



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **113838** (13) **C2**
(51) МПК (2017.01)
C07K 16/30 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА ВІНАХІД

(21) Номер заявки: **а 2013 09049**
(22) Дата подання заявки: **19.12.2011**
(24) Дата, з якої є чинними права на винахід: **27.03.2017**
(31) Номер попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **61/459,962**
(32) Дата подання попередньої заявки відповідно до Паризької конвенції: **20.12.2010**
(33) Код держави-учасниці Паризької конвенції, до якої подано попередню заявку: **US**
(41) Публікація відомостей про заявку: **11.11.2013, Бюл.№ 21**
(46) Публікація відомостей про видачу патенту: **27.03.2017, Бюл.№ 6**
(86) Номер та дата подання міжнародної заявки, поданої відповідно до Договору РСТ: **PCT/US2011/065895, 19.12.2011**

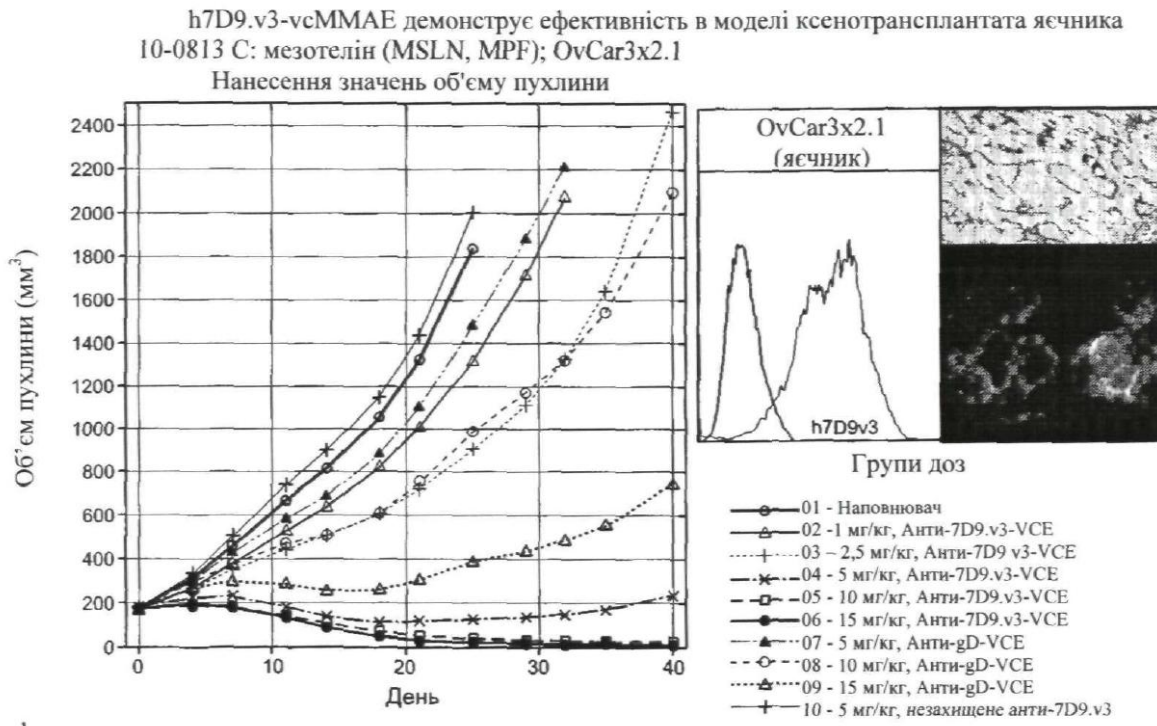
(72) Винахідник(и):
Денніс Марк (US),
Скейлс Сюзанна Дж. (US),
Спенсер Сьюзан Д. (US),
Чжан Інь (US)
(73) Власник(и):
ДЖЕНЕНТЕК, ІНК.,
1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080,
United States of America (US)
(74) Представник:
Мошинська Ніна Миколаївна, реєстр.
№115
(56) Перелік документів, взятих до уваги експертизою:
Masanori Onda New monoclonal antibodies to mesothelin useful for immunohistochemistry, fluorescence-activated cell sorting, Western blotting, and ELISA / Onda Masanori [et al.] // Clinical cancer research, The American association for cancer research, US, Vol. 11, №16, 15 August 2005 (2005-08-15), P. 5840-5846.
Hassan Raffit Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin / Raffit Hassan [et al.] // Cancer immunity, Academy of cancer immunology, CH, Vol. 7. - 16 December 2007 (2007-12-16). - 20 p.
WO 2009045957 A1, 09.04.2009.
WO 2006099141 A2, 21.09.2006.
WO 2010111282 A1, 30.09.2010.
Onda M. Megakaryocyte potentiation factor cleaved from mesothelin precursor is a useful tumor marker in the serum of patients with mesothelioma / M. Onda [et al.] // Clin. cancer res.- Vol. 12. - №14. - 1 July 2006 (2006-07-01). - P. 4225-4231.
WO 2009068204 A1, 04.06.2009.
WO 2009120769 A1, 01.10.2009.
Feng Yang A novel human monoclonal antibody that binds with high affinity to mesothelin-expressing cells and kills them by antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity / Yang Feng [et al.] // Molecular cancer therapeutics, American association of cancer research, US, Vol. 8. - №5. - 1 May 2009 (2009-05-01). - P. 1113-1118.

UA 113838 C2

(54) АНТИТИЛО, ЯКЕ ЗВ'ЯЗУЄ МЕЗОТЕЛІН, ТА ІМУНОКОН'ЮГАТ

(57) Реферат:

Винахід стосується антитіла, яке зв'язує мезотелін, фармацевтичної композиції, що його містить, та імунокон'югата.



Фіг. 28

Споріднені заявки

По даній заявці відповідно до 35 USC 119(e) заявляється пріоритет попередньої заявки № 61/459962, поданої 20 грудня 2010 року, повний опис якої включений в цей документ як посилання.

5 Спосіб послідовностей

Дана заявка містить список послідовностей, який був поданий на розгляд в форматі ASCII за допомогою EFS-Web і включений в повному обсязі як посилання в даний документ. Вказана копія ASCII, створена 29 листопада 2011 р., названа P4532R1-WO.txt і має розмір, який дорівнює 53169 байт.

10 Галузь винаходу

Даний винахід стосується антитіл проти мезотеліну і імунотоксинів, і способів їх застосування.

Передумови створення винаходу

Мезотелін є глікопротеїном клітинної поверхні, який експресується в нормі в мезотелії (очеревині, перикарді і плеврі). Однак експресія мезотеліну значно підвищується в різних типах пухлин. Мезотелін взаємодіє із MUC16 (який називається ще CA125), муциноподібним глікопротеїном, раніше ідентифікованим як антиген пухлини яєчника. MUC16 має позаклітинний домен, що містить принаймні 14000 залишків і характеризується тандемними повторами, розміром 156 амінокислот кожний, які називають муциновими повторами (див., наприклад, 20 O'Brien et al., Tumour Biol. 22:348-366 (2001); Yin et al., J. Biol. Chem. 276:27371-27375 (2001).) Передбачають, що взаємодія між мезотеліном і MUC16 грає роль в адгезії і метастазуванні гетеротипових клітин. (Див., наприклад, Rump et al., J. Biol. Chem. 279:9190-9198 (2004)).

Мезотелін синтезується у вигляді білкового попередника розміром 71 кДа, зріла частина якого експресується на клітинній поверхні. Цей білковий попередник протеолітично розщеплюється фурином на компонент, що від'єднується, розміром 31 кДа (який називається 25 мегакаріоцитарним потенціюючим фактором, або MPF) і компонент мезотеліну розміром 40 кДа. Останній компонент може залишатися пов'язаним із клітинною поверхнею через GPI-зв'язок, але також може бути відщеплений протеолітичним способом.

У даній галузі існує гостра необхідність в речовинах, дія яких націлена на мезотелін для 30 діагностики і лікування пов'язаних із мезотеліном патологічних станів, таких як рак. Даний винахід заповнює цей пробіл і має інші переваги.

Суть винаходу

Даний винахід стосується антитіл проти мезотеліну і імунотоксинів, і способів їх застосування.

У одному із аспектів представлено виділене антитіло, яке зв'язується з мезотеліном, де 35 антитіло вибрано із: (i) антитіла, яке зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить E153 і D174, і яке в деяких випадках має одну або декілька наступних характеристик: (a) не виявляє зниженого зв'язування із глікозилованими формами мезотеліну; (b) не блокує зв'язування мезотеліну із 40 MUC16 і (c) зв'язує мезотелін із афінністю ≤ 5 нМ; (ii) антитіла, яке зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить E211, і яке в деяких випадках має одну або декілька наступних характеристик: (a) не блокує зв'язування мезотеліну із MUC19; і (b) зв'язує мезотелін із афінністю ≤ 5 нМ; і (iii) антитіла, яке зв'язує епітоп в межах амінокислот 1-131 SEQ ID NO:43 і зв'язує мезотелін із афінністю ≤ 5 нМ. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло є моноклональним антитілом. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло є антитілом людини, гуманізованим 45 або химерним антитілом. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло є фрагментом антитіла, яке зв'язує мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу мезотелін є мезотеліном людини із послідовністю SEQ ID NO:43.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло містить: (a) (i) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (ii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність 50 SEQ ID NO:19, і (iii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; (b) (i) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39, (ii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35 і (iii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; або (c) HVR-H3, HVR-L3 і HVR-H2 антитіла, продукованого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У певних варіантах здійснення винаходу антитіло містить (a) (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID 55 NO:20, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, і (iii) HVR-H3 що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; (b) (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, і (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39; або (c) HVR-H1, HVR-H2 і 60 HVR-H3 антитіла, продукованого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-

11464. У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло містить (a) (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, що
 5 містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (vi) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19; (b) (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39, (iv) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (v) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34, і (vi) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; або (c) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (vi) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19, і додатково, який містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність FR2 каркасної ділянки SEQ ID NO:25 і FR3 послідовність SEQ ID NO:27.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло містить (a) (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19; (b) (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34, і (iii) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35; або (c) HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19, і додатково містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність FR2 каркасної ділянки SEQ ID NO: 25 і FR3 послідовність SEQ ID NO:27.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло містить (a) послідовність VH, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8; (b) послідовність VL, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:4; (c) послідовність VH як в (a) і послідовність VL як в (b); послідовність VH, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:16; (e) послідовність VL, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12; (f) послідовність VH як в (d) і послідовність VL як в (e); послідовність VH, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності VH антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464; (h) послідовність VL, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності VL антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464; або (i) послідовність VH як в (g) і послідовність VL як в (h). У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовність VH SEQ ID NO:8, послідовність VH SEQ ID NO:16 або послідовність VH антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У іншому такому варіанті здійснення винаходу антитіло містить послідовність VL SEQ ID NO:4, послідовність VL SEQ ID NO:12, або послідовність VL антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

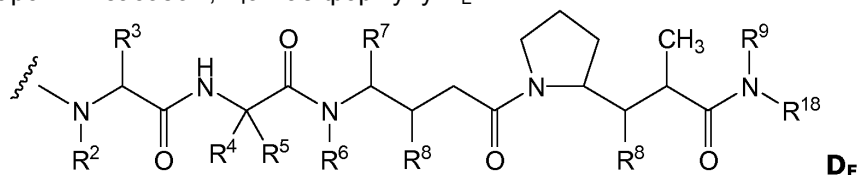
У іншому аспекті винахід стосується антитіла, що містить (a) послідовність VH SEQ ID NO:8 і послідовність VL SEQ ID NO:4; (b) послідовність VH SEQ ID NO:16 і послідовність VL SEQ ID NO:12; (c) послідовність VH і послідовність VL антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464; або (d) антитіло, продукované гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло за будь-яким із вищеперерахованих варіантів здійснення являє собою антитіло IgG1, IgG2a або IgG2b.

У додатковому аспекті винахід являє виділену нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло за будь-яким із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу. У одному із варіантів здійснення винахід стосується клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту. У іншому варіанті здійснення винахід стосується способу отримання антитіла, способу, що містить культивування клітини-хазяїна так, що відбувається продукція антитіла.

У іншому аспекті винахід стосується імунокон'югату формули Ab-(L-D)_p, де:

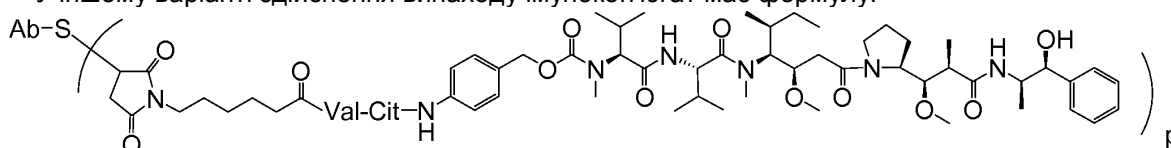
- (a) Ab є антитілом як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу;
 (b) L являє собою лінкер;
 (c) D є лікарським засобом, що має формулу D_E



- і де R² і R⁶ кожна є метилом, R³ і R⁴ кожна є ізопропілом, R⁵ є H, R⁷ є втор-бутилом, кожна R⁸ незалежно вибирається із CH₃, O-CH₃, OH і H; R⁹ є H; і R¹⁸ є -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-арил; і
 (d) p приймає значення від 1 до 8.

У одному із варіантів здійснення винаходу лікарським засобом є ауристатин. У одному із таких варіантів здійснення винаходу лікарським засобом є MMAE. У іншому варіанті здійснення винаходу лінкер має сайт розщеплення протеазою. У одному із таких варіантів здійснення винаходу лінкер містить дипептид val-cit.

У іншому варіанті здійснення винаходу імунокон'югат має формулу:



де S є атомом сірки. У одному із таких варіантів здійснення винаходу p приймає значення від 2 до 5. В іншому такому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (vi) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19. У іншому такому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:39, (iv) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (v) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:4, і (vi) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35. У іншому такому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (a) послідовність VH SEQ ID NO:8 і послідовність VL SEQ ID NO:4. У іншому такому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (b) послідовність VH SEQ ID NO:16 і послідовність VL SEQ ID NO:12.

У іншому аспекті винахід стосується фармацевтичної композиції, що містить імунокон'югат, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення, і фармацевтично прийнятний носій. У одному із варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція додатково містить додаткову терапевтичну речовину. У одному із таких варіантів здійснення винаходу терапевтичним засобом є гемцитабін. У іншому такому варіанті здійснення винаходу додатковим терапевтичним засобом є антитіла проти MUC16, кон'юговані із цитотоксичним агентом.

У додатковому аспекті винахід стосується імунокон'югату, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу для застосування як лікарського засобу. У певних варіантах здійснення винахід стосується імунокон'югату, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу для застосування в лікуванні позитивних по мезотеліну ракових пухлин. У одному із таких варіантів здійснення винаходу позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення вибрано із раку підшлункової залози, раку яєчників, раку легені, раку ендометрія і мезотеліоми. У іншому такому варіанті здійснення винаходу позитивний по мезотеліну рак є раком, позитивним по двох антигенах.

У додатковому аспекті винахід стосується застосування імунокон'югатів, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення, для отримання лікарського препарату. У одному із варіантів здійснення винаходу лікарський препарат призначений для лікування позитивного по мезотеліну раку. У одному із таких варіантів здійснення винаходу позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення вибрано із раку підшлункової залози, раку яєчників, раку легені, раку ендометрія і мезотеліоми. У іншому із таких варіантів здійснення винаходу позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення є раком, позитивним по двох антигенах.

У іншому аспекті винахід стосується способу лікування індивідуума із позитивним по мезотеліну злоякісним новоутворенням, спосіб, що містить призначення індивідууму ефективної

кількості імунокон'югату, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу. У одному із варіантів здійснення позитивне по мезотеліну зляжисне новоутворення вибране із раку підшлункової залози, раку яєчників, раку легені, раку ендометрія і мезотеліоми. У іншому варіанті здійснення винаходу позитивне по мезотеліну зляжисне новоутворення є раком, позитивним по двох антигенах. У іншому варіанті здійснення винаходу спосіб додатково містить призначення додаткового терапевтичного засобу індивідууму. У одному із таких варіантів здійснення винаходу додатковим терапевтичним засобом є гемцитабін. У іншому такому варіанті здійснення винаходу додатковим терапевтичним засобом є антитіло проти MUC16, кон'юговане із цитотоксичним агентом.

У іншому аспекті винахід стосується способу інгібування проліферації позитивної по мезотеліну клітини, спосіб, що містить вплив на клітину імунокон'югату, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу в умовах, придатних для зв'язування імунокон'югату із мезотеліном на поверхні клітини, тим самим інгібуючи проліферацію клітини. У одному із варіантів здійснення винаходу такою клітиною є клітина підшлункової залози, яєчника, легені, мезотеліоми і ендометрія. У іншому варіанті здійснення винаходу ця клітина є позитивною по двох антигенах клітиною.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення, де антитіло кон'юговане із міткою. У одному із варіантів здійснення винаходу міткою є випромінювач позитронів. У одному із таких варіантів здійснення винаходу випромінювачем позитронів є ⁸⁹Zr.

У іншому аспекті винахід стосується способу виявлення мезотеліну людини в біологічному зразку, спосіб, що містить взаємодію біологічного зразка з антитілом проти мезотеліну, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення в умовах, відповідних для зв'язування антитіла проти мезотеліну із природним мезотеліном людини, і детекцію наявності або відсутності комплексу, утвореного антитілом проти мезотеліну і природним мезотеліном людини в біологічному зразку. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну містить (a) HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464; (b) послідовність VH і послідовність VL антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464; або (d) антитіло, продукovanе гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У іншому варіанті здійснення винаходу біологічним зразком є зразок раку підшлункової залози, зразок раку яєчника, зразок раку легені, зразок раку ендометрія або зразок мезотеліоми. У іншому варіанті здійснення винаходу спосіб містить проведення імуногістохімічного аналізу зрізу тканини. У іншому варіанті здійснення винаходу біологічним зразком є сироватка.

У додатковому аспекті винахід стосується способу виявлення позитивного по мезотеліну зляжисного новоутворення, спосіб, що містить призначення міченого антитіла проти мезотеліну, де антитіло проти мезотеліну, як в будь-якому із вищеперерахованих варіантів здійснення, призначене для індивіда, що має або у якого передбачають наявність позитивного по мезотеліну зляжисного новоутворення, і виявлення міченого антитіла проти мезотеліну у індивіда, де виявлення міченого антитіла проти мезотеліну вказує на позитивне по мезотеліну зляжисне новоутворення у індивіда. У одному із варіантів здійснення винаходу мічене антитіло проти мезотеліну містить антитіло проти мезотеліну, кон'юговане із випромінювачем позитронів. У одному із таких варіантів здійснення винаходу випромінювачем позитронів є ⁸⁹Zr.

Короткий опис фігур

На фігурі 1 показано, що мезотелін утворюється шляхом протеолітичного розщеплення білкового попередника із відділенням 31 кДа компонента (званого мегакаріоцитарним потенціюючим фактором, або MPF) і 40 кДа компоненти мезотеліну. Останній компонент може залишатися зв'язаним із клітинною поверхнею, але може також бути відділений. "CHO" означає чотири сайти глікозилювання, один - в MPF і три - в мезотеліні.

На фігурі 2 показано графічне представлення рівнів експресії гена мезотеліну людини в різних тканинах, як описано в Прикладі А.

На фігурі 3 показані властивості моноклональних антитіл проти мезотеліну, виділених, як описано в Прикладі В.

На фігурі 4 показано поєднання мишачих послідовностей варіабельної області легкого ланцюга антитіла 7D9 (mu7D9) і їх гуманізованих варіантів (7D9.v1 і 7D9.v3).

На фігурі 5 показано поєднання мишачих послідовностей варіабельної області важкого ланцюга антитіла 7D9 (mu7D9) і їх гуманізованих варіантів (7D9.v1 і 7D9.v3).

На фігурі 6 показані властивості химерних і гуманізованих варіантів 7D9, як описано в Прикладі С.

На фігурі 7 показано поєднання мишачих послідовностей варіабельної області легкого ланцюга антитіла 22A10 (22A10) і їх гуманізованих варіантів (hu22A10graft і 22A10.v83).

На фігурі 8 показано поєднання мишачих послідовностей варіабельної області важкого ланцюга антитіла 22A10 (22A10) і їх гуманізованих варіантів (hu22A10graft і 22A10.v83).

5 На фігурі 9А показаний аналіз Скетчарда гуманізованих варіантів 22A10 на стабільно трансфікованих мезотеліном клітинах ВJAB, як описано в Прикладі С.

На фігурі 9В показана імунопреципітація мезотеліну під дією гуманізованих варіантів 22A10 із тих же самих стабільно трансфікованих клітин ВJAB, як описано в Прикладі С.

10 На фігурі 10А показані послідовності гіперваріабельних і каркасних областей гуманізованих варіантів 7D9.

На фігурі 10В показані послідовності гіперваріабельних і каркасних областей гуманізованих варіантів 22A10.

На фігурі 11 показана гомологія послідовностей мезотеліну із різних видів, як описано в Прикладі D. На фігурі 11 представлені SEQ ID NO: 43 і 46-48, відповідно, в порядку трапляння.

15 На фігурі 12 показана перехресна реактивність h7D9.v3 і h22A10.v83 із мезотеліном із різних видів, як описано в Прикладі D.

На фігурі 13 показана афінність зв'язування гуманізованих антитіл проти мезотеліну, як визначено аналізом Скетчарда трансфікованих клітинних ліній, стабільно експресуючих мезотелін, і клітинних ліній, експресуючих ендogenous мезотелін, як описано в Прикладі E.

20 На фігурі 14 показані результати конкурентного аналізу антитіла 7D9 або 22A10 і інших моноклональних антитіл, перерахованих на фігурі 3, як описано в Прикладі F.

На фігурі 15 показані конструкти химерного мезотеліну, що використовуються для картування епітопу (накреслені в масштабі), як описано в Прикладі G. На фігурі 15 показані "EVEK", "DAEQ" і "DVER" у вигляді SEQ ID NO:51-53, відповідно.

25 На фігурі 16 показані результати FACS за оцінкою зв'язування 7D9 і 22A10 із клітинами, які експресують химерний мезотелін, як описано в Прикладі G.

На фігурі 17 показана мутаційна стратегія для ідентифікації амінокислот, з якими зв'язуються h7D9.v3 і h22A10.v83, як описано в Прикладі G. На фігурі 17 представлена "EVEK" у вигляді SEQ ID NO:51; "Human132-212", "Cyto132-212", "R^at132-212" і "Mouse132-212" у вигляді SEQ ID NO:54-57, відповідно; людські і мишачі "MUT1", "MUT3", "MUT6", "MUT7", "MUT9", "MUT10", "MUT13" і "MUT15" у вигляді SEQ ID NO:58-73, відповідно; і "STKD" і "SVKD" у вигляді SEQ ID NO:73 і 74, відповідно.

На фігурі 18А показані результати FACS за оцінкою зв'язування h7D9.v3 і h22A10.v83 з клітинами, які експресують мутантні білки мезотеліну людини, як описано в Прикладі G.

35 На фігурі 18В показані результати FACS за оцінкою зв'язування h7D9.v3 із клітинами, які експресують мутантні білки мезотеліну яванської макаки, як описано в Прикладі G.

На фігурі 19 показані ключові амінокислотні залишки в межах епітопів, із якими зв'язуються 7D9/h7D9.v3 і 22A10/h22A10.v83, як описано в Прикладі G. На фігурі 19 представлені SEQ ID NO:54-57, відповідно, в порядку трапляння.

40 На фігурі 20 показано зв'язування h7D9.v3 із глікозилованим мезотеліном, як описано в Прикладі H.

На фігурі 21 показані результати двох аналізів виявлення наявності або відсутності блокування зв'язування мезотеліну із MUC19 під дією антитіл 19C3, 7D9 і 22A10 і навпаки, як описано в Прикладі I.

45 На фігурі 22 показана експресія мезотеліну в протоковій аденокарциномі підшлункової залози способом імуногістохімії (IHC), як описано в Прикладі J.

На фігурі 23 показана експресія мезотеліну в серозній аденокарциномі яєчників способом імуногістохімії (IHC), як описано в Прикладі J.

50 На фігурі 24 показана експресія мезотеліну в аденокарциномі недрібноклітинного раку легені (NSCLC) способом імуногістохімії (IHC), як описано в Прикладі J.

На фігурі 25 показана експресія мезотеліну в тканинах яванської макаки (панелі праворуч) способом імуногістохімії (IHC), як описано в Прикладі J.

