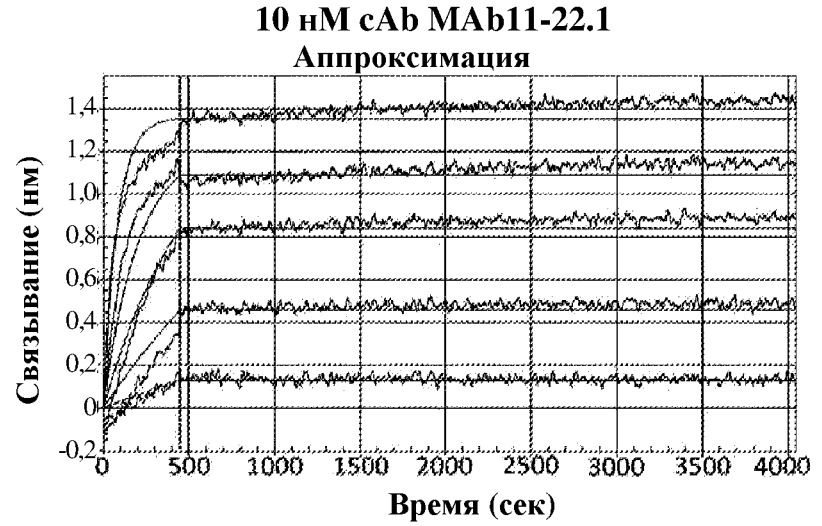
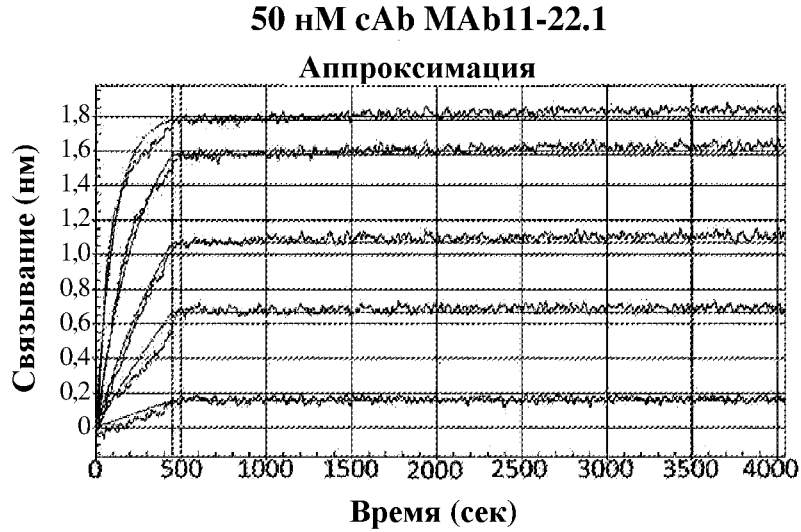
Фиг. 6С



Фиг. 7



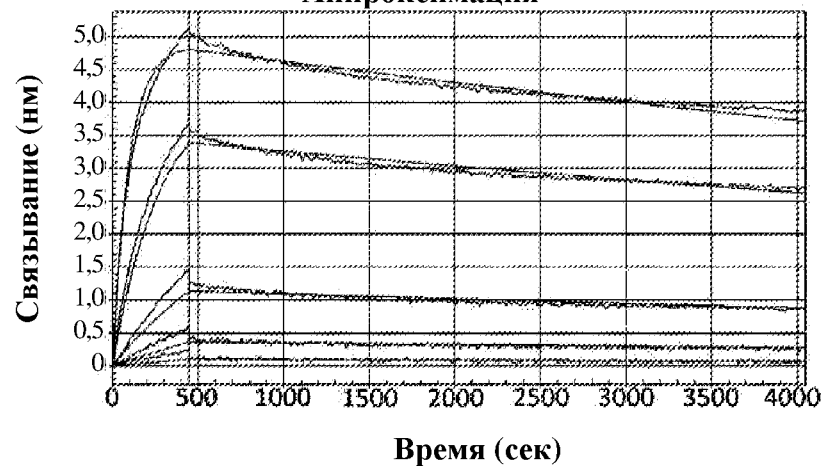
Фиг. 8А



Загрузка	гTfR1-ECD	K_D (М)	Ошибка K_D	k_{on} (1/Мс)	Ошибка k_{on}	k_{off} (1/с)	Ошибка k_{off}	Полный X^2	Полный R^2
сАб МАb11-22.1, 50 нМ	50 нМ	<1,0E-12	3,00E-12	1,96E+05	2,34E+03	<1,0E-07		3,6005	0,9963
	20 нМ	<1,0E-12	3,00E-12	1,96E+05	2,34E+03	<1,0E-07		3,6005	0,9963
	8 нМ	<1,0E-12	3,00E-12	1,96E+05	2,34E+03	<1,0E-07		3,6005	0,9963
	3,2 нМ	<1,0E-12	3,00E-12	1,96E+05	2,34E+03	<1,0E-07		3,6005	0,9963
	1,28 нМ	<1,0E-12	3,00E-12	1,96E+05	2,34E+03	<1,0E-07		3,6005	0,9963
сАб МАb11-22.1, 10 нМ	50 нМ	<1,0E-12	4,38E-12	2,44E+05	5,18E+03	<1,0E-07		6,1851	0,9885
	20 нМ	<1,0E-12	4,38E-12	2,44E+05	5,18E+03	<1,0E-07		6,1851	0,9885
	8 нМ	<1,0E-12	4,38E-12	2,44E+05	5,18E+03	<1,0E-07		6,1851	0,9885
	3,2 нМ	<1,0E-12	4,38E-12	2,44E+05	5,18E+03	<1,0E-07		6,1851	0,9885
	1,28 нМ	<1,0E-12	4,38E-12	2,44E+05	5,18E+03	<1,0E-07		6,1851	0,9885