На фігурі 26 показано, що імунокон'югат h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність дії в ксенотрансплантаті підшлункової залози HPAC, як описано в Прикладі L.

55 На фігурі 27 показано, що імунокон'югат h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність дії в вихідному ксенотрансплантаті підшлункової залози, як описано в Прикладі M.

На фігурі 28 показано, що імунокон'югат h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність дії в моделі ксенотрансплантата пухлини яєчника, як описано в Прикладі N.

60 На фігурі 29 показано, що імунокон'югат h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність дії в моделі ксенотрансплантата плоскоклітинної карциноми легені, як описано в Прикладі O.

На фігурі 30 показано, що ефективність дії імунокон'югату h7D9.v3-vcMMAE відносно мезотеліну людини подібно такому імунокон'югату h22A10.v83-vcMMAE відносно мезотеліну яванської макаки в пухлинних моделях ксенотрансплантата трансфікованих клітин BJAB, як описано в Прикладі Р.

5 На фігурі 31 показано, що ефективність дії імунокон'югату h7D9.v3-vcMMAE подібно такому імунокон'югату h22A10.v83-vcMMAE в мезотеліомі і моделях пухлини яєчника, як описано в Прикладі Р.

На фігурі 32 показано, що MUC16 утворює комплекс із мезотеліном, і два білки спільно відділяються від клітинних ліній, позитивних по двох антигенах, як описано в Прикладі Q.

10 На фігурі 33 показано, що 19C3, але не 7D9, витісняє заздалегідь зв'язаний MUC16 від мезотеліну.

Докладний опис варіантів здійснення винаходу

I. Визначення

15 "Акцепторна каркасна ділянка людини" в рамках цього документа є каркасною ділянкою, що містить амінокислотну послідовність каркасної ділянки варіабельного домену легкого ланцюга (VL) або каркасної ділянки варіабельного домену важкого ланцюга (VH) із каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, як вказано нижче. Акцепторна каркасна ділянка людини, "отримана із" каркасної ділянки імуноглобуліну людини або консенсусної каркасної ділянки людини, може містити ту ж саму амінокислотну 20 послідовність вищезгаданого, або вона може містити зміни амінокислотної послідовності. У деяких варіантах здійснення винаходу число амінокислотних замін становить 10 або менше, 9 або менше, 8 або менше, 7 або менше, 6 або менше, 5 або менше, 4 або менше, 3 або менше, або 2 або менше. У деяких варіантах здійснення винаходу акцепторна каркасна ділянка людини VL ідентична послідовності каркасної ділянки VL імуноглобуліну людини або послідовності 25 консенсусної каркасної ділянки людини.

"Афінність" стосується сили сумарних нековалентних взаємодій між одиничним сайтом зв'язування молекули (наприклад, антитіла) і його партнером зв'язування (наприклад, антигеном). Якщо не вказано інше, "афінність зв'язування" в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, стосується властивості афінності зв'язування, яка 30 відображає взаємодію 1:1 між членами пари зв'язування (наприклад, антитілом і антигеном). Афінність молекули X для її партнера Y може загалом бути охарактеризована константою дисоціації (K_d). Афінність може бути виміряна загальноприйнятими способами, відомими в даній галузі техніки, включаючи такі, описані в цьому документі. Конкретні ілюстративні і типові варіанти здійснення для вимірювання афінності зв'язування описані нижче.

35 Антитіло із "дозрілою афінністю" стосується антитіла із однією або декількома змінами в одній або декількох гіперваріабельних ділянках (HVR) в порівнянні із вихідним антитілом, якому не властиві такі зміни, що приводять до поліпшення афінності зв'язування антитіла з антигеном.

Терміни "антитіло проти мезотеліну" і "антитіло, яке зв'язується з мезотеліном" стосуються антитіла, яке здатне зв'язувати мезотелін із достатньою афінністю, завдяки чому антитіло може 40 бути ефективним як діагностичний і/або терапевтичний засіб при направленому впливі на мезотелін. У одному із варіантів здійснення винаходу ступінь зв'язування антитіла проти мезотеліну із білком, відмінним від мезотеліну, складає приблизно менше 10 % зв'язування даного антитіла із мезотеліном згідно із вимірюваннями, наприклад, радіоімуноаналізу (RIA). У певних варіантах здійснення винаходу антитіло, яке зв'язується з мезотеліном, має константу дисоціації (K_d) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М). У певних 45 варіантах здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну зв'язується з епітопом мезотеліну, який консервативний у мезотелінів із різних біологічних видів.

Термін "антитіло" використовується в цьому документі в самому широкому значенні слова і охоплює різні структури антитіла, включаючи, крім іншого, моноклональні антитіла, 50 поліклональні антитіла, мультиспецифічні антитіла (наприклад, біспецифічні антитіла) і фрагменти антитіла за умови, що вони виявляють необхідну антигензв'язувальну активність.

"Фрагмент антитіла" стосується молекули, відмінної від інтактного антитіла, яка містить частину інтактного антитіла і зв'язує антиген, із яким зв'язується інтактне антитіло. Приклади 55 фрагментів антитіла включають, крім іншого, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, діатіла; лінійні антитіла; одноланцюжкові молекули антитіла (наприклад, scFv); і мультиспецифічні антитіла, утворені із фрагментів антитіла.

"Антитіло, яке зв'язується із тим же самим епітопом", що і контрольне антитіло, стосується антитіла, яке блокує зв'язування контрольного антитіла із його антигеном в конкурентному 60 аналізі на 50 % або більше, і навпаки, контрольне антитіло блокує зв'язування антитіла із його

антигеном в конкурентному аналізі на 50 % або більше. Типовий конкурентний аналіз представлений в цьому документі.

Терміни "злаякісне новоутворення" або "рак" стосуються фізіологічного стану або його описують у ссавців, що звичайно характеризується нерегульованим клітинним зростанням/проліферацією. Приклади раку включають, крім іншого, карциному, лімфому (наприклад, лімфому Ходжкіна і неходжкінську лімфому), бластоми, саркому і лейкомію. Більш приватні приклади таких злаякісних пухлин включають плоскоклітинний рак, дрібноклітинний рак легені, недрібноклітинний рак легені, аденокарциному легені, плоскоклітинну карциному легені, рак очеревини, гепатоцелюлярний рак, рак шлунково-кишкового тракту, рак підшлункової залози, гліому, рак шийки матки, рак яєчника, рак печінки, рак сечового міхура, гепатому, рак молочної залози, рак товстої кишки, рак товстої і прямої кишок, карциному ендометрія або матки, карциному слинних залоз, рак нирки, рак печінки, рак простати, рак вульви, рак щитовидної залози, печінкову карциному, лейкомію і інші лімфопроліферативні порушення, і різні типи раку голови і шиї.

Термін "химерне" антитіло стосується антитіла, в якому частина важкого і/або легкого ланцюга отримана із певного джерела або виду, в той час як частина важкого і/або легкого ланцюга, що залишилася, отримана із іншого джерела або виду.

"Клас" антитіла стосується типу константного домену або константної області, що були у важкого ланцюга. Існує п'ять основних класів антитіл: IgA, IgD, IgE, IgG і IgM, і деякі із них можуть бути додатково розділені на підкласи (ізотипи), наприклад, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁ і IgA₂. Константні домени важкого ланцюга, які відповідають різним класам імуноглобулінів, називаються α, δ, ε, γ і μ, відповідно.

Термін "цитотоксичний агент" в тому значенні, в якому він тут використовується, стосується речовини, яка інгібує або запобігає клітинній функції і/або викликає загибель або руйнування клітини. Цитотоксичні агенти включають, крім іншого, радіоактивні ізотопи (наприклад, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² і радіоактивні ізотопи Lu); хіміотерапевтичні засоби або лікарські препарати (наприклад, метотрексат, адриаміцин, алкалоїди барвінку (вінкристин, вінбластин, етопозид), доксорубіцин, мелфалан, мітоміцин C, хлорамбуцил, даунорубіцин або інші інтеркалюючі агенти); інгібітори росту; ферменти і їх фрагменти, такі як нуклеолітичні ферменти; антибіотики; токсини, такі як низькомолекулярні токсини або токсини, які мають ферментативну активність, бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження, включаючи фрагменти і/або варіанти вищезазначеного; і різні протипухлинні або протиракові засоби, розглянуті нижче.

Термін "позитивне по двох антигенах злаякісне новоутворення" стосується злаякісної пухлини, що містить клітини, які позитивні як по мезотеліну, так і по MUC16.

Термін "позитивна по двох антигенах клітина" стосується клітини, яка експресує як мезотелін, так і MUC16 на своїй поверхні.

"Ефекторні функції" стосуються тієї біологічної активності, властивої області Fc антитіла, які варіюють залежно від ізотипу антитіла. Приклади ефекторних функцій антитіла включають: зв'язування C1q і комплемент-залежну цитотоксичність (CDC); зв'язування рецептора Fc; антитілозалежну клітинно-опосередковану цитотоксичність (ADCC); фагоцитоз; зниження регуляції рецепторів клітинної поверхні (наприклад, B-клітинного рецептора); і B-клітинну активацію.

"Ефективна кількість" речовини, наприклад, фармацевтичної композиції, стосується кількості, ефективною в дозуванні і протягом необхідних періодів часу для досягнення необхідного терапевтичного або профілактичного результату.

Термін "епітоп" стосується певної ділянки на молекулі антигену, з якою зв'язується антитіло.

Термін "Fc-область" в цьому документі використовується для визначення C-кінцевої області важкого ланцюга імуноглобуліну, яка містить принаймні частину константної області. Термін містить нативну послідовність Fc-областей і відмінні від неї Fc-області. У одному із варіантів здійснення винаходу Fc-область важкого ланцюга IgG людини простягається від Cys226, або від Pro230, до карбоксильного кінця важкого ланцюга. Однак C-кінцевий лізин (Lys447) Fc-області може бути присутнім або відсутнім. Якщо інше не вказане в цьому документі, нумерацію амінокислотних залишків в Fc-області або константній області здійснюють відповідно до нумераційної системи EU, яка також називається індексом EU, як описано в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Каркасна ділянка" або "FR" стосується залишків варіабельного домену, відмінних від залишків гіперваріабельної області (HVR). FR варіабельного домену, в основному, складається

із чотирьох доменів FR: FR1, FR2, FR3 і FR4. Відповідно, послідовності HVR і FR, як правило, з'являються в наступній послідовності в VH (або VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Терміни "повнорозмірне антитіло", "інтактне антитіло" і "ціле антитіло" використовуються в цьому документі взаємозамінно відносно антитіла, що має структуру, значною мірою схожу із
5 структурою нативного антитіла, або що має важкі ланцюги, які містять Fc-область, як указано в цьому документі.

Термін "глікозиловані форми мезотеліну" стосується природних форм мезотеліну, які модифікуються на пост-трансляційному рівні шляхом додавання вуглеводних залишків.

Терміни "клітина-хазяїн", "клітинна лінія-хазяїн" і "клітинна культура-хазяїн"
10 використовуються взаємозамінно і стосуються клітин, в які була введена екзогенна нуклеїнова кислота, включаючи потомство таких клітин. Клітини-хазяїни включають "трансформанти" і "трансформовані клітини", які включають вихідну трансформовану клітину і потомство, отримане із неї без урахування числа пасажів. Потомство може не бути повністю ідентичним вихідній клітині за вмістом нуклеїнової кислоти, але може містити мутації. Мутантне потомство,
15 яке має ті ж самі функції або біологічну активність, класифіковану або відібрану в спочатку трансформованій клітині, включене в цей документ.

"Антитіло людини" являє собою антитіло, яке має амінокислотну послідовність, яка відповідає антитілу, продукованому людиною або клітиною людини або отримано із відмінного від людини джерела, яке використовує репертуар антитіл людини або інші кодуєчі антитіло
20 послідовності людини. Це визначення антитіла людини виключає гуманізоване антитіло, що містить антигензв'язуючі залишки, відмінні від таких людини.

"Консенсусна каркасна область людини" є каркасною областю, яка є амінокислотними залишками, що найчастіше зустрічаються при відборі послідовностей каркасної області VL або VH імуноглобуліну людини. Як правило, відбір послідовностей VL або VH імуноглобуліну
25 людини здійснюють із підгрупи послідовностей варіабельного домену. Як правило, підгрупа послідовностей є підгрупою, як в Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. В одному із варіантів здійснення винаходу для VL, підгрупа є підгрупою каппа I, як в Kabat et al., див. вище. У одному із варіантів здійснення винаходу для VH, підгрупа є підгрупою III, як в Kabat et al., див. вище.

"Гуманізоване" антитіло стосується химерного антитіла, що містить амінокислотні залишки із HVR, відмінних від людських, і амінокислотні залишки із FR людини. У певних варіантах здійснення винаходу гуманізоване антитіло містить практично весь принаймні один, і звичайно два, варіабельні домени, де всі або практично всі HVR (наприклад, CDR) відповідають таким
30 антитіла, відмінного від людського, і всі або практично всі FR відповідають таким антитілам людини. Гуманізоване антитіло в деяких випадках може включати принаймні частину константної області антитіла, отриманої із антитіла людини. "Гуманізована форма" антитіла, наприклад, відмінне від людини антитіло, стосується антитіла, яке піддавалось гуманізації.

Термін "гіперваріабельна ділянка" або "HVR" в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, стосується кожної із ділянок варіабельного домену антитіла, які є гіперваріабельними по послідовності і/або утворюють задані структурою петлі ("гіперваріабельні
40 петлі"). Як правило, нативні чотириланцюжкові антитіла включають шість HVR; три в VH (H1, H2, H3) і три в VL (L1, L2, L3). HVR, як правило, включають амінокислотні залишки із гіперваріабельних петель і/або із "областей, які визначають комплементарність" (CDR), при цьому останні із згаданих мають найбільшу варіабельність послідовності і/або залучені до розпізнавання антигену. Типові гіперваріабельні петлі утворені амінокислотними залишками 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2) і 96-101 (H3). (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)). Типові CDR (CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3, CDR-H1, CDR-H2 і CDR-H3) утворені амінокислотними залишками 24-34 області L1, 50-56 області L2, 89-97 області L3, 31-35B області H1, 50-65 області H2 і 95-102 області H3. (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). За винятком CDR1 в VH, CDR, як правило, включають амінокислотні залишки, утворюючі гіперваріабельні петлі. CDR також включають "залишки, які визначають специфічність" або "SDR", які є залишками, взаємодіючими із антигеном. SDR знаходяться всередині областей CDR, умовно названими-CDR, або a-CDR. Типові a-CDR (a-CDR-L1, a-CDR-L2, a-CDR-L3, a-CDR-H1, a-CDR-H2 і a-CDR-H3) утворені амінокислотними залишками 31-34
55 області L1, 50-55 області L2, 89-96 області L3, 31-35B області H1, 50-58 області H2 і 95-102 області H3 (див. Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)). Якщо не вказане інше, залишки HVR і інші залишки у варіабельному домені (наприклад, залишки FR) пронумеровані в цьому документі відповідно до Kabat et al., див. вище.

"Імунокон'югат" є антитілом, кон'югованим із однією або декількома гетерологічними молекулами, включаючи, крім іншого, цитотоксичний агент.

"Індивідуум" або "індивід" є ссавцем. Ссавці включають, крім іншого, домашніх тварин (наприклад, корів, овець, кішок, собак і коней), приматів (наприклад, людей і відмінних від людини приматів, як, наприклад, мавп), кроликів і гризунів (наприклад, мишей і щурів). У певних варіантах здійснення, індивідуумом або індивідом є людина.

"Виділене антитіло" являє собою антитіло, яке було відділене від домішки його природного оточення. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіло очищають до більше, ніж 95 % або 99 % ступеня чистоти, що визначається, наприклад, електрофоретичними (наприклад, SDS-PAGE, ізоелектричне фокусування (IEF), капілярний електрофорез) або хроматографічними (наприклад, іонно-обмінна або зворотно-фазова HPLC) способами. Для детального розгляду способів оцінки чистоти антитіл див., наприклад, Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007).

"Виділена нуклеїнова кислота" стосується молекули нуклеїнової кислоти, яка була відділена від домішки її природного оточення. Виділена нуклеїнова кислота містить молекулу нуклеїнової кислоти, що міститься в клітинах, які, як правило, містять молекулу нуклеїнової кислоти, але молекула нуклеїнової кислоти знаходиться поза хромосою або має хромосомну локалізацію, відмінну від її природної хромосомної локалізації.

"Виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло проти мезотеліну", стосується однієї або декількох молекул нуклеїнової кислоти, що кодують важкі і легкі ланцюги антитіла (або їх фрагменти), включаючи таку(і) молекулу(и) нуклеїнової кислоти в складі одиничного вектора або окремих векторів, і таку(і) молекулу(и) нуклеїнової кислоти, що має(ють) одну або декілька локалізацій в клітині-хазяїні.

Термін "мезотелін" в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, стосується будь-якого природного, зрілого мезотеліну, утвореного внаслідок процесингу білкового попередника мезотеліну в клітині. Термін містить мезотелін із будь-яких хребетних, включаючи ссавців, таких як примати (наприклад, люди і яванські макаки) і гризуни (наприклад, миші і щури), якщо не вказане інше. Термін також містить природні варіанти мезотеліну, наприклад, варіанти сплайсингу або алельні варіанти. Амінокислотна послідовність типового білкового попередника мезотеліну людини наведена в SEQ ID NO:42, і типовий мезотелін людини наведена в SEQ ID NO:43. Додаткові типові послідовності мезотеліну описані в цьому документі.

Термін "позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення" стосується злоякісної пухлини, що містить клітини, які експресують мезотелін на своїй поверхні.

Термін "позитивна по мезотеліну клітина" стосується клітини, якої експресує мезотелін на своїй поверхні.

Термін "моноклональне антитіло" в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, стосується антитіла, отриманого із популяції значною мірою гомогенних антитіл, тобто, індивідуальні антитіла, що входять до складу популяції, ідентичні і/або зв'язують один і той же епітоп, за винятком можливих варіантних антитіл, наприклад, що містять мутації, що зустрічаються в природі або виникаючих під час виробництва препаратів моноклонального антитіла, при цьому такі варіанти антитіл в основному присутні в слідових кількостях. На відміну від препаратів поліклональних антитіл, які звичайно включають різні антитіла, направлені проти різних детермінант (епітопів), кожне моноклональне антитіло препарату моноклонального антитіла направлено проти однієї детермінанти антигену. Таким чином, визначення "моноклональне" вказує на властивість антитіла, отриманого із практично гомогенної популяції антитіл, і не повинно бути витлумачене як таке, що вимагає виробництва антитіла яким-небудь конкретним способом. Наприклад, моноклональні антитіла, що підлягають використанню відповідно до даного винаходу, можуть бути отримані різними методиками, включаючи, крім іншого, гібридомну технологію, біотехнологію на основі рекомбінантної ДНК, способи фагового дисплея і способи застосування трансгенних тварин, що містять всі або частину локусів імунoglobulin людини, при цьому такі способи або інші типові способи створення моноклональних антитіл описані в цьому документі.

Термін "позитивне по MUC16 злоякісне новоутворення" стосується злоякісної пухлини, що містить клітини, які експресують MUC16 на своїй поверхні.

Термін "позитивна по MUC16 клітина" стосується клітини, яка експресує MUC16 на своїй поверхні.

"Незахищене антитіло" стосується антитіла, яке не кон'юговане із гетерологічною молекулою (наприклад, цитотоксичним агентом) або радіоактивною міткою. Незахищене антитіло може входити до складу фармацевтичної композиції.

"Нативні антитіла" стосуються молекул природних імуноглобулінів із різною структурою. Наприклад, нативні антитіла IgG є гетеротетрамерними глікопротеїнами масою приблизно 150000 дальтон, що складаються із двох ідентичних легких ланцюгів і двох ідентичних важких ланцюгів, які зв'язані між собою дисульфідними містками. Від N- до C-кінця кожний важкий ланцюг має варіабельну ділянку (VH), яка також називається варіабельним доменом важкого ланцюга, за яким йдуть три константні домени (CH₁, CH₂ і CH₃). Подібним чином, від N- до C-кінця кожний легкий ланцюг має варіабельну ділянку (VL), яка також називається варіабельним доменом легкого ланцюга, за яким йде константний легкий (CL) домен. Легкий ланцюг антитіла може бути віднесений до одного із двох типів, званих каппа (κ) і лямбда (λ), на основі амінокислотної послідовності їх константного домену.

Термін "вкладиш" використовується відносно інструкцій, звичайно вкладених в комерційні упаковки терапевтичних продуктів, які містять інформацію про свідчення до застосування, використання, дозування, способи застосування, комбінованої терапії, протипоказаннях і/або запобіжних засобах, що стосуються використання таких терапевтичних продуктів.

"Процент (%) ідентичності амінокислотної послідовності" в порівнянні із контрольною послідовністю поліпептиду визначають як процент амінокислотних залишків в послідовності, яка представляє інтерес, які ідентичні амінокислотним залишкам в контрольній послідовності поліпептиду, після поєднання послідовностей і внесення пропусків, у випадку необхідності, для досягнення максимального процента ідентичності послідовності, і не розглядаючи будь-які консервативні заміни як частину ідентичності послідовності. Поєднання з метою визначення процента ідентичності амінокислотної послідовності може бути досягнуто різними шляхами, які знаходяться в рамках знань в даній галузі техніки, наприклад, використовуючи загальнодоступні комп'ютерні програми, такі як BLAST, BLAST-2, ALIGN або Megalign (DNASTAR) програми. Фахівці в даній галузі техніки можуть визначити придатні параметри для поєднання послідовностей, включаючи будь-які алгоритми, необхідні для досягнення максимального поєднання по всій довжині послідовностей, що підлягають порівнянню. У рамках цього документа, однак, значення % ідентичності амінокислотної послідовності отримують, використовуючи комп'ютерну програму порівняння послідовностей ALIGN-2. Авторські права на комп'ютерну програму порівняння послідовностей ALIGN-2 має Genentech, Inc., і текст програми був поданий разом із документацією по використанню у відомство з охорони авторського права США, Washington D.C., 20559, де він був зареєстрований під реєстраційним номером реєстрації авторського права США TXU510087. Програма ALIGN-2 загальнодоступна в Genentech, Inc., South San Francisco, California або може бути скопійована із тексту програми. Програма ALIGN-2 може бути скопійована для використання в операційній системі UNIX, включаючи цифровий UNIX V4.0D. Всі параметри порівняння послідовностей задані в програмі ALIGN-2 і не змінюються.

У випадках, коли ALIGN-2 застосовують для порівняння амінокислотних послідовностей, % ідентичності послідовності амінокислот даної амінокислотної послідовності A по відношенню, з або залежно від даної амінокислотної послідовності B (що альтернативно може бути сформульовано як дана амінокислотна послідовність A, яка має або містить певний % ідентичності послідовності амінокислот відносно, з або залежно від даної амінокислотної послідовності B) обчислюють таким чином:

100 помножити на частку X/Y,

де X являє собою число амінокислотних залишків, розраховане як ідентичні пари програмою поєднання послідовностей ALIGN-2 при поєднанні A і B в даній програмі, і де Y являє собою загальне число амінокислотних залишків в B. Слід розуміти, що у випадку, якщо довжина амінокислотної послідовності A не дорівнює довжині амінокислотної послідовності B, % ідентичності послідовності амінокислот A відносно B не буде дорівнювати % ідентичності послідовності амінокислот B відносно A. Якщо спеціально не указано інше, всі значення % ідентичності послідовності амінокислот, що використовуються в цьому документі, отримують, як описано в попередньому абзаці, використовуючи комп'ютерну програму ALIGN-2.

Термін "фармацевтична композиція" стосується препарату, який знаходиться в такій лікарській формі, щоб біологічна активність активного інгредієнта, що міститься в ній, була ефективною, і який не містить додаткових компонентів, які є недопустимо токсичними для індивіда, якому призначають дану композицію.

"Фармацевтично прийнятний носій" стосується інгредієнта в фармацевтичній композиції, відмінного від активного інгредієнта, який є нетоксичним для індивіда. Фармацевтично прийнятний носій містить, крім іншого, буфер, допоміжну речовину, стабілізатор або консервант.

"Лікування" (і його граматичні варіації, такі як "лікувати" або "що лікує") в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, стосується клінічного втручання в спробі змінити

природний хід хвороби індивідуума, що підлягає лікуванню, і може бути виконано або в профілактичних цілях, або під час протікання клінічної патології. Бажані ефекти лікування включають, крім іншого, запобігання вияву або повторному вияву захворювання, часткове зняття симптомів, зменшення яких-небудь прямих або непрямих патологічних наслідків захворювання, запобігання метастазуванню, зниження швидкості прогресування захворювання, поліпшення або тимчасове полегшення стану захворювання, і ремісію або поліпшений прогноз. У деяких варіантах здійснення винаходу антитіла за винаходом використовуються для затримки розвитку захворювання або для сповільнення прогресування захворювання.

Термін "варіабельна ділянка" або "варіабельний домен" стосується домену важкого або легкого ланцюга антитіла, який залучений до зв'язування антитіла з антигеном. Варіабельні домени важкого ланцюга і легкого ланцюга (VH і VL, відповідно) природного антитіла, в основному, мають схожі структури, де кожний домен містить чотири консервативні каркасні області (FR) і три гіперваріабельні ділянки (HVR). (Див., наприклад, Kindt et al. *Kubi Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007).) Одиначний домен VH або VL може виявитися достатнім для придання антигензв'язуючої специфічності. Більш того антитіла, які зв'язують певний антиген, можуть бути виділені, використовуючи домен VH або VL із антитіла, який зв'язує антиген для скринінгу бібліотеки комплементарних доменів VL або VH, відповідно. Див., наприклад, Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 (1993); Clarkson et al., *Nature* 352:624-628 (1991).

Термін "вектор" в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, стосується молекули нуклеїнової кислоти, здатної розмножати іншу нуклеїнову кислоту, до якої вона приєднана. Термін містить вектор як структура нуклеїнової кислоти, яка самореплікується, а також вектор, вбудований в геном клітини-хазяїна, в яку він був введений. Певні вектори здатні керувати експресією нуклеїнової кислоти, із якою вони функціонально зв'язані. Такі вектори називаються в цьому документі "експресійними векторами".

II. Композиції і способи

У одному із аспектів, винахід оснований, частково, на антитілах, які зв'язуються з мезотеліном, і імунокон'югатах, які містять такі антитіла. Антитіла і імунокон'югати за винаходом придатні, наприклад, для діагностики або лікування позитивних по мезотеліну злоякісних пухлин.

A. Типові антитіла проти мезотеліну

У одному із аспектів, винахід являє виділені антитіла, які зв'язують мезотелін. Природний мезотелін з'являється внаслідок розщеплення білкового попередника мезотеліну в клітині, утворюючи мезотелін і мегакаріоцитарний потенціюючий фактор (MPF), як показано на фігурі 1. Мезотелін містить укорочення С-кінця відносно білка-попередника. Таке укорочення може зумовлювати зв'язування якоря GPI. Мезотелін може залишатися пов'язаним із клітинною поверхнею, наприклад, через якір GPI, або мезотелін може від'єднуватися від клітини (наприклад, якір GPI може розщеплюватися досі не ідентифікованим ферментом) із утворенням мезотеліну, який відщепився, в клітинній культурі або сироватці крові тварин.

Типова послідовність білкового попередника природної мезотеліну людини представлена як SEQ ID NO:42, і відповідна послідовність мезотеліну представлена як SEQ ID NO:43 (відповідаючи амінокислотам 296-580 SEQ ID NO:42). Альтернативна послідовність мезотеліну відповідає амінокислотам 296-598 SEQ ID NO:42. SEQ ID NO:44 являє собою природний варіант SEQ ID NO:42, результатом процесинга якого є мезотелін, що має послідовність SEQ ID NO:45. SEQ ID NO:45 містить вставку із восьми амінокислотних залишків в позиції 116 амінокислоти відносно SEQ ID NO:43. Альтернативна форма мезотеліну, представлена в SEQ ID NO:45, мабуть, становить ~5 % транскриптів мезотеліну в пухлинних клітинних лініях.

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну має щонайменше одну або декілька наведених нижче властивостей в будь-якому поєднанні:

(a) зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить (i) E153 і D174 або (ii) E211;

(b) виявляє або не виявляє змінене або зменшене зв'язування із різними глікозилованими формами мезотеліну;

(c) блокує або не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16;

(d) зв'язує мезотелін з афінністю ≤ 5 нМ, або альтернативно ≤ 1 нМ, або альтернативно $\leq 0,5$ нМ, або альтернативно $\leq 0,1$ нМ, і в деяких випадках $\geq 0,0001$ нМ. У будь-якому із вищенаведених варіантів здійснення винаходу антитіло, яке не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16, являє собою антитіло, яке посилює зв'язування мезотеліну із MUC16.

У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить E153 і D174. У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло

проти мезотеліну додатково має одну або декілька нижченаведених властивостей в будь-якому поєднанні:

- (a) не виявляє зменшене зв'язування із глікозилованими формами мезотеліну;
- (b) не блокує зв'язування мезотеліну з MUC16;
- 5 (c) зв'язує мезотелін із афінністю ≤ 5 нМ, або альтернативно ≤ 1 нМ, або альтернативно $\leq 0,5$ нМ, і в деяких випадках $\geq 0,0001$ нМ.

У таких варіантах здійснення винаходу антитіло, яке не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16, посилює зв'язування мезотеліну із MUC16 і/або антитіло зв'язується із афінністю ≤ 1 нМ. Характерне антитіло, що має наведені вище властивості, є 7D9, і його гуманізовані варіанти, такі як h7D9.v3, розглянуті в цьому документі. У будь-якому із вищезазначених варіантів здійснення винаходу мезотелін, з яким зв'язується антитіло проти мезотеліну, є мезотеліном людини.

У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить E211. У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну додатково має одну або декілька наведених нижче властивостей:

- (a) не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16;
- (b) зв'язує мезотелін з афінністю ≤ 5 нМ, або альтернативно ≤ 1 нМ, або альтернативно $\leq 0,5$ нМ, і в деяких випадках $\geq 0,0001$ нМ.

У таких варіантах здійснення винаходу антитіло, яке не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16, посилює зв'язування мезотеліну із MUC16, і/або антитіло зв'язується із афінністю ≤ 1 нМ. Характерним антитілом, що має вищезгаданими властивостями, є 22A10, і його гуманізовані варіанти, такі як 22A10.v83, розглянуті в цьому документі. У будь-якому із вищенаведених варіантів здійснення винаходу мезотелін, з яким зв'язується антитіло проти мезотеліну, є мезотеліном людини, мезотеліном яванської макаки і/або мезотеліном щура.

У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну:

- (a) зв'язується з епітопом в межах амінокислот 1-131 SEQ ID NO:43; і
- (b) зв'язує мезотелін із афінністю ≤ 5 нМ, або альтернативно ≤ 1 нМ, або альтернативно $\leq 0,5$ нМ, або альтернативно $\leq 0,1$ нМ, і в деяких випадках $\geq 0,0001$ нМ.

У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло блокує зв'язування мезотеліну із MUC16 і/або зв'язується з епітопом в межах амінокислот 1-64 або 1-70 SEQ ID NO:43. У одному із таких варіантів здійснення винаходу антитіло витісняє MUC16 із зв'язку з мезотеліном. Характерним антитілом, що має вищезазначеними властивостями, є 19C3, розглянуте в цьому документі. У будь-якому із вищенаведених варіантів здійснення винаходу мезотелін, з яким зв'язується антитіло проти мезотеліну, є мезотеліном людини.

Способи

Щоб визначити, "чи зв'язується з епітопом SEQ ID NO:43, що містить E153 і D174" або "чи зв'язується з епітопом SEQ ID NO:43, що містить E211" антитіло проти мезотеліну, ці залишки піддаються мутуванню в поліпептиді, що містить SEQ ID NO:43, і аналізують зв'язування антитіла з мутованим поліпептидом, який експресується в клітинах 293, способом FACS, як описано в Прикладі G, де значне зниження (≥ 70 % зниження) або усунення зв'язування антитіла із мутантним поліпептидом вказує на те, що антитіло зв'язується з епітопом SEQ ID NO:43, що містить E153 і D174 або E211.

Щоб визначити, чи дійсно антитіло проти мезотеліну "не виявляє ослабленої взаємодії із глікозилованими формами мезотеліну", міченого мезотелін людини експресується в клітинах CHO, його очищають (за допомогою мітки) і додатково розділяють відповідно до заряду на колонці Mono S на фракції з високою (фракція A11), середньою (A12), низькою (B1) і практично відсутнім (B5) ступенем глікозилювання мезотеліну, як описано в Прикладі H. Кожну фракцію наносять на чип із заздалегідь зв'язаним антитілом проти мезотеліну і вимірюють швидкість асоціації і швидкість дисоціації для кожної фракції. Якщо значення афінності для кожної фракції знаходиться в межах 25 % один від одного, це вказує на те, що антитіло не виявляє ослабленої взаємодії з глікозилованими формами мезотеліну.

Щоб визначити, чи дійсно антитіло проти мезотеліну "блокує зв'язування мезотеліну із MUC16", "не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16" або "посилює зв'язування мезотеліну із MUC16", виконують аналіз зв'язування MUC16 таким чином. Зокрема, біотинільований фрагмент MUC16 (що містить три муцинові повтори) інкубують із клітинами A431, стабільно експресуючих мезотелін в присутності або відсутності антитіла проти мезотеліну, і рівень зв'язування біотинільованого MUC16 із клітинами визначають FACS за допомогою стрептавідину-PE. Сайт зв'язування MUC16 в молекулі мезотеліну був експериментальним чином локалізований в перших 64 амінокислотних залишках мезотеліну (Kaneko et al., J. Biol. Chem. 248:3739-49 (2009)). З іншого боку, клітини PC3, стабільно експресують MUC16,

інкубують в присутності очищеного мезотеліну-his8 ("his8" представлений у вигляді SEQ ID NO:49), заздалегідь інкубованого із антитілами проти мезотеліну, і зв'язування очищених комплексів мезотелін-his8:антитіло із MUC16-експресуючими клітинами визначають способом FACS, використовуючи анти-His6 антитіло, кон'юговане з Alexa-647 ("His6" представлений у вигляді SEQ ID NO:50). Якщо в будь-якому із вищезгаданих способів, сигнал FACS на $\geq 50\%$ нижче в присутності антитіла проти мезотеліну, ніж в його відсутність, тоді вважають, що антитіло блокує зв'язування мезотеліну із MUC16. Якщо в будь-якому із вищезгаданих способів, сигнал FACS не знижується $\geq 50\%$ в присутності антитіла проти мезотеліну, тоді вважають, що антитіло не блокує зв'язування мезотеліну із MUC16. Якщо в останньому із згаданих вище способів аналізу сигнал FACS збільшується в присутності антитіла проти мезотеліну, ніж в його відсутність, тоді вважають, що антитіло збільшує зв'язування мезотеліну з MUC16.

"Чи зв'язується антитіло проти мезотеліну із афінністю ≤ 5 нМ, або альтернативно ≤ 1 нМ, або альтернативно $\leq 0,5$ нМ, або альтернативно $\leq 0,1$ нМ" визначають згідно з аналізом Biacore, як описано в цьому документі в розділі II.A.1. Зокрема, Kd вимірюють, використовуючи поверхневий плазмонний резонансний аналіз, використовуючи BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C застосовуючи чипи із іммобілізованим антигеном CM5 при ~ 10 одиницях відповіді (RU). Коротко, карбоксиметилізовані декстранові біосенсорні чипи (CM5, BIACORE, Inc.) активуються N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)-карбодііміду гідрохлоридом (EDC) і N-гідрокисукцинімідом (NHS) відповідно до рекомендацій фірми-виробника. Антигеном, що підлягає дослідженню, є мезотелін, синтезований і виділений із E.coli, як описано в Прикладі В. Антиген розводять 10 мМ ацетату натрію, рН 4,8 до концентрації 5 мкг/мл ($\sim 0,2$ мкМ) до введення при швидкості потоку 5 мкл/хв. для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) пов'язаного білка. Після ін'єкції антигену вводять 1М етаноламін для блокування груп, що не беруть участь в реакції. Для кінетичних вимірювань двократне серійне розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) вводять в PBS із 0,05 % полісорбат 20 (TWEEN-20™) сурфактантом (PBST) при 25 °C при швидкості потоку, який дорівнює приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) обчислюють, використовуючи просту взаємно-однозначну модель зв'язування Ленгмюра (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) шляхом одночасного вирівнювання сенсограм асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (Kd) обчислюють за відношенням k_{off}/k_{on} . Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Якщо швидкість асоціації перевищує $106 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, використовуючи вищезгаданий спосіб поверхневого плазмонного резонансного аналізу, тоді швидкість асоціації може бути визначена шляхом використання методики гасіння флуоресценції, яка вимірює збільшення або зменшення інтенсивності емісії флуоресценції (збудження=295 нм; емісія=340 нм, 16 нм смуга пропускання) при 25 °C 20 нМ антитіла (Fab форма) проти антигену в PBS, рН 7,2, в присутності збільшуваних концентрацій антигену згідно із вимірюваннями спектрофотометра, такого як обладнаний зупинкою потоку спектрофотометр (Aviv Instruments) або розрахованого на 8000 зразків SLM-AMINCO™ спектрофотометр (ThermoSpectronic) із обертовою кюветою.

Антитіло 7D9 і інші варіанти здійснення винаходу

У одному із аспектів винахід стосується антитіла проти мезотеліну, що містить принаймні один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибрані із (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

У одному із аспектів винахід стосується антитіла, що містить принаймні одну, принаймні дві, або всі три послідовності VH HVR, вибрані із (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22. У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19, і HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22.

У іншому аспекті, винахід стосується антитіла, що містить принаймні одну, принаймні дві, або всі три VL HVR послідовності, вибрані із (a) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить (a) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

У іншому аспекті антитіло за винаходом містить (a) VH домен, що містить принаймні одну, принаймні дві, або всі три послідовності VH HVR, вибрані із (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, і (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із SEQ ID NO:22; і (b) VL домен, що містить принаймні одну, принаймні дві, або всі три послідовності VL HVR, вибрані із (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла, що містить (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22; (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

У будь-якому із вищезазначених варіантів здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну є гуманізованим. У одному із варіантів здійснення, антитіло проти мезотеліну містить HVR, як в будь-якому із вищезазначених варіантів здійснення, і додатково містить акцепторну каркасну ділянку людини, наприклад, каркасна ділянка імуноглобуліну людини або консенсусна каркасна ділянка людини. У певних варіантах здійснення акцепторною каркасною ділянкою людини є консенсусна каркасна ділянка VL каппа I людини (VL_{KI}) і/або каркасна ділянка VH (VH_{ATA}), яка відрізняється від консенсусної послідовності підгрупи III VH людини (VH_{III}) по 3 положеннях: R71A, N73T і L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну містить HVR, як в будь-якому із вищезазначених варіантів здійснення винаходу і додатково містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність каркасної ділянки FR2 SEQ ID NO:25, і послідовність FR3 SEQ ID NO:27. У одному із таких варіантів здійснення винаходу каркасною ділянкою варіабельного домену легкого ланцюга є модифікована консенсусна каркасна ділянка (VL_{KI}) VL каппа I, що має FR2 послідовність SEQ ID NO:25 і FR3 послідовність SEQ ID NO:27.

У іншому аспекті антитіло проти мезотеліну містить послідовність варіабельного домену (VH) важкого ланцюга, яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8. У певних варіантах здійснення винаходу послідовність VH, яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антитіло проти мезотеліну, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язувати мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу всього від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені і/або делетовані в SEQ ID NO:8. У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції здійснюються в ділянках поза HVR (тобто, в FR). У деяких випадках, антитіло проти мезотеліну містить VH послідовність SEQ ID NO: 8, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У окремому варіанті здійснення винаходу VH містить один, два або три HVR, вибрані із: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну, де антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), який принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO:4. У певних варіантах здійснення винаходу послідовність VL, яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антитіло проти мезотеліну, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язувати мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу всього від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені і/або делетовані в SEQ ID NO:4. У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції здійснюються в ділянках поза HVR (тобто, в FR). У деяких випадках, антитіло проти мезотеліну містить VL послідовність SEQ ID NO:4, включаючи посттрансляційні модифікації цієї

послідовності. У окремому варіанті здійснення винаходу VL містить один, два або три HVR, вибрані із: (a) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:18, і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

5 У іншому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну, де антитіло містить VH, як в будь-якому із вищеописаних варіантів здійснення винаходу і VL, як в будь-якому із вищеописаних варіантів здійснення винаходу. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовності VH і VL в SEQ ID NO:8 і SEQ ID NO:4, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

10 У додатковому аспекті винахід стосується антитіла, яке зв'язує той же самий епітоп, що і антитіло проти мезотеліну за даним винаходом. Наприклад, в певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує той же самий епітоп, що і антитіло проти мезотеліну, що містить послідовність VH SEQ ID NO:8 і послідовність VL SEQ ID NO:4. У певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує епітоп SEQ ID NO:43 із ділянки амінокислот

15 152-175, всередині нього або його охоплюючи. У певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить E153 і D174. У певних таких варіантах здійснення винаходу антитіло зв'язує амінокислотні залишки E153 і D174.

У додатковому аспекті винаходу антитіло проти мезотеліну за будь-яким із вищеописаних варіантів здійснення винаходу є моноклональним антитілом, включаючи химерне, гуманізоване

20 антитіло або антитіло людини. У одному із варіантів здійснення винаходу антитілом проти мезотеліну є фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або F(ab')₂ фрагмент. У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло є практично повнорозмірним антитілом, наприклад, антитілом IgG1 або іншим класом або ізотипом антитіл, як визначено в цьому документі.

25 У додатковому аспекті антитіло проти мезотеліну за будь-яким із вищеописаних варіантів здійснення винаходу може мати будь-яку характерну властивість, нарізно або в поєднанні, як описано в Розділах 1-7 нижче:

Антитіло 22A10 і інші варіанти здійснення винаходу

У одному із аспектів винахід стосується антитіла проти мезотеліну, що містить принаймні

30 один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR, вибраних із (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39; (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID

35 NO:35.

У одному із аспектів винахід стосується антитіла, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR, вибрані із (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 36; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 37; і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO: 38 або 39. У одному із

40 варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39. У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39, і HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39, HVR-

45 L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35, і HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39.

50 У іншому аспекті винахід стосується антитіла, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VL HVR, вибрані із (a) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить (a) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33;

55 (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35.

У іншому аспекті антитіло за винаходом містить (a) домен VH, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR, вибрані із (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність

60 SEQ ID NO:37, і (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39; і (b)

домен VL, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VL HVR, вибрані із (i) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33, (ii) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла, що містить (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36; (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37; (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39; (d) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (e) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (f) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність, вибрану із SEQ ID NO:35.

У будь-якому із вищеописаних варіантів здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну є гуманізованим. У одному із варіантів здійснення, антитіло проти мезотеліну містить HVR, як в будь-якому із вищеописаних варіантів здійснення, і додатково містить акцепторну каркасну ділянку людини, наприклад, каркасна ділянка імуноглобуліну людини або консенсусна каркасна ділянка людини. У певних варіантах здійснення винаходу акцепторною каркасною ділянкою людини є акцепторна каркасна ділянка VL_{KL} і/або VH_{III}.

У іншому аспекті, антитіло проти мезотеліну містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:16. У певних варіантах здійснення винаходу послідовність VH, яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антитіло проти мезотеліну, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язувати мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу всього від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені і/або делетовані в SEQ ID NO:16. У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції здійснюються в ділянках поза HVR (тобто, в FR). У деяких випадках, антитіло проти мезотеліну містить VH послідовність SEQ ID NO:16, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У окремому варіанті здійснення винаходу VH містить один, два або три HVR, вибрані із: (a) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:36, (b) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:37, і (c) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:38 або 39.

У іншому аспекті, стосується антитіла проти мезотеліну, де антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), який принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичний амінокислотній послідовності SEQ ID NO:12. У певних варіантах здійснення винаходу послідовність VL, яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антитіло проти мезотеліну, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язувати мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу всього від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені і/або делетовані в SEQ ID NO:12. У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції здійснюються в ділянках поза HVR (тобто, в FR). У деяких випадках, антитіло проти мезотеліну містить VL послідовність SEQ ID NO:12, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У окремому варіанті здійснення винаходу VL містить один, два або три HVR, вибрані із: (a) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:33; (b) HVR-L2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:34; і (c) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:35.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну, де антитіло містить VH, як в будь-якому із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу і VL, як в будь-якому із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить VH і VL послідовності в SEQ ID NO:16 і SEQ ID NO:12, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

У додатковому аспекті винахід стосується антитіла, яке зв'язує той же самий епітоп, як антитіло проти мезотеліну за даним винаходом. Наприклад, в певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує той же самий епітоп, як антитіло проти мезотеліну, що містить VH послідовність SEQ ID NO:16 і VL послідовність SEQ ID NO:12. У певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує епітоп SEQ ID NO:43 із ділянки амінокислот 211-327, всередині нього або його охоплюючи. У певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, який містить E211. У певних таких варіантах здійснення винаходу антитіло зв'язує амінокислотний залишок E211.

У додатковому аспекті винаходу антитіло проти мезотеліну за будь-яким із вищеописаних варіантів здійснення винаходу є моноклональним антитілом, включаючи химерне, гуманізоване

антитіло або антитіло людини. У одному із варіантів здійснення винаходу антитілом проти мезотеліну є фрагмент антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або F(ab')₂ фрагмент. У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло є практично повнорозмірним антитілом, наприклад, антитілом IgG2a або іншим класом або ізотипом антитіл, як визначено в цьому документі.

У додатковому аспекті антитіло проти мезотеліну за будь-яким із вищеописаних варіантів здійснення винаходу може мати будь-яку характерну властивість, нарізно або в поєднанні, як описано в Розділах 1-7 нижче:

Антитіло 19C3 і інші варіанти здійснення винаходу

У одному із аспектів винахід стосується антитіла проти мезотеліну, що містить принаймні один, два, три, чотири, п'ять або шість HVR антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У контексті даного розділу HVR обведені контуром у вигляді набору амінокислот, відповідних CDR, як визначено в цьому документі.

У одному із аспектів винахід стосується антитіла, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VH HVR антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H3, HVR-L3 і HVR-H2 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло містить HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три послідовності VL HVR антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У іншому аспекті антитіло по винаходу містить (а) VH домен, що містить принаймні одну, принаймні дві або всі три VH HVR послідовності антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464; і (b) VL домен, що містить принаймні одну, як мінімум дві або всі три VL HVR послідовності антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла, що містить HVR-H1, HVR-H2, HVR-H3, HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У будь-якому із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу антитіла проти мезотеліну є гуманізованими. У одному із таких варіантів здійснення, антитіло є гуманізованою формою антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У додатковому варіанті здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну містить HVR, як в будь-якому із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу і додатково містить акцепторну каркасну ділянку людини, наприклад, каркасна ділянка імуноглобуліну людини або консенсусна каркасна ділянка людини.

У іншому аспекті антитіло проти мезотеліну містить послідовність варіабельного домену важкого ланцюга (VH), що має принаймні 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичність VH антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У певних варіантах здійснення винаходу послідовність VH містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антитіло проти мезотеліну, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язувати мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу всього від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені і/або делетовані в VH антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції здійснюються в ділянках поза HVR (тобто, в FR). У деяких випадках, антитіло проти мезотеліну містить VH послідовність антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У окремому варіанті здійснення винаходу VH містить один, два або три HVR, вибрані із HVR-H1, HVR-H2 і HVR-H3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну, де антитіло містить варіабельний домен легкого ланцюга (VL), який принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % або 100 % ідентичний VL антитіла, продукovanого гібридомою

19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У певних варіантах здійснення винаходу послідовність VL, яка принаймні на 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % або 99 % ідентична, містить заміни (наприклад, консервативні заміни), вставки або делеції відносно контрольної послідовності, але антитіло проти мезотеліну, що містить таку послідовність, зберігає здатність зв'язувати мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу всього від 1 до 10 амінокислот були замінені, вставлені і/або делетовані в VL антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464. У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції здійснюються в ділянках поза HVR (тобто, в FR). У деяких випадках, антитіло проти мезотеліну містить VL послідовність антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464, включаючи посттрансляційні модифікації цієї послідовності. У окремому варіанті здійснення винаходу VL містить один, два або три HVR, вибрані із HVR-L1, HVR-L2 і HVR-L3 антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У іншому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну, де антитіло містить VH, як в будь-якому із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу і VL, як в будь-якому із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу. У одному із варіантів здійснення винаходу антитіло містить послідовності VH і VL антитіла, продукovanого гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464, відповідно, включаючи посттрансляційні модифікації цих послідовностей.

У додатковому аспекті винахід стосується антитіла, яке зв'язує той же самий епітоп, як антитіло проти мезотеліну за даним винаходом. Наприклад, в певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла, яке зв'язує той же самий епітоп, як антитіло, продукované гібридомою 19C3 із ідентифікаційним номером ATCC PTA-11464.