Фиг. 8В

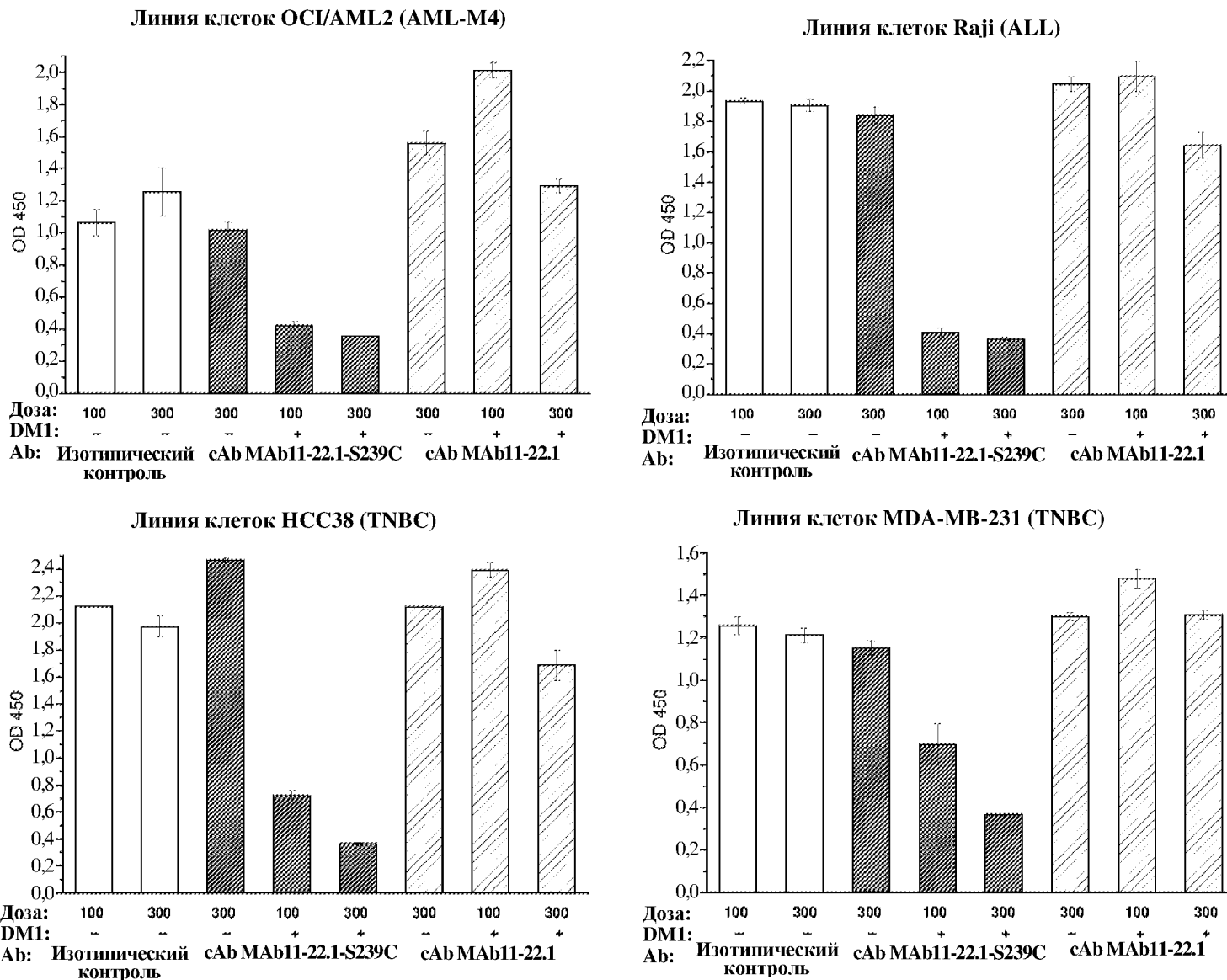
50 нМ сAb МАb11-22.1
Аппроксимация



Загрузка	Fab*	K _D (M)	Ошибка K _D	k _{on} (1/Мс)	Ошибка k _{on}	k _{off} (1/с)	Ошибка k _{off}	Полный X ²	Полный R ²
сAb МАб11-22.1, 50 нМ	300 нМ	2,18E-09	2,88E-11	3,35E+04	3,40E+02	7,28E-05	6,19E-07	14,1253	0,9979
	100 нМ	2,18E-09	2,88E-11	3,35E+04	3,40E+02	7,28E-05	6,19E-07	14,1253	0,9979
	33,3 нМ	2,18E-09	2,88E-11	3,35E+04	3,40E+02	7,28E-05	6,19E-07	14,1253	0,9979
	11,1 нМ	2,18E-09	2,88E-11	3,35E+04	3,40E+02	7,28E-05	6,19E-07	14,1253	0,9979
	3,7 нМ	2,18E-09	2,88E-11	3,35E+04	3,40E+02	7,28E-05	6,19E-07	14,1253	0,9979

*Fab козы к антителу (H+L) человека

Фиг. 9



Фиг. 10