У додатковому аспекті винаходу антитіло проти мезотеліну за будь-яким із розглянутих вище варіантів здійснення винаходу є моноклональним антитілом, включаючи химерне, гуманізоване антитіло або антитіло людини. У одному із варіантів здійснення винаходу антитілом проти мезотеліну є фрагментом антитіла, наприклад, Fv, Fab, Fab', scFv, діатіло або F(ab')₂ фрагмент. У іншому варіанті здійснення винаходу антитіло є практично повнорозмірним антитілом, наприклад, антитілом IgG2b або іншим класом або ізотипом антитіл, як визначено в цьому документі.

У додатковому аспекті, антитіло проти мезотеліну за будь-яким із вищеописаних варіантів здійснення винаходу може мати будь-яку характерну властивість, нарізно або в поєднанні, як описано в Розділах 1-7 нижче:

1. Афінісність антитіла

У певних варіантах здійснення винаходу константа дисоціації (Kd) антитіла за даним винаходом дорівнює (Kd) ≤ 1 мкМ, ≤ 100 нМ, ≤ 10 нМ, ≤ 1 нМ, $\leq 0,1$ нМ, $\leq 0,01$ нМ або $\leq 0,001$ нМ, і в деяких випадках $\geq 10^{-13}$ М (наприклад, 10^{-8} М або менше, наприклад, від 10^{-8} М до 10^{-13} М, наприклад, від 10^{-9} М до 10^{-13} М).

У одному із варіантів здійснення винаходу Kd вимірюють способом аналізу зв'язування радіоактивно міченого антигену (RIA), що виконується із використанням Fab фрагмента антитіла, яке представляє інтерес, і його антигену, як описано представленим нижче способом. Афінісність зв'язування Fabs для антигену в розчині вимірюють урівноваженням Fab мінімальною концентрацією (¹²⁵I)-міченого антигену в присутності серій розведення неміченого антигену, потім виявляючи зв'язаний антиген за допомогою покритого антитілами до Fab планшета (див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)). Для визначення умов проведення аналізу, багатоямкові планшети MICROTITER® (Thermo Scientific) покривають протягом ночі 5 мкг/мл антитілами до Fab (Cappel Labs) по виявленню зв'язаного антигену в 50 мМ карбонаті натрію (pH 9,6) і потім блокують 2 % (вага/об'єм) бичачим сироватковим альбуміном в PBS протягом від двох до п'яти годин при кімнатній температурі (приблизно 23 °C). У планшетах без адсорбенту (Nunc #269620) 100 пкМ або 26 пкМ [¹²⁵I]-антиген змішують із серійним розведенням Fab, який представляє інтерес (наприклад, у випадку оцінки антитіл до VEGF, Fab-12, в Presta et al., Cancer Res. 57:4593-4599 (1997)). Fab, який представляє інтерес, потім інкубують протягом ночі; однак, інкубація може продовжуватися більш тривалий період (наприклад, приблизно 65 годин) для забезпечення досягнення рівноважного стану. Потім суміші переносять в фіксуєчий планшет для інкубації при кімнатній температурі (наприклад, протягом однієї години). Розчин потім видаляють і планшет промивають вісім разів 0,1 % полісорбатом 20 (TWEEN-20®) в PBS. Як тільки планшети висихають, додають 150 мкл/ямка сцинтилятора (MICROSCINT-20™; Packard), і планшети обраховують в лічильнику гамма-випромінювання TOPCOUNT™ (Packard) протягом 10 хвилин. Концентрації кожного Fab, які демонструють 20 % або меншу величину від максимального зв'язування, вибирають для використання в конкурентному аналізі зв'язування.

Відповідно до іншого варіанта здійснення винаходи K_d вимірюють шляхом використання поверхневого плазмонного резонансного аналізу, використовуючи BIACORE®-2000 або BIACORE®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) при 25 °C, застосовуючи чипи із іммобілізованим антигеном CM5 при ~10 одиницях відповіді (RU). Коротко, карбоксиметилізовані декстранові біосенсорні чипи (CM5, BIACORE, Inc.) активуються N-етил-N'-(3-диметиламінопропіл)карбодііміду гідрохлоридом (EDC) і N-гідроксисукцинімідом (NHS) відповідно до рекомендацій фірми-виробника. Антиген розводять 10 мМ ацетатом натрію, pH 4,8, до концентрації 5 мкг/мл (~0,2 мкМ) до введення при швидкості потоку 5 мкл/хвилина для досягнення приблизно 10 одиниць відповіді (RU) зв'язаного білка. Після ін'єкції антигену вводять 1М етаноламін для блокування груп, що не беруть участь в реакції. Для кінетичних вимірювань двократне серійне розведення Fab (від 0,78 нМ до 500 нМ) вводять в PBS з 0,05 % полісорбат 20 (TWEEN-20™) сурфактантом (PBST) при 25 °C при швидкості потоку, рівному приблизно 25 мкл/хв. Швидкості асоціації (k_{on}) і швидкості дисоціації (k_{off}) обчислюють, використовуючи просту взаємно-однозначну модель зв'язування Ленгмюра (BIACORE® Evaluation Software version 3.2) шляхом одночасного вирівнювання сенсограм асоціації і дисоціації. Рівноважну константу дисоціації (K_d) обчислюють по відношенню k_{off}/k_{on} . Див., наприклад, Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999). Якщо швидкість асоціації перевищує $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, використовуючи вищезгаданий спосіб поверхневого плазмонного резонансного аналізу, тоді швидкість асоціації може бути визначена шляхом використання методики гасіння флуоресценції, яка вимірює збільшення або зменшення інтенсивності емісії флуоресценції (збудження=295 нм; емісія=340 нм, 16 нм смуга пропускання) при 25 °C 20 нМ антитіла (Fab форма) проти антигену в PBS, pH 7,2, в присутності концентрацій антигену, які збільшуються згідно із вимірюваннями спектрофотометра, такого як обладнаний зупинкою потоку спектрофотометр (Aviv Instruments) або розрахованого на 8000 зразків SLM-AMINCO™ спектрофотометр (ThermoSpectronic) із обертовою кюветою.

2. Фрагменти антитіла

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло за даним винаходом є фрагментом антитіла. Фрагменти антитіла включають, крім іншого, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv і scFv фрагменти, і інші фрагменти, розглянуті нижче. Для огляду певних фрагментів антитіла див. Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003). Для огляду фрагментів scFv див., наприклад, Pluckthün, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994); див. також WO 93/16185; і патенти США №№ 5571894 і 5587458. Для обговорення фрагментів Fab і F(ab')₂, що містять залишки зв'язування епітопу рецептора реутилізації і, що мають підвищений час життя in vivo, див. патент США № 5869046.

Діатіла є фрагментами антитіла з двома антигензв'язуючими сайтами, які можуть бути бівалентними або біспецифічними. Див., наприклад, EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003); і Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993). Триатіла і тетратіла також описані в Hudson et al., Nat. Med. 9:129-134 (2003).

Однодоменні антитіла є фрагментами антитіла, що містять весь варіабельний домен важкого ланцюга антитіла або його частину або весь варіабельний домен легкого ланцюга антитіла або його частину. У певних варіантах здійснення винаходу однодоменне антитіло є однодоменним антитілом людини (Domantis, Inc., Waltham, MA; див., наприклад, патент США № 6248516 B1).

Фрагменти антитіла можуть бути отримані різними способами, включаючи, крім іншого, протеолітичне розщеплення інтактного антитіла, а також продукцію рекомбінантними клітинами-хазяїнами (наприклад, E. coli або фагами), як описано в цьому документі.

3. Химерні і гуманізовані антитіла

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло за даним винаходом є химерним антитілом. Певні химерні антитіла описані, наприклад, в патенті США №4816567; і Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). В одному прикладі, химерне антитіло містить відмінний від варіабельної ділянки людини (наприклад, варіабельна ділянка, отримана із миші, щура, хом'яка, кролика або відмінного від людини примата, такого як мавпа) і константна ділянка людини. У додатковому прикладі, химерне антитіло є антитілом із "переключеним синтезом класу", в якому клас або підклас був змінений при порівнянні із вихідним антитілом. Химерні антитіла включають їх антигензв'язуючі фрагменти.

У певних варіантах здійснення винаходу химерне антитіло є гуманізованим антитілом. Як правило, відмінне від людини антитіло гуманізують для зниження імуногенності для людини, при цьому зберігаючи специфічність і афінність вихідної відмінної від антитіла людини. У основному, гуманізоване антитіло містить один або декілька варіабельних доменів, в яких HVR,

наприклад, CDR (або їх частини) отримані із відмінної від антитіла людини, і FR (або їх частини) отримані із послідовностей антитіла людини. Гуманізоване антитіло, в деяких випадках, також містить принаймні частину константної ділянки людини. У деяких варіантах здійснення винаходу деякі залишки FR в гуманізованому антитілі замінені відповідними залишками із відмінної від антитіла людини (наприклад, антитіло, із якого отримані залишки HVR), наприклад, із метою відновлення або поліпшення специфічності або афінності антитіла.

Гуманізовані антитіла і способи їх отримання розглянуті, наприклад, в Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008) і додатково описані, наприклад, в Riechmann et al., *Nature* 332:323-329 (1988); Queen et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10029-10033 (1989); патенти США №№ 5821337, 7527791, 6982321 і 7087409; Kashmiri et al., *Methods* 36:25-34 (2005) (що описує пересадку SDR (aCDR); Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489-498 (1991) (що описує "відновлення поверхні"); Dall'Acqua et al., *Methods* 36:43-60 (2005) (що описує "перестановку FR"); і Osbourn et al., *Methods* 36:61-68 (2005) і Klimka et al., *Br. J. Cancer*, 83:252-260 (2000) (описуючий спосіб "направленої селекції" відносно перестановки FR).

Каркасні області людини, які можуть бути використані для гуманізації, включають, крім іншого: каркасні області, вибрані, використовуючи спосіб "найкращої відповідності" (див., наприклад, Sims et al., *J. Immunol.* 151:2296 (1993)); каркасні області, отримані із консенсусної послідовності антитіл людини певної підгрупи варіабельних ділянок легкого або важкого ланцюга (див., наприклад, Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285 (1992); і Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623 (1993)); зрілі (соматично мутовані) каркасні ділянки людини або каркасні ділянки зародкової лінії людини (див., наприклад, Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633 (2008)); і каркасні ділянки, отримані із бібліотек скринінгу FR (див., наприклад, Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684 (1997) і Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618 (1996)).

4. Антитіла людини

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло за даним винаходом є антитілом людини. Антитіла людини можуть бути отримані, використовуючи різні методи, відомі в даній галузі техніки. Антитіла людини описані в загальних рисах в статтях van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74 (2001) і Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459 (2008).

Антитіла людини можуть бути отримані введенням імуногена трансгенної тварини, яка була модифікована з метою продукування інтактних антитіл людини або інтактних антитіл із варіабельними ділянками людини у відповідь на антигенний стимул. Такі тварини звичайно містять всі імуноглобулінові локуси людини або їх частину, які заміняють ендogenous імуноглобулінові локуси, або які знаходяться поза хромосою або випадковим чином інтегровані в хромосоми тварин. У таких трансгенних мишах ендogenous імуноглобулінові локуси, в основному, інактивовані. Для огляду способів отримання антитіл людини із трансгенних тварин див. Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125 (2005). Див. також, патенти США №№ 6075181 і 6150584, що описують технологію XENOMOUSETM; патент США № 5770429, що описує технологію HuMab®; патент США № 7041870, що описує технологію K-M MOUSE®, і публікацію патентної заявки США № US 2007/0061900, що описує технологію VelociMouse®). Варіабельні ділянки людини із інтактних антитіл, продуковані такими тваринами, можуть бути додатково модифіковані, наприклад, шляхом поєднання із іншою константною ділянкою людини.

Антитіла людини можуть бути також отримані основаними на гібридомній технології способами. Були описані мієломні і мишаче-людські гетеромієломні клітинні лінії людини для продукування моноклональних антитіл людини. (Див., наприклад, Kozbor *J. Immunol.*, 133:3001 (1984); Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); і Boerner et al., *J. Immunol.*, 147:86 (1991).) Людські антитіла, отримані за допомогою технології використання В-клітинної гібридоми людини, також описані в Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006). Додаткові способи включають такі, описані, наприклад, в патенті США № 7189826 (що описує продукування моноклональних антитіл IgM людини гібридомними клітинними лініями) і в статті Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (яка описує гібридоми людина-людина). Технологія застосування гібридоми людини (технологія Trioma) також описана в статті Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937 (2005) і Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91 (2005).

Антитіла людини можуть бути також отримані шляхом виділення послідовностей варіабельного домену клону Fc, вибраних із бібліотек фагового дисплея людського походження. Такі послідовності варіабельного домену можуть потім бути комбіновані з необхідним константним доменом людини. Технології відбору антитіл людини із бібліотек антитіл описані нижче.

5. Антитіла, отримані із бібліотек

Антитіла за винаходом можуть бути виділені шляхом скринінгу комбінаторних бібліотек для антитіл із необхідною активністю або активностями. Наприклад, цілий ряд способів відомі в даній галузі техніки для отримання бібліотек фагового дисплея і скринінгу таких бібліотек по виявленню антитіл, що мають необхідні характеристикам зв'язування. Такі способи розглянуті, наприклад, в Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) і додатково конкретизовані, наприклад, в McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628 (1991); Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992); Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004); Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004); і Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004).

У певних способах фагового дисплея, репертуари генів VH і VL окремо клонують способом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) і рекомбінують випадковим чином в фагових бібліотеках із подальшим їх скринінгом по виявленню антигензв'язуючого фагу, як описано в статті Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12:433-455 (1994). В фазі, як правило, представлені фрагменти антитіла або у вигляді одноланцюжкових фрагментів Fv (scFv), або у вигляді фрагментів Fab. Бібліотеки із імунізованих джерел представляють високо афінні антитіла відносно імуногену без необхідності створення гібридом. Альтернативно, може бути клонований інтактний репертуар (наприклад, із людини) для забезпечення єдиним джерелом антитіл до широкого набору відмінних від власних і також власних антигенів без якої-небудь імунізації, як описано Griffiths et al., *EMBO J.*, 12:725-734 (1993). І нарешті, інтактні бібліотеки можуть бути також отримані штучно шляхом клонування не перегрупованих V-генних сегментів із стовбурових клітин і використання ПЛР-праймерів, що містять випадкову послідовність, для кодування високо варіабельних ділянок CDR3 і виконання перегруповання *in vitro*, як описано в статті Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992). Патентні публікації, що розглядають фагові бібліотеки антитіл людини, включають, наприклад: патент США № 5750373 і патентні публікації США №№ 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936 і 2009/0002360.

Антитіла або фрагменти антитіл, виділені із бібліотек антитіл людини, вважаються в цьому документі антитілами людини або фрагментами антитіл людини.

6. Мультиспецифічні антитіла

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло за даним винаходом є мультиспецифічним антитілом, наприклад, біспецифічним антитілом. Мультиспецифічні антитіла є моноклональними антитілами, які мають специфічність зв'язування принаймні для двох різних сайтів. У певних варіантах здійснення винаходу одна із специфічностей зв'язування призначена для мезотеліну і інша - для будь-якого іншого антигену. У певних варіантах здійснення винаходу біспецифічні антитіла можуть зв'язуватися із двома різними епітопами мезотеліну. Біспецифічні антитіла можуть також бути використані для локалізації цитотоксичних агентів на клітинах, яких експресують мезотелін. Біспецифічні антитіла можуть бути приготовані у вигляді повнорозмірних антитіл або фрагментів антитіл.

Методики створення мультиспецифічних антитіл включають, крім іншого, рекомбінантну спільну експресію двох пар важкого ланцюга-легкого ланцюга імуноглобуліну, що мають різні специфічності (див. Milstein and Cuello, *Nature* 305:537 (1983)), WO 93/08829 і Traunecker et al., *EMBO J.* 10:3655 (1991) і техніку "виступ-у-заглиблення" (див., наприклад, патент США № 5731168). Мультиспецифічні антитіла можуть бути також отримані шляхом створення електростатичних ефектів регулювання для отримання Fc-гетеродимерних молекул антитіла (WO 2009/089004A1); перехресного зв'язування двох або більше антитіл або фрагментів (див., наприклад, патент США № 4676980 і Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); використання лейцинових блискавок для отримання біспецифічних антитіл (див., наприклад, Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); використання технології "діатіло" для створення фрагментів біспецифічного антитіла (див., наприклад, Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); і використання димерів одноланцюжкових Fv (sFv) (див., наприклад, Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); і приготування триспецифічних антитіл, як описано, наприклад, в Tutt et al. *J. Immunol.* 147:60 (1991).

Сконструйовані антитіла з трьома або більше функціональними сайтами зв'язування антигену, включаючи "антитіла, що нагадують восьминога", також включені в цей документ (див., наприклад, US 2006/0025576A1).

Антитіло або фрагмент в цьому документі також містить "FAb подвійної дії" або "DAF", що містить сайт зв'язування антигену, який зв'язується з мезотеліном, а також із іншим, відмінним від нього антигеном (див., US 2008/0069820, наприклад).

7. Варіанти антитіл

У певних варіантах здійснення винаходу розглядаються варіанти амінокислотної послідовності антитіл, представлених в цьому документі. Наприклад, бажано поліпшити афінність зв'язування і/або інші біологічні властивості антитіла. Варіанти амінокислотної послідовності антитіла можуть бути отримані шляхом внесення придатних модифікацій в нуклеотидну послідовність, яка кодує антитіло, або шляхом пептидного синтезу. Такі модифікації включають, наприклад, делеції і/або вставки, і/або заміни залишків всередині амінокислотних послідовностей антитіла. Будь-яка комбінація делеції, вставки або заміни може бути здійснена для отримання остаточного конструкта за умови, що остаточний конструкт має необхідні характеристики, наприклад, антигензв'язувальні.

а) Варіанти заміни, вставки і делеції

У певних варіантах здійснення винаходу представлені варіанти антитіл, які мають одну або декілька амінокислотних заміни. Сайти, що представляють інтерес для заміщувального мутагенезу включають HVR і FR. Консервативні заміни представлені в Таблиці 1 під заголовком "переважні заміни". Більш істотні зміни представлені в Таблиці 1 під заголовком "типові заміни" і, як додатково описано нижче, відносно класів бічних ланцюгів амінокислот. Амінокислотні заміни можуть бути внесені в антитіло, що представляє інтерес, і продукти піддають скринінгу на предмет необхідної активності, наприклад, збереженого/поліпшеного зв'язування антигену, зниженої імуногенності або поліпшеної ADCC або CDC.

Таблиця 1

Вихідний залишок	Типові заміни	Переважаючі заміни
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Норлейцин	Leu

Амінокислоти можуть бути об'єднані в групи відповідно до загальних властивостей бічних ланцюгів:

(1) гідрофобні: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) нейтральні гідрофільні: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) кислі: Asp, Glu;

(4) основні: His, Lys, Arg;

(5) залишки, що впливають на орієнтацію ланцюга: Gly, Pro;

(6) ароматичні: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативні заміни можуть спричинити зміну членства в одному класі на таке в іншому класі.

Один тип замісного варіанта містить заміну одного або декількох залишків гіперваріабельної ділянки вихідного антитіла (наприклад, гуманізованного або антитіла людини). Як правило,

варіант(и), які отримується(ються) в результаті, вибраний(і) для подальшого дослідження, мають модифікації (наприклад, поліпшення) певних біологічних властивостей (наприклад, підвищену афінність, знижену імуногенність) відносно вихідного антитіла і/або практично зберігають певні біологічні властивості вихідного антитіла. Типовим замісним варіантом є

5 антитіло із дозрілою афінністю, яке може бути успішно отримане, наприклад, використовуючи оснований на фаговому дисплеї спосіб дозрівання афінності, як такий, описаний в цьому документі. Коротко, вносять мутації в один або декілька залишків HVR і варіантні антитіла клонують в фаговому векторі і відбирають за певною біологічною активністю (наприклад, афінності зв'язування).

10 Зміни (наприклад, заміни) можуть бути внесені в HVR, наприклад, для поліпшення афінності антитіл. Такі зміни можуть бути внесені в "гарячі точки" HVR, тобто залишки, що кодується кодонами, які зазнають мутування із високою частотою під час соматичного процесу дозрівання (див., наприклад, Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), і/або SDR (а-CDR), внаслідок чого отримують варіантну VH або VL, що піддається тестуванню на предмет

15 афінності зв'язування. Дозрівання афінності шляхом конструювання і повторного відбору із повторних бібліотек вже було описано, наприклад, в Hoogenboom et al., *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ (2001)). У деяких варіантах здійснення дозрівання афінності вносять різноманітність у варіабельні гени, вибрані для дозрівання, будь-якими різними способами (наприклад, ПЛР із внесенням помилок,

20 перестановка ланцюгів або олігонуклеотид-направлений мутагенез). Потім створюють повторну бібліотеку. Потім проводять скринінг бібліотеки для ідентифікації якого-небудь варіанта антитіла із необхідною афінністю. Інший спосіб внесення варіабельності містить HVR-направлені підходи, в яких декілька залишків HVR (наприклад, 4-6 залишків за один раз) розташовують у випадковому порядку. Залишки HVR, залучені до зв'язування антигену, можуть бути специфічно

25 ідентифіковані, наприклад, використовуючи аланін-скануючий мутагенез або моделювання. Зокрема, звичайно мішенями є CDR-H3 і CDR-L3.

У певних варіантах здійснення винаходу заміни, вставки або делеції можуть мати місце в одному або декількох HVR за умови, що такі зміни істотно не знижують здатність антитіла зв'язувати антиген. Наприклад, консервативні зміни (наприклад, консервативні заміни,

30 передбачені в цьому документі), які істотно не знижують афінність зв'язування, можуть бути зроблені в HVR. Такі зміни можуть бути поза "гарячими точками" HVR або SDR. У певних варіантах здійснення варіантних послідовностей VH і VL, розглянутих вище, кожний HVR або незмінений, або містить не більше однієї, двох або трьох амінокислотних заміни.

Придатним способом ідентифікації залишків або ділянок антитіла, що є мішенню мутагенезу, є "аланін-скануючий мутагенез", як описано Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. В цьому способі залишок або група цільових залишків (наприклад, заряджені залишки, такі як arg, asp, his, lys і glu) ідентифікують і замінюють нейтральною або негативно

35 зарядженою амінокислотою (наприклад, аланіном або поліаланіном), щоб визначити чи змінилася взаємодія антитіла із антигеном. Додаткові заміни можуть бути внесені в місцях розташування амінокислот, демонструючи функціональну чутливість до первинних заміни.

40 Альтернативно, або додатково, кристалічна структура комплексу антиген-антитіло використовується для ідентифікації точок контакту між антитілом і антигеном. Такі контактуючі залишки і сусідні залишки можуть виступати як мішень або бути видалені як кандидати для заміни. Варіанти можуть бути піддані скринінгу з метою визначення можливої наявності у них

45 необхідних властивостей.

Вставки амінокислотної послідовності включають аміно- і/або карбокси-кінцеві зчеплення, що варіюють по довжині від одного залишку до поліпептидів, що містять сотню або більше залишки, а також вставки всередині послідовності, що складаються із одного або множини амінокислотних залишків. Приклади кінцевих вставок включають антитіло з N-кінцевим метіоніловим залишком. Інші інсерційні варіанти молекули антитіла включають зчеплення N-

50 або C-кінця антитіла з ферментом (наприклад, для ADEPT) або поліпептидом, який збільшує час життя антитіла в сироватці.

б) Глікозиловані варіанти

У певних варіантах здійснення винаходу антитіло за даним винаходом, змінено для збільшення або зменшення ступеня глікозилювання даного антитіла. Внесення або делеція сайтів глікозилювання в рамках антитіла можуть бути успішно виконані шляхом зміни амінокислотної послідовності таким чином, що один або більше сайтів глікозилювання створюється або видаляється.

У випадку, коли антитіло містить ділянку Fc, карбогідрат, до нього приєднаний, може бути змінений. Нативні антитіла, продуковані клітинами ссавців, звичайно включають розгалужений,

60

2-антенарний олігосахарид, який, як правило, приєднаний за допомогою N-зв'язку з Asn297 домену CH2 ділянки Fc. Див., наприклад, Wright et al. TIBTECH 15:26-32 (1997). Олігосахарид може включати різні карбогідрати, наприклад, манозу, N-ацетилглюкозамін (GlcNAc), галактозу і сіалову кислоту, а також фукозу, приєднану до GlcNAc у "стеблі" 2-антенарної олігосахаридної структури. У деяких варіантах здійснення винаходу модифікації олігосахариду антитіла за винаходом можуть бути створені з метою створення варіантів антитіла із певними поліпшеними властивостями.

У одному із варіантів здійснення винаходу представлені варіанти антитіла, що мають карбогідратну структуру, в якій відсутня фукоза, приєднана (напрямую або опосередковано) до ділянки Fc. Наприклад, кількість фукози в такому антитілі може складати від 1 % до 80 %, від 1 % до 65 %, від 5 % до 65 % або від 20 % до 40 %. Кількість фукози визначають обчисленням середньої кількості фукози в сахаридному ланцюгу в положенні Asn297 відносно суми всіх глікоструктур, прикріплених до Asn297 (наприклад, комплексних, гібридних і високоманозних структур) згідно із вимірюваннями способом мас-спектрометрії MALDI-TOF, як описано в WO 2008/077546, наприклад Asn297 стосується аспарагінового залишку, розташованого приблизно в позиції 297 ділянки Fc (нумерація EU залишків ділянки Fc); однак Asn297 може бути також розташований приблизно ± 3 амінокислоти вище або нижче позиції 297, тобто між позиціями 294 і 300, внаслідок незначних варіацій послідовності антитіла. Такі фукозиловані варіанти можуть мати поліпшену функцію ADCC. Див., наприклад, публікацію патенту США № US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Приклади публікацій, що стосуються "дефукозилованих" або "позбавлених фукози" варіантів антитіла, включають: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki et al. Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004). Приклади клітинних ліній, здатних продукувати дефукозиловані антитіла, включають Lec13 CHO клітини, позбавлені фукозилювання білків (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); патентна заявка США № US 2003/0157108 A1, Presta, L., і WO 2004/056312 A1, Adams et al., зокрема в Прикладі 11), і нокаутні клітинні лінії, такі як нокаутні по гену альфа-1,6-фукозилтрансферази, FUT8, клітини CHO (див., наприклад, Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); і WO2003/085107).

Додатково представлені варіанти антитіл із розрізаними пополам олігосахаридами, наприклад, в яких 2-антенарний олігосахарид, приєднаний до ділянки Fc антитіла, розрізаний пополам на GlcNAc. Такі варіанти антитіла можуть мати знижене фукозилювання і/або поліпшену функцію ADCC. Приклади таких варіантів антитіл описані, наприклад, в WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); патенті США № 6602684 (Umana et al.); і US 2005/0123546 (Umana et al.). Варіанти антитіл принаймні із одним залишком галактози в олігосахариді, приєднаному до ділянки Fc, також розглянуті. Такі варіанти антитіл можуть мати поліпшену функцію CDC. Такі варіанти антитіл описані, наприклад, в WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); і WO 1999/22764 (Raju, S.).

с) Варіанти ділянки Fc

У певних варіантах здійснення винаходу одна або декілька амінокислотних модифікацій можуть бути внесені в ділянку Fc антитіла, розглянутого в цьому документі, тим самим утворюючи варіант ділянки Fc. Варіант ділянки Fc може включати послідовність ділянки Fc людини (наприклад, ділянка Fc IgG1, IgG2, IgG3 або IgG4 людини), що містить амінокислотну модифікацію (наприклад, заміну) в одній або декількох амінокислотних позиціях.

У певних варіантах здійснення винахід розглядає варіант антитіла, який має деякі, але не всі ефекторні функції, що робить його цільовим кандидатом для застосування, де час життя антитіла *in vivo* важливий, незважаючи на те, що певні ефекторні функції (такі як комплемент і ADCC) не є необхідними або шкідливо впливають. Аналізи цитотоксичності *in vitro* і *in vivo* можуть бути виконані для підтвердження зменшення/падіння активності CDC і/або ADCC. Наприклад, аналізи зв'язування Fc рецептора (FcR) можуть бути виконані, щоб пересвідчитися в тому, що у антитіла відсутня зв'язуюча FcγR активність (тим самим, мабуть, відсутня активність ADCC), але зберігається здатність зв'язування FcRn. Первинні клітини для опосередковування ADCC, клітини NK, експресують тільки FcRIII, в той час як моноцити експресують FcRI, FcRII і FcRIII. Дані по експресії FcR у гематопоетичних клітинах зведені в Таблицю 3 на сторінці 464 статті Ravetch і Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991). Необмежені приклади аналізів *in vitro* за оцінкою активності ADCC являючої інтерес молекули описані в патенті США № 5500362 (див., наприклад, Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA

83:7059-7063 (1986)) і Hellstrom, I. et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5821337 (див. Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)). Альтернативно можуть бути застосовані нерадіоактивні способи аналізу (див., наприклад, АСТІ™ нерадіоактивний аналіз цитотоксичності для проточної цитометрії (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; і CytoTox 96® нерадіоактивний аналіз цитотоксичності (Promega, Madison, WI)). Придатні ефекторні клітини для таких аналізів включають моноклеарні клітини периферичної крові (PBMC) і клітини натуральних кілерів (NK). Альтернативно, або додатково, активність ADCC являючої інтерес молекули може бути оцінена *in vivo*, наприклад, в тваринній моделі, такий як описано в Clynes et al. Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998). Аналізи зв'язування C1q можуть бути також виконані для підтвердження того, що антитіло не здатне зв'язувати C1q і, отже, у нього відсутня активність CDC. Див., наприклад, ELISA зв'язування C1q і C3c в WO 2006/029879 і WO 2005/100402. Для оцінки активації комплементу може бути виконаний аналіз CDC (див., наприклад, Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996); Cragg, M.S. et al., Blood 101:1045-1052 (2003); і Cragg, M.S. і M.J. Glennie, Blood 103:2738-2743 (2004)). Зв'язування FcRn і визначення кліренсу/час життя *in vivo* можуть бути також виконані, використовуючи способи, відомі в даній галузі техніки (див., наприклад, Petkova, S.B. et al., Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)).

Антитіла із зниженою ефекторною функцією включають такі із заміною одного або декількох залишків ділянки Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 і 329 (патент США № 6737056). Такі мутанти Fc включають мутантів Fc із замінами в двох або більше амінокислотних позиціях 265, 269, 270, 297 і 327, включаючи так званий мутант Fc "DANA" із заміною залишків 265 і 297 на аланін (патент США № 7332581).

Описані певні варіанти антитіла з поліпшеною або зниженою активністю зв'язування Fc (див., наприклад, патент США № 6737056; WO 2004/056312, і Shields et al., J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)).

У певних варіантах здійснення винаходу варіант антитіла містить ділянку Fc із однією або декількома амінокислотними замінами, які поліпшують ADCC, наприклад, заміни в позиціях 298, 333 і/або 334 ділянки Fc (нумерація EU залишків).

У деяких варіантах здійснення винаходу зміни внесені в ділянку Fc, що приводить до зміненого (тобто або поліпшеного, або зниженого) зв'язування C1q і/або комплемент-залежної цитотоксичності (CDC), наприклад, як описано в патенті США № 6194551, WO 99/51642 і Idusogie et al. J. Immunol. 164:4178-4184 (2000).

Антитіла з підвищеними годинами життя і поліпшеним зв'язуванням із неонатальним рецептором Fc (FcRn), який відповідає за перенесення материнських IgG ембріону (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) і Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) описані в US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Ці антитіла включають ділянку Fc із однією або декількома замінами в ньому, що поліпшує зв'язування ділянки Fc з FcRn. Такі варіанти Fc включають такі із замінами в одному або декількох залишках ділянки Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 або 434, наприклад, заміна залишку 434 ділянки Fc (патент США № 7371826).

Див. також Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988); патент США № 5648260; патент США № 5624821; і WO 94/29351 відносно інших прикладів варіантів ділянки Fc.

d) Цистеїнові сконструйовані варіанти антитіла

У певних варіантах здійснення потрібно створити цистеїнові сконструйовані антитіла, наприклад, "thioMAbs", в яких один або декілька залишків антитіла замінені залишками цистеїну. У приватних варіантах здійснення винаходу замінені залишки знаходяться в доступних ділянках антитіла. Шляхом заміни цих залишків цистеїном реактивні тіолові групи, тим самим, розташовані в доступних ділянках антитіла і можуть бути використані для кон'югування антитіла з іншими молекулами, такими як молекули лікарських препаратів або зв'язаними із лінкером молекулами лікарських препаратів, для створення імунокон'югату, як описано далі в цьому документі. У певних варіантах здійснення винаходу будь-якого або декілька із нижченаведених залишків можуть бути замінені на цистеїн: V205 (нумерація Kabat) легкого ланцюга; A118 (нумерація EU) важкого ланцюга; і S400 (нумерація EU) ділянки Fc важкого ланцюга. Цистеїнові сконструйовані антитіла можуть бути створені, як описано, наприклад, в патенті США № 7521541.

е) Похідні антитіл

У певних варіантах здійснення винаходу представлено в цьому документі антитіло може бути додатково модифіковане з метою вмісту небілковоподібних молекул, відомих в даній галузі техніки і загальнодоступних. Молекули, придатні для отримання похідних антитіла, включають, крім іншого, водорозчинні полімери. Необмежені приклади водорозчинних полімерів

включають, крім іншого, поліетиленгліколь (PEG), співполімери етиленгліколю/пропіленгліколю, карбоксиметилцелюлозу, декстран, полівініловий спирт, полівінілпіролідон, полі-1,3-діоксолан, полі-1,3,6-триоксан, співполімер етилену/малеїнового ангідриду, поліамінокислоти (або гомополімери, або випадкові співполімери), і декстран або полі(N-вінілпіролідон)поліетиленгліколь, гомополімери пропропіленгліколю, співполімери поліпропіленоксиду/етиленоксиду, поліоксєтилування поліюли (наприклад, гліцерол), полівініловий спирт і суміші вищепереліченого. Пропіональдегід поліетиленгліколю може мати переваги у виробництві внаслідок його стабільності у воді. Полімер може бути будь-якої молекулярної маси і може бути розгалуженим або нерозгалуженим. Число полімерів, прикріплених до антитіла, може варіювати, і якщо більше одного полімера приєднано, вони можуть бути однаковими або різними молекулами. У основному, число і/або тип полімерів, що використовуються для отримання похідних, можуть бути визначені, керуючись факторами, включаючи, крім іншого, певні властивості або функції антитіла, що підлягають удосконаленню, чи буде похідне антитіла використовуватися в терапії при певних умовах і т. п.

У іншому варіанті здійснення винаходу розглянуті кон'югати антитіла і небілковоподібні молекули, які можуть бути селективно нагріті під дією радіаційного опромінення. У одному із варіантів здійснення винаходу небілковоподібною молекулою є вуглецева нанотрубка (Kam et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005)). Радіоактивне випромінювання може бути будь-якої довжини хвилі і містить, крім іншого, довжини хвиль, які не ушкоджують нормальні клітини, але які нагрівають небілковоподібні молекули до температури, при якій гинуть клітини, близькорозташовані до комплексу антитіло-небілковоподібна молекула.

В. Рекombінантні способи і композиції

Антитіла можуть бути продуковані, використовуючи рекombінантні способи і композиції, наприклад, як описано в патенті США № 4816567. У одному із варіантів здійснення винаходу представлена виділена нуклеїнова кислота, яка кодує антитіло проти мезотеліну, описане в цьому документі. Така нуклеїнова кислота може кодувати амінокислотну послідовність, що містить VL і/або амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла (наприклад, легкий і/або важкий ланцюг антитіла). У додатковому варіанті здійснення винаходу представлений один або декілька векторів (наприклад, експресійні вектори), що містять таку нуклеїнову кислоту. У додатковому варіанті здійснення винаходу представлена клітина-хазяїн, що містить таку нуклеїнову кислоту. У одному із таких варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн містить (наприклад, була трансформована): (1) вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VL антитіла і амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла, або (2) перший вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VL антитіла, і другий вектор, що містить нуклеїнову кислоту, яка кодує амінокислотну послідовність, що містить VH антитіла. У одному із варіантів здійснення винаходу клітина-хазяїн є еукаріотичною, наприклад, клітиною яєчника китайського хом'ячка (CHO) або лімфоїдною клітиною (наприклад, YO, NS0, Sp20 клітиною). У одному із варіантів здійснення винаходу представлений спосіб створення антитіла проти мезотеліну, де спосіб містить культивування клітини-хазяїна, що містить нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, як розглянуто вище, в умовах, придатних для експресії антитіла, і в деяких випадках виділення антитіла із клітини-хазяїна (або із середовища культивування клітини-хазяїна).

Для рекombінантного продукування антитіла проти мезотеліну нуклеїнову кислоту, що кодує антитіло, наприклад, як описано вище, виділяють і вставляють в один або декілька векторів для подальшого клонування і/або експресії в клітині-хазяїні. Такі нуклеїнові кислоти можуть бути без особливих зусиль виділені і секвеновані, використовуючи загальноприйняті методики (наприклад, шляхом використання олігонуклеотидних зондів, які мають здатність специфічно зв'язуватися з генами, що кодують важкий і легкий ланцюг антитіла).

Придатні клітини-хазяїни для клонування або експресії кодуючих антитіло векторів включають прокаріотичні або еукаріотичні клітини, описані вище. Наприклад, антитіла можуть бути продуковані в бактеріях, зокрема, коли немає необхідності в глікозилюванні і ефекторних функціях Fc. Для експресії фрагментів антитіла і поліпептидів в бактеріях див., наприклад, патенти США №№ 5648237, 5789199 і 5840523. (Див. також Charlton, *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, описуючі експресію фрагментів антитіла в *E. coli*.) Після експресії антитіло може бути виділене із бактеріальної клітинної суспензії в розчинній фракції і може бути додатково очищено.

Крім прокаріот еукаріотичні мікроби, такі як міцеліальні гриби або дріжджі, є придатними хазяїнами з точки зору клонування або експресії для кодуючих антитіло векторів, включаючи штами грибів і дріжджів, у яких шляхи глікозилювання були "гуманізовані", зумовлюючи

продукування антитіла із частково або повністю патерном глікозилювання людини. Див. Gerngross, Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004), і Li et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006).

Придатні клітини-хазяїни для експресії глікозилюваного антитіла також отримують із багатоклітинних організмів (безхребетних і хребетних). Приклади клітин безхребетних включають клітини рослин і комах. Були ідентифіковані численні бакуловірусні штами, які можуть бути використані спільно з клітинами комах, зокрема, для трансфекції клітин *Spodoptera frugiperda*.

Культури клітин рослин можуть також бути використані як хазяїни. Див., наприклад, патенти США №№ 5959177, 6040498, 6420548, 7125978 і 6417429 (що описують технологію PLANTIBODIES™ для продукування антитіл в трансгенних рослинах).

Клітини хребетних можуть бути також використані як хазяїни. Наприклад, клітинні лінії ссавців, адаптовані для росту в суспензії, можуть бути придатними. Іншими прикладами придатних клітинних ліній-хазяїнів ссавців є трансформована SV40 лінія CV1 нирок мавпи (COS-7); лінія ембріональних нирок людини (293 або 293 клітини, як описано, наприклад, в Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); клітини нирок хом'ячків (BHK); мишачі клітини Сертолі (TM4 клітини, як описано, наприклад, в Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); клітини нирок мавпи (CV1); клітини нирок африканської зеленої мавпи (VERO-76); клітини карциноми шийки матки людини (HELA); клітини нирок собаки (MDCK); клітини печінки сірого щура (BRL 3A); клітини легені людини (W138); клітини печінки людини (HepG2); пухлина молочної залози миші (MMT 060562); клітини TRI, як описано, наприклад, в Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982); клітини MRC 5; і клітини FS4. Інші придатні клітинні лінії-хазяїни ссавців включають клітини яєчника китайського хом'ячка (CHO), включаючи клітини DHFR⁺CHO (Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); і клітинна лінія мієломи, така як Y0, NS0 і Sp2/0. Для оглядового розгляду певних клітинних ліній-хазяїнів ссавців, придатних для продукування антитіл, див., наприклад, Yazaki and Wu, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), pp. 255-268 (2003).

С. Способи

Антитіла проти мезотеліну, представлені в цьому документі, можуть бути ідентифіковані, відібрані або охарактеризовані за їх фізичними/хімічними властивостях і/або біологічними активностями за допомогою різних способів, відомих в даній галузі техніки.

У одному із аспектів, антитіло за винаходом тестують на предмет його активності зв'язування антигену, наприклад, відомими способами, такими як ELISA, FACS або Вестерн-блот.

У іншому аспекті, конкурентний аналіз може бути використаний для ідентифікації антитіла, яке конкурує із будь-яким із антитіл, описаних в цьому документі, за зв'язуванням із мезотеліном. У певних варіантах здійснення винаходу таке конкуруюче антитіло зв'язується із тим же самим епітопом (наприклад, лінійним або конформаційним епітопом), з яким зв'язується антитіло, описане в цьому документі. Докладні ілюстративні способи картування епітопу, з яким зв'язується антитіло, представлені в статті Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols" Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ).

У типовому конкурентному аналізі іммобілізований мезотелін інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, яке зв'язується із мезотеліном (наприклад, будь-яке із антитіл, описаних в цьому документі), і друге немічене антитіло, яке підлягає тестуванню на предмет його здатності конкурувати із першим антитілом за зв'язування з мезотеліном. Друге антитіло може знаходитися в супернатанті гібридами. Як контроль іммобілізований мезотелін інкубують в розчині, що містить перше мічене антитіло, але не друге немічене антитіло. Після інкубації в умовах, що допускають зв'язування першого антитіла з мезотеліном, надлишок незв'язаного антитіла видаляють, і вимірюють кількість мітки, зв'язаної із іммобілізованим мезотеліном. Якщо кількість мітки, зв'язаної з іммобілізованим мезотеліном, істотно знижена в тестованому зразку відносно контрольного зразка, тоді це означає, що друге антитіло конкурує з першим антитілом за зв'язування з мезотеліном. Див. Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

D. Імунокон'югати

Винахід також являє імунокон'югати, що містять антитіло проти мезотеліну кон'юговане відповідно до цього документа із одним або декількома цитотоксичними агентами, такими як хіміотерапевтичні засоби або лікарські препарати, інгібітори росту, токсини (наприклад, білкові токсини, ферментативно активні токсини бактеріального, грибового, рослинного або тваринного походження або їх фрагменти) або радіоактивні ізотопи.

У одному із варіантів здійснення винаходу імунокон'югат являє собою кон'югат антитіла-лікарського препарату (ADC), в якому антитіло кон'юговане із одним або декількома лікарськими

препаратами, включаючи, крім іншого, майтанзиноїд (див. патенти США №№ 5208020, 5416064 і Європейський патент EP 0 425 235 B1); ауристин, такий як D_E і D_F групи лікарського препарату монометилауристатину (MMAE і MMAF) (див. патенти США №№ 5635483 і 5780588 і 7498298); доластатин; каліхеаміцин або його похідне (див. патенти США №№ 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701, 5770710, 5773001 і 5877296; Hinman et al., Cancer Res. 53:3336-3342 (1993); і Lode et al., Cancer Res. 58:2925-2928 (1998)); антрациклін, такий як дауноміцин або доксорубіцин (див., Kratz et al., Current Med. Chem. 13:477-523 (2006); Jeffrey et al., Bioorganic & Med. Chem. Letters 16:358-362 (2006); Torgov et al., Bioconj. Chem. 16:717-721 (2005); Nagy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:829-834 (2000); Dubowchik et al., Bioorg. & Med. Chem. Letters 12:1529-1532 (2002); King et al., J. Med. Chem. 45:4336-4343 (2002); і патент U.S. № 6630579); метотрексат; віндезин; таксан, такий як доцетаксел, паклітаксел, ларотаксел, тезетаксел і ортатаксел; трихотецен і CC1065.

У іншому варіанті здійснення винаходу імунокон'югат включає антитіло, як описано в цьому документі, кон'юговане із ферментативно активним токсином або його фрагментом, включаючи, крім іншого, А-ланцюг дифтерійного токсину, які незв'язують активні фрагменти дифтерійного токсину, А-ланцюг екзотоксину (із *Pseudomonas aeruginosa*), А-ланцюг рицини, А-ланцюг абрину, А-ланцюг модецину, альфа-сарцин, білки *Aleurites fordii*, білки діантини, білки лаконосу американського (PAPI, PAPII і PAP-S), інгібітор момордики харантської, курцин, кротин, інгібітор Мильнянки лікарської, гелонін, мітогелін, рестриктоцин, феноміцин, еноміцин і трихотецени.

У іншому варіанті здійснення винаходу імунокон'югат містить антитіло, як описано в цьому документі, кон'юговане із радіоактивним атомом з утворенням радіоактивного кон'югату. Цілий ряд радіоактивних ізотопів загальнодоступний для синтезу радіоактивних кон'югатів. Приклади включають At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² і радіоактивні ізотопи Lu. Коли радіоактивний кон'югат використовується для детекції, він може включати радіоактивний атом для сцинтиграфічних досліджень, наприклад, tc99m або I¹²³, або спінову мітку для ядерної магнітно-резонансної томографії (NMR) (також відомої як магнітно-резонансна томографія, mri), таку як йод-123, йод-131, індій-111, фтор-19, вуглець-13, азот-15, кисень-17, гадоліній, марганець або залізо.

Кон'югати антитіла і цитотоксичного агента можуть бути створені, використовуючи біфункціональні білок-зшиваючі агенти, такі як N-сукцинімідил 3-(2-піридилдитіо)пропіонат (SPDP), сукцинімідил-4-(N-малеїмідометил)циклогексан-1-карбоксилат (SMCC), імінотіолан (IT), біфункціональні похідні імідоефірів (такі як диметиладіпімідат HCl), активні складні ефіри (такі як дисукцинімідилсуберат), альдегіди (такі як глутаральдегід), біс-азидо сполуки (такі як біс-(п-азидобензоїл)гександіамін), похідні біс-діазонію (такі як біс-(п-діазонійбензоїл)етилендіамін), діізоціанати (такі як толуол-2,6-діізоціанат) і біс-сполуки активного фтору (такі як 1,5-дифтор-2,4-динітробензол). Наприклад, рициновий імунотоксин можна отримувати, як описано в Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Ілюстративним хелатуючим агентом для кон'югації радіонукліда із антитілом є мічена по вуглецю-14 1-ізоціанатбензил-3-метилдіетилен триамінпентаоцтова кислота (MX-DTPA). Див. WO94/11026. Лінкер може бути "розщеплюваний лінкер", що полегшує вивільнення цитотоксичного лікарського препарату в клітину. Наприклад, кислотний лабільний лінкер, пептидаза-чутливий лінкер, фотолабільний лінкер, диметильний лінкер або дисульфідвмісний лінкер (Chari et al., Cancer Res. 52:127-131 (1992); патент США № 5208020) можуть бути використані.

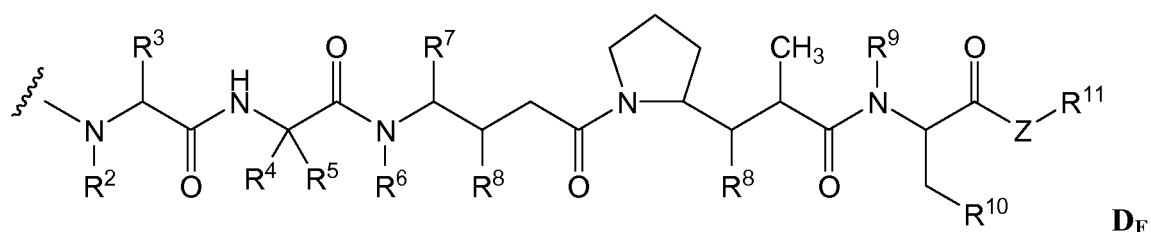
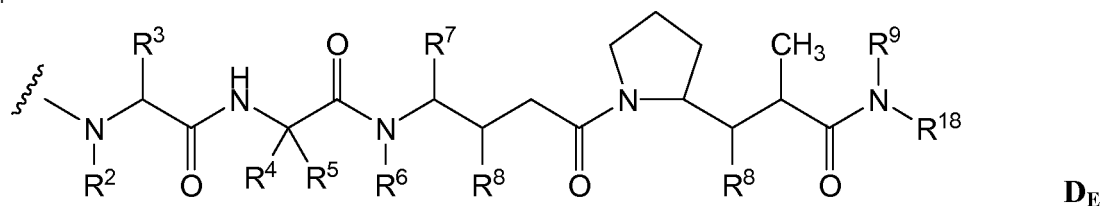
Імунокон'югати або ADC в цьому документі спеціально розглянуті, не обмежуючись такими кон'югатами, приготованими за допомогою перехресно-зшиваючих реагентів, включаючи, крім іншого, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, сульфо-EMCS, сульфо-GMBS, сульфо-KMUS, сульфо-MBS, сульфо-SIAB, сульфо-SMCC і сульфо-SMPB і SVSB (сукцинімідил-(4-вінілсульфон)бензоат), які є комерційно доступними (наприклад, в Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A.).

Імунокон'югати, які містять ауристатини і доластатини

У деяких варіантах здійснення винаходу імунокон'югат містить антитіло за винаходом, кон'юговане з доластатином або пептидним аналогом або похідним доластатину, наприклад, ауристатином (патенти США №№ 5635483; 5780588). Показано, що доластатини і ауристатини перешкоджають динамічній активності мікротрубочок, гідролізу ГТФ і поділу ядра і клітини (Woyke et al. (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) і мають протипухлинну (патент США № 5663149) і протигрибкову активність (Pettit et al., (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Молекула лікарського засобу доластатину або ауристатину може бути приєднана до антитіла через N(аміно)кінець або C(карбоксильний)кінець пептидної групи лікарського засобу (WO 02/088172).

Ілюстративні варіанти здійснення ауристатину включають приєднані по N-кінцю групи DE і DF лікарського препарату монометилауристатину. (Див. патенти США №№ 7659241, 7498298 і 7745394).

Пептидна група лікарського препарату може бути вибрана із нижченаведених Формул D_E і D_F:



де хвиляста лінія D_E і D_F вказує на ділянку ковалентного приєднання до антитіла або антитіла-лінкерного компонента, і незалежно, в кожному положенні:

R² вибраний із H і C₁-C₈-алкілу;
R³ вибраний із H, C₁-C₈-алкілу, C₃-C₈-карбоциклу, арилу, C₁-C₈-алкілурилу, C₁-C₈-алкіл-(C₃-C₈-карбоциклу), C₃-C₈-гетероциклу і C₁-C₈-алкіл-(C₃-C₈-гетероциклу);

R⁴ вибраний із H, C₁-C₈-алкілу, C₃-C₈-карбоциклу, арилу, C₁-C₈-алкілурилу, C₁-C₈-алкіл-(C₃-C₈-карбоциклу), C₃-C₈-гетероциклу і C₁-C₈-алкіл-(C₃-C₈-гетероциклу);
R⁵ вибраний із H і метилу;

або R⁴ і R⁵ спільно утворюють карбоциклічну кільцеву систему і мають формулу -(CR^aR^b)_n, де R^a і R^b незалежно вибрані із H, C₁-C₈-алкілу і C₃-C₈-карбоциклу, і n вибраний із 2, 3, 4, 5 і 6;

R⁶ вибраний із H і C₁-C₈-алкілу;
R⁷ вибраний із H, C₁-C₈-алкілу, C₃-C₈-карбоциклу, арилу, C₁-C₈-алкілурилу, C₁-C₈-алкіл-(C₃-C₈-карбоциклу), C₃-C₈-гетероциклу і C₁-C₈-алкіл-(C₃-C₈-гетероциклу);

кожний R⁸ незалежно вибраний із H, OH, C₁-C₈-алкілу, C₃-C₈-карбоциклу і O-(C₁-C₈-алкілу);

R⁹ вибраний із H і C₁-C₈-алкілу;

R¹⁰ вибраний із арилу або C₃-C₈-гетероциклу;

Z являє собою O, S, NH, або NR¹², де R¹² являє собою C₁-C₈-алкіл;

R¹¹ вибраний із H, C₁-C₂₀-алкілу, арилу, C₃-C₈-гетероциклу, -(R¹³O)_m-R¹⁴, або -(R¹³O)_m-CH(R¹⁵)₂;

m являє собою ціле число в діапазоні 1-1000;

R¹³ являє собою C₂-C₈-алкіл;

R¹⁴ являє собою H або C₃-C₈-алкіл;

кожна поява R¹⁵ незалежно являє собою H, COOH, -(CH₂)_n-N(R¹⁶)₂, -(CH₂)_n-SO₃H або -(CH₂)_n-SO₃-C₁-C₈-алкіл;

кожна поява R¹⁶ незалежно являє собою H, C₁-C₈-алкіл або -(CH₂)_n-COOH;

R¹⁸ вибраний із -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-арилу, -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈-гетероциклу) і -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-(C₃-C₈-карбоциклу); і

n являє собою ціле число в діапазоні від 0 до 6.

У одному із варіантів здійснення винаходу R³, R⁴ і R⁷ незалежно являють собою ізопропіл або втор-бутил, і R⁵ являє собою H або метил. У ілюстративному варіанті здійснення винаходу кожний із R³ і R⁴ являє собою ізопропіл, R⁵ являє собою -H, і R⁷ являє собою втор-бутил.

У ще іншому варіанті здійснення винаходу кожний із R² і R⁶ являє собою метил, і R⁹ являє собою -H.

У іншому варіанті здійснення винаходу кожна поява R⁸ являє собою -OCH₃.

У ілюстративному варіанті здійснення винаходу кожний із R³ і R⁴ являє собою ізопропіл, кожний із R² і R⁶ являє собою метил, R⁵ являє собою -H, R⁷ являє собою втор-бутил, кожна поява R⁸ являє собою -OCH₃, і R⁹ являє собою -H.

У одному із варіантів здійснення винаходу Z являє собою -O- або -NH-.

У одному із варіантів здійснення винаходу R^{10} являє собою арил.

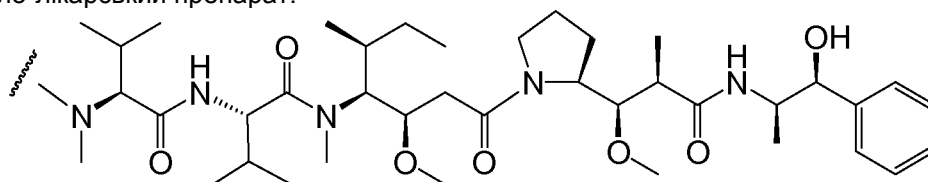
У ілюстративному варіанті здійснення R^{10} являє собою феніл.

У ілюстративному варіанті здійснення, коли Z являє собою -O-, R^{11} являє собою -H, метил або трет-бутил.

5 У одному із варіантів здійснення винаходу, коли Z являє собою -NH, R^{11} являє собою -CH(R^{15})₂, де R^{15} являє собою -(CH₂)_n-N(R^{16})₂, і R^{16} являє собою -C₁-C₈-алкіл або -(CH₂)_n-COOH.

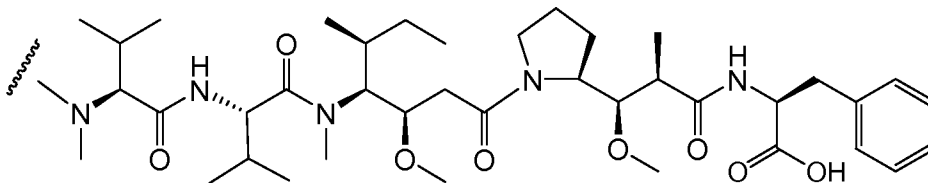
У іншому варіанті здійснення, коли Z являє собою -NH, R^{11} являє собою -CH(R^{15})₂, де R^{15} являє собою -(CH₂)_n-SO₃H.

10 Ілюстративний варіант здійснення ауристатину формули D_E являє собою MMAE (монометилауристатин E), де хвиляста лінія вказує на ковалентний зв'язок із лінкером кон'югата антитіло-лікарський препарат:



MMAE.

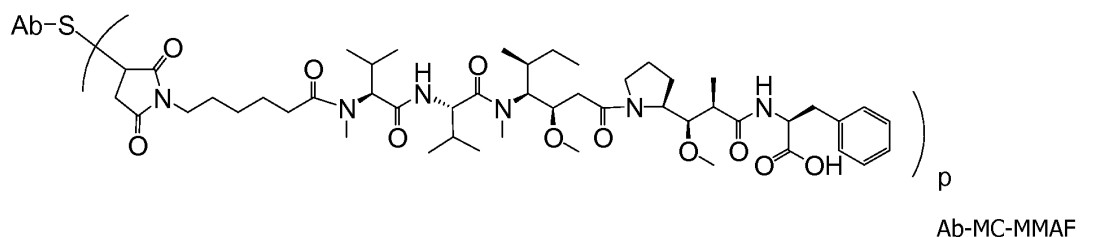
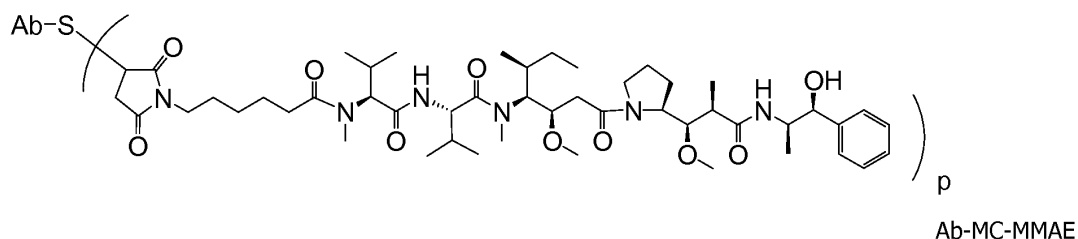
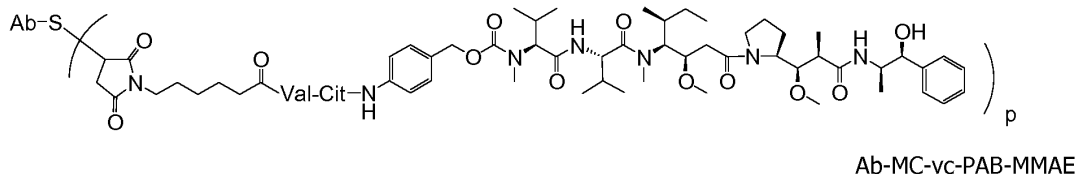
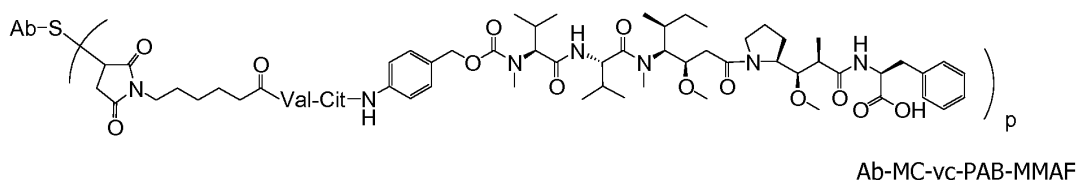
15 Ілюстративний варіант здійснення ауристатину формули D_F являє собою MMAF (монометилауристатин F, варіант ауристатину E (MMAE) із фенілаланіном на C-кінці лікарського препарату), де хвиляста лінія вказує на ковалентний зв'язок із лінкером кон'югата антитіло-лікарський препарат (див. US 2005/0238649 і Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124):



MMAF.

20 У одному із аспектів до молекули лікарського препарату по R^{11} можна приєднати гідрофільні групи, включаючи, крім іншого, складні ефіри триетиленгліколю (TEG), як показано вище. Без зв'язку з якою-небудь конкретною теорією гідрофільні групи допомагають в інтерналізації і перешкоджають агрегації молекули лікарського препарату.

25 Ілюстративні варіанти здійснення ADC, що містять ауристатин/доластатин або їх похідні, описані в US 2005/0238649 A1 і Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124, які спеціально включені в цей документ як посилання. Ілюстративні варіанти здійснення ADC, що містять MMAE або MMAF і різні лінкерні компоненти, мають наступні структури і аббревіатури (де "Ab" являє собою антитіло; р являє собою навантаження лікарським препаратом (середнє число молекул лікарського препарату на одне антитіло) і варіює приблизно від 1 до приблизно 8; "vc" являє собою "val-cit", тобто дипептид валін-цитрулін; і "S" являє собою атом сірки:



Ілюстративні варіанти здійснення ADC, що містять MMAF і різні лінкерні компоненти, додатково включають Ab-MC-PAB-MMAF і Ab-PAB-MMAF. Цікаво, що імунокон'югати, що містять MMAF, приєднаний до антитіла за допомогою лінкера, який протеолітично не розщеплюється, мають активність, порівнянню із імунокон'югатами, що містять MMAF, приєднаний до антитіла за допомогою лінкера, який протеолітично розщеплюється. Див., Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. В таких випадках вважають, що вивільнення лікарського препарату діє за допомогою руйнування антитіла в клітині. Id.

Як правило, основані на пептидах молекули лікарських препаратів можуть бути приготовані шляхом утворення пептидного зв'язку між двома або більше амінокислотами і/або пептидними фрагментами. Такі пептидні зв'язки можуть бути отримані, наприклад, керуючись способом рідкофазного синтезу (див. E. Schroder and K. Lubke, "The Peptides", volume 1, pp.76-136, 1965, Academic Press), який добре відомий в галузі хімії пептидів. Молекули лікарського препарату ауристатину/доластатину можуть бути отримані відповідно до способів: US 2005/0238649 A1; патент US № 5635483; патент US № 5780588; Pettit et al (1989) J. Am. Chem. Soc. 111:5463-5465; Pettit et al (1998) Anti-Cancer Drug Design 13:243-277; Pettit, G.R., et al. Synthesis, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1 5:859-863; і Doronina (2003) Nat. Biotechnol. 21(7):778-784.

Зокрема молекули лікарського препарату ауристатину/доластатину формули D_F, такі як MMAF і його похідні, можуть бути отримані, використовуючи способи, описані в US 2005/0238649 A1 і Doronina et al. (2006) Bioconjugate Chem. 17:114-124. Молекули лікарського препарату ауристатину/доластатину формули D_E, такі як MMAE і його похідні, можуть бути отримані, використовуючи способи, описані в статті Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784. Молекули зв'язаного з лінкером лікарського препарату MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF і MC-vc-PAB-MMAE можуть бути успішно синтезовані загальноприйнятими способами, наприклад, як описано в статті Doronina et al. (2003) Nat. Biotech. 21:778-784 і в публікації патентної заявки № US 2005/0238649 A1, і потім кон'юговані із антитілом, що представляє інтерес.

Е. Способи і композиції для діагностики і детекції

У певних варіантах здійснення винаходу будь-яке із антитіл проти мезотеліну, представлених в цьому документі, придатне для детекції наявності мезотеліну в біологічному зразку. Термін "детекція" в тому значенні, в якому використовується в цьому документі, охоплює поняття кількісної або якісної детекції. "Біологічний зразок" містить в собі, наприклад, клітину

5 або тканину (наприклад, матеріал біопсії, включаючи злоякісну або потенційно злоякісну тканину підшлункової залози, яєчника, легені або ендометрія, або мезотеліому) або сироватку.

У одному із варіантів здійснення винахід стосується антитіла проти мезотеліну для використання в способі діагностики або детекції. У додатковому аспекті представлений спосіб детекції наявності мезотеліну в біологічному зразку. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб містить взаємодію біологічного зразка із антитілом проти мезотеліну, як описано в цьому документі, в умовах, що допускають зв'язування антитіла проти мезотеліну з мезотеліном, і детекцію наявності або відсутності утворення комплексу між антитілом проти мезотеліну і мезотеліном в біологічному зразку. Такий спосіб може бути способом *in vitro* або *in vivo*. У

10 одному із варіантів здійснення винаходу антитіло проти мезотеліну використовується для відбору індивідів, відповідних для терапевтичного лікування з використанням антитіла проти мезотеліну, наприклад, де мезотелін є біомаркером для відбору пацієнтів. У додатковому варіанті здійснення винаходу біологічним зразком є сироватка, наприклад, де детектують мезотелін, який був виділений раковими клітинами в сироватку.

У додатковому варіанті здійснення винаходу *in vivo* використовується антитіло проти мезотеліну для детекції, наприклад, шляхом візуалізації *in vivo*, позитивної по мезотеліну злоякісної пухлини у індивіда, наприклад, з метою діагностики, прогнозування або визначення стадії злоякісного новоутворення, визначення відповідного курсу терапії або моніторингу відповіді злоякісної пухлини на терапію. Одним із способів, відомих в даній галузі техніки, для детекції *in vivo* є імунно-позитронна емісійна томографія (імуно-PET), як описано, наприклад, в

20 статті van Dongen et al., The Oncologist 12:1379-1389 (2007) і Verel et al., J. Nucl. Med. 44:1271-1281 (2003). В таких варіантах здійснення винаходу представлений спосіб для детекції позитивної по мезотеліну злоякісної пухлини у індивіда, спосіб, що містить введення міченого антитіла проти мезотеліну індивіду, що має або потенційно має позитивну по мезотеліну злоякісну пухлину, і детекцію міченого антитіла проти мезотеліну у індивіда, де детекція міченого антитіла проти мезотеліну вказує на позитивну по мезотеліну злоякісну пухлину у індивіда. У деяких таких варіантах здійснення винаходу мічене антитіло проти мезотеліну містить антитіло проти мезотеліну, кон'юговане із випромінювачем позитронів, таких як ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr і ^{124}I . У окремому варіанті здійснення винаходу випромінювачем позитронів є ^{89}Zr .

У додатковому варіанті здійснення винаходу спосіб діагностики або детекції містить взаємодію першого антитіла проти мезотеліну, іммобілізованого на субстрат, із біологічним зразком, що підлягає тестуванню на предмет наявності мезотеліну, вплив на субстрат другого антитіла проти мезотеліну і детекцію наявності або відсутності зв'язку другого антитіла проти мезотеліну із комплексом між першим антитілом проти мезотеліну і мезотеліном в біологічному зразку. Як субстрат може виступати будь-яке підтримуюче середовище, наприклад, скло, метал, кераміка, полімерні кульки, предметні стекла, чипи і інші субстрати. У певних варіантах здійснення винаходу біологічний зразок містить клітину або тканину (наприклад, матеріал біопсії, включаючи злоякісну або потенційно злоякісну тканину підшлункової залози, яєчника, легені або ендометрія, або мезотеліому) або сироватку, тобто сироватку, в яку був виділений мезотелін. У певних варіантах здійснення винаходу перше або друге антитіло проти мезотеліну є будь-яким антитілом, розглянутим в цьому документі. У таких варіантах здійснення винаходу другим антитілом проти мезотеліну може бути 19C3 або можуть бути антитіла, отримані із 19C3, як описано в цьому документі.

Ілюстративні порушення, які можуть бути діагностовані або детектовані за будь-яким із вищеперерахованих варіантів здійснення винаходу включають позитивні по мезотеліну злоякісні пухлини, такі як позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення підшлункової (включаючи протокову аденокарциному підшлункової залози), позитивний по мезотеліну рак легені (включаючи недрібноклітинну карциному легені (NSCLC)), мезотеліому і позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення ендометрія. У одному із варіантів здійснення винаходу позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення є злоякісною пухлиною, якій привласнюють антимезотеліновий імуногістохімічний (IHC) бал більше "0", який відповідає дуже слабкому фарбуванню або його відсутності у >90 % пухлинних клітин, в умовах, описаних в цьому документі в Прикладі J. У іншому варіанті здійснення винаходу в позитивній по мезотеліну злоякісній пухлині експресується мезотелін на рівні 1+, 2+ або 3+, як визначено в умовах,

60 описаних в цьому документі в Прикладі J. Позитивна по мезотеліну злоякісна пухлина за будь-

яким із вищезгаданих варіантів здійснення винаходу може бути позитивною по двох антигенах злоякісною пухлиною.

У певних варіантах здійснення винаходу представлені мічені антитіла проти мезотеліну. Мітки включають, крім іншого, мітки або молекули, детекція яких відбувається напряду (такі як флуоресцентні, хромофорні, електронощільні, хемілюмінесцентні і радіоактивні мітки), а також молекули, такі як ферменти або ліганди, детекція яких відбувається опосередковано, наприклад, за допомогою ферментативної реакції або молекулярної взаємодії. Типові мітки включають, крім іншого, радіоізотопи ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H і ^{131}I , флуорофори, такі як хелати рідкісноземельних елементів або флуоресцеїн і їх похідні, родамін і його похідні, дансил, умбеліферон, люциферази, наприклад, люциферазу світляка і бактеріальну люциферазу (патент США № 4737456), люциферин, 2,3-дигідрофталазиндіони, пероксидазу хрону (HRP), лужну фосфатазу, β -галактозидазу, глюкоамілазу, лізоцим, оксидазу сахаридів, наприклад, оксидаза глюкози, оксидаза галактози і глюкозо-6-фосфатдегідрогеназа, гетероциклічні оксидази, такі як уриказа і ксантиноксидаза, в поєднанні із ферментами, які використовують перекис водню для окислення вихідного барвника, такими як HRP, лактопероксидазу, або мікропероксидазу, біотин/авідин, спінові мітки, стабільні вільні радикали і т. п. В іншому варіанті здійснення винаходу міткою є випромінювач позитронів. Випромінювачі позитронів включають, крім іншого, ^{68}Ga , ^{18}F , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{76}Br , ^{89}Zr і ^{124}I . У окремому варіанті здійснення винаходу випромінювачем позитронів є ^{89}Zr .

20 F. Фармацевтичні композиції

Фармацевтичні композиції антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату, як описано в цьому документі, готують змішуванням такого антитіла або імунокон'югату, що має необхідний ступінь чистоти з одним або декількома додатковими фармацевтично прийнятними носіями (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), в формі ліофілізованих композицій або водних розчинів. Фармацевтично прийнятні носії, в основному, нетоксичні для реципієнтів в дозах, що застосовуються і концентраціях, і включають, крім іншого: буфери, такі як фосфатний, цитратний, і інші органічні кислоти; антиоксиданти, включаючи аскорбінову кислоту і метіонін; консерванти (такі як октадецилдиметилбензил хлорид амоній; хлорид гексаметонію, хлорид бензалконію; хлорид бензетонію; фенол, бутіл або бензиловий спирт; алкіл-парабени, такі як метил- або пропіл-парабен; катехол; резорцинол; циклогексанол; 3-пентанол; і m-крезол); низькомолекулярні поліпептиди (приблизно менше 10 амінокислотних залишків); білки, такі як сироватковий альбумін, желатин або імуноглобуліни; гідрофільні полімери, такі як полівінілпіролідон; амінокислоти, такі як гліцин, глутамін, аспарагін, гістидин, аргінін або лізин; моносахариди, дисахариди і інші вуглеводи, в тому числі глюкоза, маноза або декстрини; хелатуючі агенти, такі як EDTA; цукри, такі як сахароза, маніт, трегалоза або сорбіт; утворюючі солі протиіони, такі як натрій; комплекси металів (наприклад, Zn-білкові комплекси); і/або неіонні сурфактанти, такі як поліетиленгліколь (PEG). Ілюстративні фармацевтично прийнятні носії в цьому документі додатково включають засоби диспергування лікарських засобів в міжклітинному просторі, такі як розчинні нейтрально-активні глікопротеїни гіалуронідази (sHASEGP), наприклад, розчинні глікопротеїни гіалуронідази людини PH-20, такі як rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Певні ілюстративні sHASEGP і способи застосування, включаючи rHuPH20, описані в публікаціях патентів США №№ 2005/0260186 і 2006/0104968. У одному із аспектів, sHASEGP комбінують із одним або декількома додатковими глікозаміногліканазами, такими як хондроїтиназами.

Ілюстративні композиції ліофілізованого антитіла або імунокон'югату описані в патенті США № 6267958. Водні композиції антитіла або імунокон'югату включають такі, описані в патенті США № 6171586 і WO2006/044908, де останні із згаданих композицій включають гістидин-ацетатний буфер.

Композиція в цьому документі може також містити більше одного активного інгредієнта по мірі необхідності лікування певного симптому захворювання, переважно такі із взаємодоповнюючими активностями, які не впливають негативним чином один на одного. Наприклад, може додатково вимагати забезпечення гемцитабіном, наприклад, для лікування позитивної по мезотеліну злоякісної пухлини, такої як позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення підшлункової залози (аденокарцинома підшлункової залози). У іншому прикладі, може додатково бути потрібне антитіло проти MUC16, кон'юговане із цитотоксичним агентом, наприклад, для лікування позитивного по мезотеліну злоякісного новоутворення або позитивного по двох антигенах злоякісного новоутворення, такого як позитивний по мезотеліну раку яєчника (серозна аденокарцинома яєчника) або позитивний по двох антигенах раку яєчника. Такі активні інгредієнти переважно присутні в комбінації в кількостях, ефективних для цільового використання.

Активні інгредієнти можуть бути укладені в мікрокапсули, приготовані, наприклад, способом коацервації або полімеризацією на межі розділу фаз, наприклад, гідроксиметилцелюлозні або желатинові мікрокапсули і мікрокапсули із полі(метилметацилат)у, відповідно, в колоїдних системах доставки лікарського препарату (наприклад, ліпосомах, альбумінових мікросферах, мікроемульсіях, наночастинках і нанокапсулах) або в макроемульсіях. Такі способи розглянуті в Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Можуть бути отримані препарати уповільненого вивільнення. Придатні приклади препаратів уповільненого вивільнення включають напівпроникні матриці із твердих гідрофобних полімерів, що містять антитіло або імунокон'югат, матриці яких представлені у вигляді профільованих виробів, наприклад, плівок або мікрокапсул.

Композиції, що підлягають використанню для введення *in vivo*, як правило, стерильні. Стерильність може бути успішно досягнута, наприклад, шляхом фільтрації через стерильні мембрани для фільтрації.

G. Терапевтичні способи і композиції

Будь-які із антитіл проти мезотеліну або імунокон'югатів, представлених в цьому документі, можуть бути використані в способах, наприклад, терапевтичних способах.

У одному із аспектів антитіло проти мезотеліну або імунокон'югат, представлені в цьому документі, використовуються в способі інгібування проліферації позитивних по мезотеліну клітин, способі, що містить вплив на клітину антитілом проти мезотеліну або імунокон'югатом в умовах, що допускають зв'язування антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату із мезотеліном на поверхні клітини, тим самим інгібуючи проліферацію клітини. У певних варіантах здійснення винаходу спосіб є способом *in vitro* або *in vivo*. У додаткових варіантах здійснення винаходу клітина є клітиною підшлункової залози, яєчника, легені, мезотеліоми або ендометрія. У додаткових варіантах здійснення винаходу клітина є позитивною по двох антигенах клітиною.

Інгібування клітинної проліферації *in vitro* може бути проаналізовано, використовуючи набір реактивів для люмінесцентного аналізу життєздатності клітин CellTiter-Glo™, комерційно доступного на фірмі Promega (Madison, WI). Цей аналіз визначає число живих клітин в культурі на базі оцінки кількості присутнього АТФ, який є ознакою метаболічно активних клітин. Див. Crouch et al. (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, патент США № 6602677. Аналіз може бути виконаний в 96- або 384-ямковому форматі, забезпечуючи можливість автоматизованого скринінгу високої продуктивності (HTS). Див. Cree et al. (1995) AntiCancer Drugs 6:398-404. Процедура аналізу містить додавання єдиного реагенту (CellTiter-Glo® Reagent) безпосередньо в клітини, які культивуються. Це приводить до лізису клітин і генеруванню люмінесцентного сигналу, що породжується люциферазною реакцією. Люмінесцентний сигнал пропорційний кількості присутнього АТФ, який напряду пропорційний числу живих клітин, присутніх в культурі. Дані можуть бути зареєстровані люмінометром або формуючим зображення пристроєм, оснащеним камерою із зарядовим зв'язком CCD. Люмінесценція на виході виражається у відносних світлових одиницях (RLU).

У іншому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату для використання як лікарського засобу. У додаткових аспектах винахід стосується антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату для використання в способі лікування. У певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату для використання в лікуванні позитивного по мезотеліну злоякісного новоутворення. У певних варіантах здійснення винахід стосується антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату для використання в способі лікування індивідуума, що має позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення, способі, що містить призначення індивідууму ефективної кількості антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату. У одному із таких варіантів здійснення винаходу спосіб додатково містить призначення індивідууму ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, як описано нижче.

У додатковому аспекті винахід стосується антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату для використання у виробництві або приготуванні лікарського препарату. У одному із варіантів здійснення винаходу лікарський препарат призначений для лікування позитивного по мезотеліну злоякісного новоутворення. У додатковому варіанті здійснення винаходу лікарський препарат призначений для використання в способі лікування позитивного по мезотеліну злоякісного новоутворення, способі, що містить призначення індивідууму, що має позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення, ефективної кількості лікарського препарату. У одному із таких варіантів здійснення винаходу спосіб додатково містить призначення індивідууму ефективної кількості принаймні одного додаткового терапевтичного засобу, наприклад, як описано нижче.

У додатковому аспекті винахід являє собою спосіб лікування позитивного по мезотеліну злоякісного новоутворення. У одному із варіантів здійснення винаходу спосіб містить призначення індивідууму, що має таке позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення, ефективної кількості антитіла проти мезотеліну або імунокон'югату. У одному із таких варіантів здійснення винаходу спосіб додатково містить призначення індивідууму ефективної кількості

принаймні одного додаткового терапевтичного засобу, як описано нижче.

Позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення за будь-яким із вищезгаданих варіантів здійснення винаходу можливо, наприклад, позитивним по мезотеліну раком підшлункової (включаючи протокову аденокарциному підшлункової залози), позитивним по мезотеліну раком яєчника (включаючи серозну аденокарциному яєчника), позитивним по мезотеліну раком легені (включаючи недрібноклітинну карциному легені (NSCLC)), мезотеліомою і позитивним по мезотеліну раком ендометрія. У одному із варіантів здійснення винаходу позитивне по мезотеліну злоякісне новоутворення є злоякісною пухлиною, якій привласнюють антимезотеліновий імуногістохімічний (IHC) бал більше "0", який відповідає дуже слабкому фарбуванню або його відсутності у >90 % пухлинних клітин, в умовах, описаних в цьому документі в Прикладі J. У іншому варіанті здійснення винаходу в позитивній по мезотеліну злоякісній пухлині експресується мезотелін на рівні 1+, 2+ або 3+, як визначено в умовах, описаних в цьому документі в Прикладі J. Позитивна по мезотеліну злоякісна пухлина за будь-яким із вищезгаданих варіантів здійснення винаходу може бути позитивною по двох антигенах злоякісною пухлиною.

"Індивідуумом" відповідно до будь-якого вищезгаданого варіанта здійснення винаходу може бути людина.

У додатковому аспекті винахід являє фармацевтичні композиції, що містять будь-які антитіла проти мезотеліну і імунокон'югати, представлені в цьому документі, наприклад, для використання в будь-якому із вищезгаданих терапевтичних способів. У одному із варіантів здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яке із представлених в цьому документі антитіл проти мезотеліну або імунокон'югатів і фармацевтично прийнятний носій. У іншому варіанті здійснення винаходу фармацевтична композиція містить будь-яке із представлених в цьому документі антитіл проти мезотеліну або імунокон'югатів і принаймні один додатковий терапевтичний засіб, наприклад, як описано нижче.

Антитіла або імунокон'югати за винаходом можуть бути використані або окремо, або в комбінації із іншими засобами, що застосовуються в терапії. Наприклад, антитіло або імунокон'югат за винаходом можуть бути спільно призначені принаймні із одним додатковим терапевтичним засобом. У певних варіантах здійснення винаходу додатковим терапевтичним засобом є гемцитабін. У певних варіантах здійснення винаходу додатковим терапевтичним засобом є анти-MUC16 антитіло, кон'юговане із цитотоксичним агентом.

Така комбінована терапія, вказана вище, полягає в комбінованому застосуванні (де два або більше терапевтичних засобів включені в одну і ту ж або окремі композиції) і роздільному застосуванні, при цьому застосування антитіла або імунокон'югату за винаходом може мати місце до, одночасно з і/або після застосування додаткового терапевтичного засобу і/або ад'юванту. Антитіла або імунокон'югати за винаходом можуть також бути використані в комбінації із променевою терапією.

Антитіло або імунокон'югат за винаходом (і будь-який додатковий терапевтичний засіб) можуть бути застосовані будь-яким придатним способом, включаючи парентеральний, внутрішньолегеневий і інтраназальний, і, по мірі необхідності у випадку локального лікування - що вводиться всередину уражених тканин спосіб застосування. Парентеральні інфузії включають внутрішньом'язове, внутрішньовенне, внутрішньоартеріальне, інтраперитоніальне або підшкірне введення. Дозування може здійснюватися будь-яким придатним способом, наприклад, за допомогою ін'єкцій, таких як внутрішньовенні або підшкірні ін'єкції, частково залежно від того, чи є застосування постійним або короточасним. Різні схеми дозування, включаючи, крім іншого, одноразові або багаторазові застосування протягом різних часових періодів, болісне введення і імпульсна інфузія розглянуті в цьому документі.

Антитіла або імунокон'югати за винаходом утворюють лікарську суміш, дозують і призначають способом відповідно до належної медичної практики. Факторами для розгляду в даному контексті включають певне порушення, що підлягає лікуванню, певний ссавець, що підлягає лікуванню, клінічний стан індивідуального пацієнта, причина порушення, місце доставки засобу, спосіб призначення, схема призначення і інші фактори, відомий медичним працівникам. Антитіло або імунокон'югат не обов'язково повинен бути, але в деяких випадках утворить суміш із одним або декількома засобами, в цей час, що використовуються для запобігання або лікуванню порушення, яке досліджується. Ефективна кількість таких інших засобів залежить від

кількості антитіла або імунокон'югату, присутнього в композиції, типу порушення або лікування і інших факторів, обговореної вище. Вони звичайно використовуються в одних і тих же дозах і із застосуванням способів введення, як описано в цьому документі, або в кількості приблизно від 1 до 99 % доз, описаних в цьому документі, або в будь-якій дозі і будь-яким способом, які

емпірично/клінічно визначають для цільового використання.

Для профілактики або лікування захворювання відповідна доза антитіла або імунокон'югату за винаходом (при використанні окремо або в комбінації з одним або декількома іншими додатковими терапевтичними засобами) залежить від типу захворювання, що підлягає лікуванню, типу антитіла або імунокон'югату, тяжкості і протікання захворювання, чи призначають антитіло або імунокон'югат для профілактичних або терапевтичних цілей, попередньої терапії, анамнезу пацієнта і відповіді на антитіло або імунокон'югат, і розсуду лікуючого лікаря. Антитіло або імунокон'югат належним чином призначають пацієнту в один час або протягом курсів лікування. Залежно від типу і тяжкості захворювання приблизно від 1 мкг/кг до 15 мкг/кг (наприклад, 0,1 мкг/кг - 10 мкг/кг) антитіла або імунокон'югату може бути початковою відповідною дозою для призначення пацієнту, або, наприклад, у вигляді одного або декількох окремих застосувань, або у вигляді безперервної інфузії. Одна стандартна щоденна доза може знаходитися в діапазоні приблизно від 1 мкг/кг до 100 мкг/кг або більше, залежно від факторів, згаданих вище. Для повторних застосувань протягом декількох днів або більше тривало залежно від стану пацієнта, лікування як правило підтримують до настання необхідного пригнічення симптомів захворювання. Одна ілюстративна доза антитіла або імунокон'югату знаходиться в діапазоні приблизно від 0,05 мкг/кг до приблизно 10 мкг/кг. Таким чином, одна або декілька доз величиною приблизно 0,5 мкг/кг, 2,0 мкг/кг, 4,0 мкг/кг або 10 мкг/кг (або будь-яка їх комбінація) можуть бути призначені пацієнту. Такі дози можуть бути призначені періодично, наприклад, кожний тиждень або кожні три тижні (наприклад, таким чином, що пацієнт отримує приблизно від двох до приблизно двадцяти, або, наприклад, приблизно шість доз антитіла). Може бути призначена початкова більш висока навантажувальна доза із подальшим призначенням однієї або декількох більш низьких доз. Однак можуть бути придатні інші схеми дозування. Можна без великих зусиль здійснювати моніторинг ефективності цієї терапії стандартними методиками і способами аналізу.

Зрозуміло, що будь-яка із вищезгаданих композицій або будь-який із терапевтичних способів можуть бути здійснені, використовуючи як імунокон'югат за винаходом, так і антитіло проти мезотеліну.

Н. Вироби промислового виробництва

У іншому аспекті винаходу представлений виріб промислового виробництва, що містить матеріали, придатні для лікування, профілактики і/або діагностики порушень, описаних вище. Виріб промислового виробництва містить контейнер і етикетку або вкладиш на контейнері або в одній упаковці із ним. Придатні контейнери включають, наприклад, пляшки, ампули, шприци, мішки для інфузійних розчинів. Контейнери можуть бути зроблені із різного матеріалу, такого як скло або пластик. Контейнер вміщує композицію, яка сама по собі або в комбінації з іншою композицією ефективна для лікування, профілактики і/або діагностики порушення і може мати стерильний доступ через порт (наприклад, контейнером може бути мішок для внутрішньовенного розчину або ампула, що має пробку, що піддається проколюванню голкою для підшкірних ін'єкцій). Принаймні однією активною речовиною в композиції є антитіло або імунокон'югат за винаходом. Етикетка або вкладиш вказують на те, що композиція використовується для лікування вибраного патологічного стану. Більше того виріб промислового виробництва може включати (а) перший контейнер із композицією, що міститься всередині, де композиція містить антитіло або імунокон'югат за винаходом, і (b) другий контейнер із композицією, що міститься всередині, де композиція містить додатковий цитотоксичний або навпаки терапевтичний засіб. Виріб промислового виробництва в цьому варіанті здійснення винаходу може додатково включати вкладиш, вказуючий на те, що композиції можуть бути використані для лікування певного патологічного стану. Альтернативно або додатково, виріб промислового виробництва може додатково включати другий (або третій) контейнер, що містить фармацевтично прийнятний буфер, такий як бактеріостатична вода для ін'єкцій (BWFI), фосфатно-сольовий буферний розчин, розчин Рінгера або розчин декстрази. Воно може додатково включати інші матеріали, необхідні з комерційної і споживчої точки зору, включаючи інші буфери, розчинники, фільтри, голки і шприци.

І. Депонування біологічного матеріалу

Наведений нижче біологічний матеріал був відданий на зберігання в Американську колекцію типових культур, 10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110-2209, USA (ATCC):

Позначення гібридоми

№ ATCC

Дата реєстрації

MPF:3542 (19C3.1.2)

PTA-11464

9 листопада 2010 р.

Віддана на зберігання гібридома, згадана вище, продукує антитіло 19C3, на яку посилаються в цьому документі.

Це депонування було зроблене відповідно до положень Будапештського договору про міжнародне визнання депонування мікроорганізмів для цілей патентної процедури і його нормативним документам (Будапештського договору). Це гарантує підтримку життєздатної культури депонованого зразка протягом 30 років із моменту дати депонування і принаймні п'яти (5) років після самого останнього звертання за наданням депонованого зразка. Цей депонований зразок стане доступним в ATCC згідно з умовами Будапештського договору і предметом угоди між між Genentech, Inc. і ATCC, яке гарантує, що всі обмеження, накладені депозитором, на доступність депонованого матеріалу необмеженому колу осіб будуть остаточно зняті після видачі відповідного патенту США, гарантує постійну і необмежену доступність потомства клітинної культури необмеженому колу осіб після видачі відповідного патенту США або після публікації будь-якої патентної заявки США або іншої країни, залежно від того, що станеться раніше, і гарантує доступність потомства клітинної культури особі, визначеній комісаром США по патентах і торгових знаках, для діставання прав на нього відповідно до 35 U.S.C § 122 і правилами для комісарів згідно з ним (включаючи 37 CFR § 1.14 з конкретним посиланням на 886 OG 638).

III. Приклади

Нижче представлені приклади способів і композицій за винаходом. Відомо, що різні інші варіанти здійснення винаходу можуть бути використані на практиці, беручи до уваги загальний опис, наведений вище.

A. Експресія гена мезотеліну людини

Експресія гена мезотеліну людини була проаналізована, використовуючи відповідну базу даних, що містить інформацію про експресію генів (GeneExpress®, Gene Logic inc., Gaithersburg, MD). Графічний аналіз бази даних GeneExpress® був виконаний, використовуючи пристрій візуалізації профілю мікроматриці. Фігура 2 є графічним представленням даних по експресії гена мезотеліну людини в різних тканинах, які перераховані зліва. Шкала у верхній частині графіка означає рівні експресії гена на основі інтенсивності сигналу гібридизації. Точки з'являються як вище, так і нижче за лінію, прилеглу до кожної перерахованої тканини. Точки, що з'являються вище за лінію, представляють експресію гена в нормальній тканині, і точки, що з'являються нижче лінії, представляють експресію гена в пухлині і ураженій тканині. Фігура 2 демонструє підвищену експресію гена мезотеліну в певній пухлині або уражених тканинах відносно відповідних для них норм. Зокрема, мезотелін демонструє значну підвищену експресію в пухлинах яєчника, підшлункової залози, ендометрія і легені, включаючи аденокарциному і мезотеліому. Експресія мезотеліну людини практично відсутня в нормальних тканинах, за винятком нормального мезотелію (очеревини, перикарда і плеври).

B. Синтез антитіла

Моноклональні антитіла проти мезотеліну людини були отримані, використовуючи наступні методики. Або MPF:мезотелін людини (амінокислоти 34-580 SEQ ID NO:42), або мезотелін людини (SEQ ID NO:43, відповідна амінокислотам 296-580 SEQ ID NO:42), кожний приєднаний до N-кінцевому unizyme His (HQ)-tag, був експресований в E.coli 58F3 і очищений на колонці Ni-NTA (Qiagen) з подальшою гель-фільтрацією на колонці Superdex 200 в 20 mM MES pH 6,0, 6M GdnHCl, як описано раніше (Kirchhofer et al., 2003) і подальшим діалізом в 1 mM HCl для зберігання при -80C.

П'ять мишей Balb/c (Charles River Laboratories, Hollister, CA) були гіперімунізовані шість разів 2 мкг суміші двох антигенів в ад'юванті Ribi (Ribi Immunochem Research, Inc., Hamilton, MO). Дві самі кращі миші були відібрані на основі високих титрів антитіл за допомогою прямого ELISA, і їх В-клітини були пуловані і злиті з мишачими мієломними клітинами. (X63.Ag8.653; Американська колекція типових культур, Manassas, VA), використовуючи модифікований протокол, аналогічний раніше описаному (Koehler and Milstein, 1975; Hongo et al., 1995). Через 10-12 днів були зібрані супернатанти від гібридом і проведений скринінг на предмет зв'язування з обома антигенами (окремо), використовуючи прямий ELISA. Для перевірки пізнавання правильно укладеного, глікозилизованого, який експресується на клітинній поверхні мезотеліну, позитивні в ELISA супернатанти були додатково піддані скринінгу способом FACS на трансфікованих gD-мезотеліном клітинах SVT2 (gD являє собою N-кінцеву епітопну мітку, що використовується як позитивний контроль з анти-gD антитілами). Позитивні гібридами були субклоновані двічі способом граничного розведення, і одинадцять були розмножити, і антитіла були очищені способом хроматографії з протеїном A.

На фігурі 3 представлені виділені моноклональні антитіла нарівні з певними властивостями, описаними більш детально нижче.

С. Гуманізація 7D9 і 22A10

Моноклональні антитіла 7D9 і 22A10 були гуманізовані, як описано нижче. Нумерація амінокислотних залишків відповідала Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

1. Гуманізація 7D9

а) Клонування варіабельних доменів мишачого 7D9

Сумарна РНК була виділена із клітин гібридами, які продукують мишаче 7D9, використовуючи стандартні способи. Варіабельні легкі (VL) і варіабельні важкі (VH) домени були ампліфіковані, використовуючи 3Т-ПЛП із вирожденими праймерами до важкого і легкого ланцюгів. Прямі праймери були специфічні для N-кінцевої амінокислотної послідовності ділянок VL і VH. Відповідно, зворотні праймери LC і HC були сконструйовані для відпалу із ділянкою в константному легкому (CL) і константному важкому домені 1 (CH1), які високо консервативні серед видів. Полінуклеотидна послідовність вставок була визначена, використовуючи звичайні способи секвенування. Амінокислотні послідовності 7D9 VL і VH показані на фігурах 4 і 5, відповідно.

б) Прямі пересадки гіперваріабельної ділянки в акцепторну, консенсусну каркасну ділянку людини

Варіанти, сконструйовані при гуманізації 7D9, були проаналізовані у вигляді IgG. Домени VL і VH із мишачого 7D9 були суміщені із консенсусними послідовностями VL каппа І людини (VL_{KI}) людини і підгрупи III VH (VH_{III}) людини. Гіперваріабельні ділянки із мишачого 7D9 (mu7D9) антитіла були вставлені в акцепторні каркасні ділянки VL_{KI} і VH_{ATA} з утворенням 7D9.v1. Акцепторний VH каркасна ділянка VH_{ATA} відрізняється від VH_{III} по 3 позиціях: R71A, N73T і L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Із домену mu7D9 VL в VL_{KI} були пересаджені позиції 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3). Із домену mu7D9 VH були пересаджені в VH_{ATA} позиції 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 95-102 (H3) (Фігури 1 і 2). Ці визначення CDR включали позиції, що визначаються гіперваріабельністю їх послідовності (Wu, T.T. & Kabat E.A. (1970), їх структурним розташуванням (Clothia, C. & Lesk, і їх залученням у взаємодію антигену-антитіла (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996))).

7D9.v1 прямого пересаджування був отриманий шляхом мутагенезу по Кункелю, використовуючи окремий олігонуклеотид для кожної гіперваріабельної області. Три фосфорилованих олігонуклеотиди або для важкого ланцюга, або для легкого ланцюга були додані до 571 нг матриці Kunkel в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ в кінцевому об'ємі 40 мкл. Суміш випалювали при 90 °C протягом 2 хв., 50 °C протягом 5 хв. і потім охолоджували на льоду. До 10 мкл випаленої матриці були додані 0,5 мкл 100 mM АТФ, 0,5 мкл 25 mM дНТФ (25 mM кожний із дАТФ, дЦТФ, дГТФ і дТТФ), 1 мкл 100 mM ДТТ, 1 мкл 10X ТМ буфера (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 80 Од. лігази T4 і 4 Од. T7-полімерази із утворенням кінцевого об'єму, який дорівнює 13,6 мкл, із інкубацією протягом 2 годин при кімнатній температурі. 10 мкл лігваного продукту було потім трансформовано в XL1-сині клітини (Sratagene). Придатні клони були ідентифіковані секвенуванням ДНК і експресовані у вигляді IgG.

с) Оцінка варіантів

Варіанти 7D9 були експресовані у вигляді IgG шляхом тимчасової трансфекції CHO. IgG був очищений шляхом афінної хроматографії із протеїном G. Афінність кожного варіанта 7D9 IgG для мезотеліну людини була визначена способом поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи BIAcore™-2000. На чипах BIAcore дослідницького класу CM5 були іммобілізовані приблизно 110 RU рекомбінантного мезотеліну людини, отриманого із E. coli, використовуючи набір реактивів BIAcore для з'єднання амінів. Серійні 2-кратні розведення кожного варіанта 7D9 (від 0,488 до 1000 nM в PBS, що містить 0,05 % Tween-20) було ін'єктовано із швидкістю потоку 30 мкл/хв. Кожний зразок був проаналізований із 5-хвилинною асоціацією і 3,5-хвилинною дисоціацією. Після кожної ін'єкції чип був відновлений, використовуючи 10 mM гліцин pH 1,7. Відповідь зв'язування була відкоректована шляхом віднімання RU із проточної кювети з використанням, яке не стосується даного специфічного зв'язування IgG, іммобілізованого з аналогічною щільністю. Модель Ленгмюра 1:1 одночасної обробки k_{on} і k_{off} була використана для кінетичного аналізу.

д) Результати

Людська акцепторна каркасна ділянка, яка використовується для гуманізації 7D9, основана на VL каппа людини І консенсусному (VL_{KI}) і акцепторному VH каркасної ділянки VH_{ATA}, яка відрізняється від консенсусного VH людини підгрупи III (VH_{III}) по 3 позиціях: R71A, N73T і L78A (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:4285 (1992)). Домени VL і VH мишачого 7D9 були

суміщені із доменами VL_{KI} і VH_{III} людини; гіперваріабельні ділянки були ідентифіковані і пересаджені в акцепторну каркасну ділянку людини із утворенням 7D9.v1 (Фігури 4 і 5). Як IgG, афінність 7D9.v1 падала в ~2 рази відносно mu7D9 (відформатованого як химерне 7D9), що було визначено способом Biacore (фігура 6).

5 Для поліпшення афінності зв'язування 7D9.v1 позиції 36 і 87 в легкому ланцюгу і позиції 48, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 78 і 80 у важкому ланцюгу були замінені залишками, виявленими в цих позиціях в mu7D9. Комбінації цих змінених легких і важких ланцюгів з ланцюгами із 7D9.v1 були трансфіковані в CHO, експресовані у вигляді IgG і очищені, і оцінені на предмет зв'язування з мезотеліном людини способом Biacore (фігура 6).

10 Варіанти 7D9.v2 і 7D9.v3, кожний із яких містить змінений легкий ланцюг, мають афінність, порівнянну із химерним 7D9. Варіант 7D9.v3 відрізняє від 7D9.v1 по 2 позиціях в легкому ланцюгу. Ніякої зміни окремо не було достатньо для поліпшення зв'язування, порівнянного з таким mu7D9 (фігура 6).

15 Висновки по змінах для гуманізованого 7D9.v3: 6 мишачих 7D9 CDR (визначені як позиції 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 93-102 (H3)) були пересаджені в консенсусні акцепторні домени VL_{KI} і VH_{ATA} людини. Два додаткових амінокислотних залишки каркасної ділянки, 36 і 87 легких ланцюгів, були замінені назад на мишачі амінокислотні залишки, приводячи до утворення 7D9.v3 із зіставною афінністю mu7D9.

2. Гуманізація 22A10

20 а) Клонування варіабельних доменів мишачого 22A10

Сумарна РНК була виділена із клітин гібридами, продукуючих мишаче 22A10, використовуючи стандартні способи. Варіабельні легкі (VL) і варіабельні важкі (VH) домени були ампліфіковані, використовуючи ЗТ-ПЛР із виродженими праймерами до важкого ланцюга (HC) і легкого ланцюга (LC). Прямі праймери були специфічні для N-кінцевої амінокислотної послідовності ділянок VL і VH. Відповідно, зворотні праймери LC і HC були сконструйовані для відпалу із ділянкою в константному легкому (CL) і константному важкому домені 1 (CH1), які високо консервативні серед видів. Полінуклеотидна послідовність вставок була визначена, використовуючи звичайні способи секвенування. Амінокислотні послідовності 22A10 VL і VH показані на фігурах 7 і 8, відповідно.

30 б) Прямі пересадки гіперваріабельної ділянки в акцепторну, консенсусну каркасну ділянку людини

Варіанти, сконструйовані при гуманізації 22A10, були проаналізовані у вигляді IgG і відображені моновалентно у вигляді Fab на фазі. Фагіміда, яка використовується для даної роботи, була моновалентним дисплейним вектором Fab-g3, який складається із двох відкритих рамок зчитування під контролем одного промотору rhoA. Перша відкрита рамка зчитування складається із сигнальної послідовності stII, з'єднаної із доменами VL і CH1 акцепторного легкого ланцюга, і друга складається із сигнальної послідовності stII, з'єднаної із доменами VL і CH1 акцепторного важкого ланцюга, за якими слідує мінорний фаговий білок оболонки P3.

40 Домени VL і VH із мишачого 22A10 були суміщені із консенсусними послідовностями VL каппа I людини (VL_{KI}) людини і підгрупи III VH (VH_{III}) людини. Гіперваріабельні ділянки із мишачого 22A10 (mu22A10) антитіла були вставлені в акцепторні каркасні ділянки VL_{KI} і VH_{III} з утворенням 22A10 трансплантата. Із домену VL mu22A10 в VL_{KI} були пересаджені позиції 24-34 (L1), 50-56 (L2) і 89-97 (L3). Із домену VH mu22A10 були пересаджені в VH_{III} позиції 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 95-102 (H3) (Фігури 7 і 8). Ці визначення CDR включали позиції, що визначаються гіперваріабельністю їх послідовності (Wu, T.T. & Kabat E.A. (1970), їх структурним розташуванням (Clothia, C. & Lesk, і їх залученням у взаємодію антигена-антитіла (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996))).

22A10 трансплантат був отриманий шляхом мутагенезу за Кункелем, використовуючи окремий олігонуклеотид для кожної гіперваріабельної області. Три фосфориловані олігонуклеотиди або для важкого ланцюга, або для легкого ланцюга були додані до 571 нг матриці Kunkel в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ в кінцевому об'ємі 40 мкл. Суміш випалювали при 90 °C протягом 2 хв., 50 °C протягом 5 хв. і потім охолоджували на льоду. До 10 мкл випаленої матриці були додані 0,5 мкл 100 mM АТФ, 0,5 мкл 25 mM дНТФ (25 mM кожний із дАТФ, дЦТФ, дГТФ і дТТФ), 1 мкл 100 mM ДТТ, 1 мкл 10X ТМ буфери (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 80 Од. лігази T4 і 4 Од. T7-полімерази з утворенням кінцевого об'єму, який дорівнює 13,6 мкл, із інкубацією протягом 2 годин при кімнатній температурі. 10 мкл лігованого продукту було потім трансформовано в XL1-сині клітини (Stratagene). Придатні клони були ідентифіковані секвенуванням ДНК і експресовані у вигляді IgG.

с) Помірна рандомізація гіперваріабельних ділянок

Дозрівання афінності трансплантата 22A10 здійснювали, використовуючи стратегію помірної рандомізації. Варіабельність послідовності була внесена окремо в кожну гіперваріабельну ділянку таким чином, що перевагу на користь мишачої послідовності гіперваріабельної ділянки підтримували, використовуючи стратегію олігонуклеотидного синтезу із пошкодженнями (Gallor et al., J Med Chem 37:1233-51 (1994)). Для кожної диверсифікованої позиції кодон, що кодує амінокислоту дикого типу, ушкоджується сумішшю 70-10-10-10 нуклеотидів, приводячи в середньому до 50 процентів мутацій в кожній позиції. Варіабельність послідовності була внесена в гіперваріабельні ділянки 22A10-трансплантат, використовуючи мутагенез Кункеля з утворенням шести в легкому ступені рандомізованих фагових бібліотек, які були відсортовані окремо. Було зроблено шість бібліотек, кожна із яких містила одну рандомізовану в легкому ступені гіперваріабельну ділянку.

d) Отримання фагових бібліотек

Олігонуклеотиди, сконструйовані для забезпечення різноманітності кожній гіперваріабельній ділянці, були фосфориловані окремо в 20 мкл реакційній суміші, що містить 660 нг олігонуклеотиду, 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂, 1 mM АТФ, 20 mM ДТТ і 5 Од. поліонуклеотидкінази, протягом 1 години при 37 °C.

Для кожної бібліотеки, 2 мкл фосфорилизованого олігонуклеотиду було додано до 300 нг матриці Кункеля в 50 mM Tris pH 7,5, 10 mM MgCl₂ в кінцевому об'ємі 10 мкл. Відпал суміші проводили при 90 °C протягом 2 хв., 50 °C протягом 5 хв. із подальшим охолодженням на льоду. До матриці після відпалу додавали 0,5 мкл 10 mM АТФ, 0,5 мкл 10 mM дНТФ (10 mM дАТФ, дЦТФ, дГТФ і дТТФ кожний), 1 мкл 100 mM ДТТ, 1 мкл 10x ТМ-буфера (0,5 M Tris pH 7,5, 0,1 M MgCl₂), 80 Од. Т4-лігази і 4 Од. Т7-полімерази в кінцевому об'ємі 20 мкл протягом 2 годин при кімнатній температурі. Потім кожним лігованим продуктом були трансформовані XL1-блакитні клітини, що культивуються в 0,5 мл 2YT, що містить 5 мкг/мл тетрацикліну і M13/K07 хелперний фаг (MOI 10), протягом 2 годин при 37 °C і потім пуловані і перенесені в 500 мл 2YT, що містить 50 мкг/мл карбенациліну і культивовані 16 годин при 37 °C.

e) Селекція фагів

Для твердофазної селекції фагів 293 мезотеліну людського походження або із яванської макаки було іммобілізовано в 50 mM бікарбонату натрію pH 9,6 на планшетах для мікротитрування MaxiSorp (Nunc, Rochester, NY) за ніч при 4 °C. Планшети були блоковані принаймні 1 годину, використовуючи казеїновий інгібітор Casein Blocker (Pierce, Rockford, IL).

Фаги були зібрані із клітинного супернатанта і суспендовані в PBS, що містить 5 % порошок молока і 0,05 % Tween-20 (PBSBT). Після додавання фагової бібліотеки і 1-годинної інкубації ямки планшета для мікротитрування були ретельно промиті PBS, що містить 0,05 % Tween-20 (PBST) і зв'язані фаги були елюйовані шляхом інкубації ямок в 20 mM HCl, 500 mM KCl протягом 30 хвилин. Елюйовані фаги були нейтралізовані 1M Tris, pH 8 і розмножені, використовуючи XL1-блакитні клітини і M13/K07 хелперні фаги, і культивовані протягом ночі при 37 °C в 2YT, 50 мкг/мл карбенциліну. Титри фагу, елюйованого із мішеневмісної ямки, були порівняні із титрами фагу, витягнутого із ямки, яка не містить мішень, для оцінки збагачення.

Для селекції фагів 293 в рідкій фазі біотинільований мезотелін людського походження або із яванської макаки був доданий до фагів, суспендованим в PBS, що містить 5 % порошок молока і 0,05 % Tween-20 (PBSBT). Після інкубації фаг, зв'язаний із біотинільованим мезотеліном, фіксувався на планшеті для мікротитрування, покритій стрептавідином, протягом 5 хвилин. Ямки планшета для мікротитрування були ретельно промиті PBS, що містить 0,05 % Tween-20 (PBST), і фаги, які зв'язалися, були елюйовані шляхом інкубації ямок в 20 mM HCl, 500 mM KCl протягом 30 хвилин. Елюйовані фаги були нейтралізовані 1M Tris, pH 8, і розмножені, використовуючи XL1-блакитні клітини і M13/K07 хелперні фаги, і культивовані протягом ночі при 37 °C в 2YT, 50 мкг/мл карбенциліну. Титри фагу, елюйованого із мішеневмісної ямки, були порівняні із титрами фагу, витягнутого із ямки, яка не містить мішень, для оцінки збагачення.

Для селекції фагів в рідкій фазі точність селекції була поетапно підвищена як шляхом захоплення фагу, який зв'язувався із концентраціями біотинільованого мезотеліну, які знижуються, в розчині з подальшим захопленням нейтравідином протягом 10 хвилин (селекція по швидкості асоціації), так і шляхом збільшення часу промивання і температури, зумовлюючи дисоціацію фагу, що слабо зв'язався (селекція по швидкості дисоціації) (Fuh et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)).

f) Виробництво IgG

З метою скринінгу варіанти IgG спочатку були продуковані в клітинах 293. Векторами, що кодують VL і VH (25 мкг), були трансфіковані клітини 293, використовуючи систему FUGENE (Roche, Basel, Switzerland). 500 мкл FuGene змішували із 4,5 мл середовища DMEM, яка не містить FBS, і інкубували при кімнатній температурі протягом 5 хвилин. Кожний ланцюг (25 мкг)

додавали до цієї суміші і інкубували при кімнатній температурі протягом 20 хвилин і потім переносили в п'ять флаконів T-150 для трансфекції протягом ночі при 37 °C в 5 % CO₂. На наступний день, середовища, що містять суміш для трансфекції, видаляли і замінювали на 23 мл середовища PS04, що містить 0,1 мл/л мікроелементів (A0934) і 10 мг/л інсуліну (A0940).

5 Клітини інкубували протягом додаткових 5 днів, після чого середовище відбирали при 1000 об./хв. протягом 5 хвилин і фільтрували в стерильних умовах, використовуючи 0,22 мкм фільтр із низьким зв'язуванням білка. Зразки могли зберігатися при 4 °C після додавання 2,5 мл 0,1 % PMSF на кожні 125 мл середовища. IgG очищали афінною хроматографією з протеїном G.

g) Визначення афінності

10 Афінність варіантів 22A10 IgG для мезотеліну людини або яванської макаки була визначена способом поверхневого плазмонного резонансу, використовуючи BIAcore™-2000. На чипах Віасоге дослідницького класу CM5 були іммобілізовані приблизно 110 RU отриманого із E. coli рекомбінантного мезотеліну людини або яванської макаки, використовуючи набір реактивів Віасоге для з'єднання амінів. Серійне 2-кратне розведення кожного варіанта 22A10 (від 0,488 до

15 1000 нМ в PBS, що містить 0,05 % Tween-20) були ін'єктовані із швидкістю потоку 30 мкл/хв. Кожний зразок був проаналізований з 5-хвилинною асоціацією і 3,5-хвилинною дисоціацією. Після кожної ін'єкції чип був відновлений, використовуючи 10 мМ гліцин pH 1,7. Відповідь зв'язування була відкоректована шляхом віднімання RU із проточної кювети з використанням IgG, що не стосується до даного специфічного зв'язування, іммобілізованого із аналогічною щільністю. Модель Ленгмюра 1:1 одночасної обробки k_{on} і k_{off} була використана для кінетичного аналізу.

h) Результати

У основі акцепторної каркасної ділянки людини, яка використовується для гуманізації 22A10, лежав консенсусний домен VL каппа I людини і консенсусний домен VH підгрупи III людини.

25 Домени VL і VH му22A10 були суміщені із доменами каппа I людини і підгрупи III; кожна область, що визначає компліментарність (CDR), була ідентифікована і пересаджена в акцепторну каркасну ділянку людини з утворенням CDR-трансплантата, яка могла бути експресована у вигляді IgG або представлена як Fab на фазі (Фігури 7 і 8).

Були отримані шість бібліотек із рандомізацією в незначному ступені, в яких варіабельність була внесена окремо в кожен CDR трансплантата 22A10 CDR. Бібліотеки були відсортовані по взаємодії із мезотеліном людини і яванської макаки (отримані із клітин 293, з метою поліпшення зв'язування з глікозилованими формами мезотеліну яванської макаки або людини), використовуючи методичні підходи сортування в твердій фазі і в розчині. Спосіб сортування в розчині дозволяє відібрати високо афінні клони за допомогою маніпуляції концентрацією біотинільованої мішені і часом захоплення фагу, в той час як додавання неміченої мішені може бути використано для елімінації клонів із більш швидкими швидкостями дисоціації (Fuh et al., J. Mol. Biol. 340:1073-1093 (2004)). Клоні із останнього раунду для кожної бібліотеки були відібрані для аналізу послідовності ДНК, і були виявлені зміни послідовності, заплановані для кожної CDR, за винятком CDR-L2 і CDR-H2, передбачаючи багато можливих варіацій для поліпшення зв'язування антигену. Декілька клонів, вибраних або по мезотеліну людини, або мезотеліну яванської макаки, мали зміни в CDR-H3, при цьому найбільш високо представлені мали заміну тирозину на ізолейцин в позиції 99. Цей варіант, нарівні із деякими іншими, експресувався у вигляді IgG і був охарактеризований на предмет зв'язування із мезотеліном способом Віасоге і аналізом Скетчарда (фігура 9A). У декількох клонів афінність перевищувала таку трансплантата 22A10.

Гуманізовані варіанти 22A10 були використані для імунопреципітації мезотеліну із клітинної лінії, стабільно експресуючої мезотелін. Клітини BJAB, стабільно експресуючі gD-мічений мезотелін різних видів, були імунопреципітовані гуманізованими варіантами 22A10, як показано на фігурі 9B (Gr, трансплантат; v1 (1), v17 (17) і v83 (83)) або h7D9.v3, h5B6 анти-gD або негативний контроль hIgG для порівняння. Імунопреципітати були промиті і проаналізовані Вестерн-блотингом із використанням мишачих анти-gD антитіл для визначення gD-мезотеліну. h2210.v83 було найкращим із варіантів h22A10 по його здатності викликати імунопреципітацію всіх трьох видів мезотеліну (яванської макаки, верхній блот; людини, середнього блот; і щурячого, нижній блот). У самій правій ямці показано 20 % нанесеного лізату (без імунопреципітації) для порівняння рівнів загальної експресії. Маркери молекулярної ваги (кДа) вказані зліва.

Висновки по змінах для гуманізованого 22A10.v83: Починаючи з пересадки шести мишачих 22A10 CDR (визначено як позиції 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) і 95-102 (H3)) в консенсусну VL людину каппа I і VH підгрупи III, була використана рандомізація CDR легкого ступеня для ідентифікації зміни в CDR H3 (Y99I), що поліпшувало зв'язування із

мезотеліном людини і яванської макаки. У 22A10.v83 виявлена висока афінність зв'язування і також здатність дізнаватися більше сайтів зв'язування відносно інших гуманізованих варіантів.

У даній заявці мишачі моноклональні антитіла 7D9 і 22A10 альтернативно називають 7D9, m7D9 або mu7D9; і 22A10, m22A10 або mu22A10, відповідно. Гуманізовані моноклональні антитіла 7D9.v3 і 22A10.v83 альтернативно називають 7D9.v3, h7D9.v3 або hu7D9.v3; і 22A10.v83, h22A10.v83 або hu22A10.v83, відповідно, якщо не вказане інше.

D. Видова перехресна реактивність

Моноклональні антитіла були протестовані з метою визначення можливої перехресної реактивності з мезотеліном із інших видів, відмінних від людини. На фігурі 11 показані гомологія послідовності між мезотеліном людини (SEQ ID NO:43), яванської макаки (SEQ ID NO:46), щури (SEQ ID NO:47) і миші (SEQ ID NO:48). Затемнені залишки ідентичні принаймні між двома видами. Незатемнені залишки відрізняються принаймні між двома із чотирьох видів. На фігурі 12 показані результати аналізу FACS клітин 293, стабільно трансфікованих міченим по епітопу gD мезотеліном (мезотеліном людини, яванської макаки, щури або миші); забарвлених 10 мкг/мл h7D9.v3, h22A10.v83 або анти-gD h5B6; і що виявляються анти-людським антитілом Alexa 647. Нетрансфіковані клітини 293 не експресували нормально мезотелін ("WT"). h7D9.v3 є специфічним для мезотеліну людини, в той час як h22A10.v83 зв'язується з мезотеліном людини, яванської макаки і щура, але не з мезотеліном миші. Фарбування анти-gD підтверджувало, що мишачий мезотелін дійсно експресується.

E. Афінності антитіл

Для визначення відносних афінностей зв'язування h7D9.v3 і h22A10.v83 був виконаний аналіз Скетчарда, слідуючи стандартній методиці (Holmes et al., Science 256:1205-1210 (1992)), коротко шляхом інкубації неприкріплених клітин міченими [¹²⁵I] антитілами h7D9.v3 або h22A10.v83 протягом 2 годин при кімнатній температурі в присутності збільшуваних концентрацій неміченого антитіла, промивання і кількісного визначення зв'язаної з клітинами радіоактивності, вимірюючи активність сцинтиляційним способом. Дані були проаналізовані апроксимацією нелінійної кривої пересіку в програмі New Ligand (Genetech, Inc., South San Francisco, CA) для визначення значень Kd (Munson et al., Anal. Biochem., 107:220-239 (1980)).

Як показано на фігурі 13, h7D9.v3 зв'язувало gD-мічений мезотелін людини, експресований в стабільно трансфікованих клітинних лініях 293, BJAB і HT1080 (всі з яких не експресують ендогенний мезотелін), з афінністю 0,2, 0,25 і 0,97 нМ, відповідно. Ці значення Kd охоплювали діапазон, виявлений для ендогенного мезотеліну в чотирьох клітинних лініях підшлункової залози і двох клітинних лініях яєчника (0,41-1 нМ). Значення афінностей h22A10.v83 для мезотеліну людини, експресованого в тих же самих стабільних клітинних лініях, становили 2,7, 1,8 і 6,2 нМ, відповідно, згідно їх афінностей для ендогенного мезотеліну людини (~9-10 нМ). h22A10.v83 зв'язувало щурячий мезотелін, експресований в стабільно трансфікованих клітинах 293 і клітинах BJAB, із афінностями 7,3 нМ і 2,7 нМ, відповідно, що узгоджується з Kd, яка дорівнює 6,2 нМ, що спостерігається для ендогенного щурячого мезотеліну із нормальної плевральної клітинної лінії, 4/4-RM (Aronson et al., InVitro 17:61-70 (1981)).

F. Групи епітопів

Щоб визначити, чи розділяють ті ж самі епітопи 7D9 і 22A10, як і інші антитіла проти мезотеліну, перераховані на фігурі 3, картування епітопів моноклональних антитіла було виконано стандартним перехресним конкурентним ELISA. Дев'яностошести-ямкові планшети Nunc Immunosorp (Nalge Nunc, USA) були покриті протягом ночі при 4 °C 100 мкл 1 мкг/мл позаклітинним доменом мезотеліну людини в буфері для іммобілізації (50 мМ карбонат натрію, pH 9,5). Всі подальші етапи були виконані при кімнатній температурі. Після промивання три рази в 200 мкл промивального буфера (PBS, що містить 0,05 % Tween-20, pH 7,4) планшета були блоковані буфером ELISA (PBS, що містить 0,5 % бичачий сироватковий альбумін (BSA) і 0,05 % Tween-20, pH 7,4) протягом 60 хвилин. Мишачі моноклональні антитіла 7D9 і 22A10 були потім додані в концентрації 20 мкг/мл в буфері ELISA протягом 2 годин (100 мкл на ямку). Без промивання були також додані біотинільовані варіанти всіх тестованих антитіл проти мезотеліну (100 мкл 2 мкг/мкл) до кінцевої концентрації 1 мкг/мл протягом 30 хвилин. Після відмивання три рази в 200 мкл промивального буфера, зв'язування будь-якого біотинільованого антитіла було виявлене шляхом додавання стрептавідину-пероксидази хрому (HPR) (Zymed; Carlsbad, CA) в розведенні 1:5000 протягом 30 хвилин. Після трьох промивань, як вказано вище, 100 мкл хромогенного субстрату 3,3', 5,5'-тетраметилбензидину (TMB) було додано (BioFX Laboratories; Owings Mills, MD) протягом 5 хвилин. Хромогенна реакція була зупинена шляхом додавання 100 мкл стоп-реагенту (BioFX Laboratories), і показник поглинання був реєстрований при 620 нм на приладі Ultramicroplate Reader (Biotek Instruments; Winooski, VT). Максимальна ступінь

можливого зв'язування кожного із біотинільованих антитіл була визначена паралельно шляхом їх інкубації із мезотеліном за відсутності небіотинільованих антитіл 7D9 і 22A10.

Результати представлені на фігурі 14. Сигнал будь-якого із дев'яти біотинільованих антитіл проти мезотеліну (*) вказує на відсутність конкуренції за перше антитіло (максимальне зв'язування кожним біотинільованим антитілом за відсутності першого антитіла для порівняння також показано в правій групі). 7D9 (яке називається 7D9.5.2 на фігурі 14) є єдиним антитілом, яке не може зв'язатися, коли 7D9 присутній (тобто, воно конкурує само з собою, другий стовпець зліва), в той час як 22A10 (яке називається 22A10.1.2 на фігурі 14) зв'язується стандартно (чорний стовпець в лівій групі). У свою чергу, коли 22A10 заздалегідь зв'язаний, 22A10 не може зв'язатися (останній стовпець середньої групи), в той час як 7D9 і інші антитіла можуть. Таким чином, не тільки 7D9 і 22A10 не конкурують один з одним, але також кожний зв'язує епітоп, відмінний від інших семи антитіл. 7D9 конкурував сам із собою, але не із будь-яким іншим антитілом (порівняй кожний стовпець із максимальним сигналом для кожного антитіла, зв'язуючого мезотелін на планшеті за відсутності ELISA покритого антитілом 7D9 або 22A10). Подібним чином, 22A10 тільки конкурувало само з собою і не із іншими антитілами, включаючи 7D9. Таким чином, 7D9 і 22A10 мають різні епітопи відносно один одного і інших виділених моноклональних антитіл.

G. Картування епітопів, використовуючи химери мезотеліну людина:миша і яванська макака:людина, і мутаційний аналіз

Були виконані експерименти по пептидному картуванню трипсином, в яких h7D9.v3 було зв'язано з іммобілізованим мезотеліном людини, який потім інкубували з трипсином, і захищені антитілом пептиди, що залишилися були елюйовані і ідентифіковані мас-спектрометрією. Ці експерименти залучали амінокислоти 133-183 SEQ ID NO:43 як сайту зв'язування h7D9.v3. Для підтвердження цієї ділянки, ми скористалися 7D9, реагуючим із людським (конструкт #387, показаний на фігурі 15), але не з мишачим (конструкт #385) або яванської макаки (конструкт #383) мезотеліном, щоб отримати химеру, яка за нашими припущеннями повинна укладатися краще укорочених мутантів. Ми сконструювали химеру мезотеліну людина:миша (#398 і #399), використовуючи сайт Mfel, що мовчить (який кодує QL), в позиції амінокислоти 131 і сайт BgIII, що мовчить (який кодує DL), в позиції амінокислоти 213 для вбудування послідовностей людини в мишачий конструкт. Крім того, був створений конструкт яванської макаки (#400), в якому амінокислоти 131-178 були замінені такими мезотеліну людини за допомогою сайтів Mfel. Кожний конструкт мав N-кінцеву gD-мітку (не показано) для перевірки експресії.

gD-мічені, GPI-заякорені конструкти мезотеліну, показані на фігурі 15, були тимчасово експресовані в клітинах 293 і забарвлені 0,02 мкг/мл мишачим 7D9, 1 мкг/мл мишачим 22A10 або 1 мкг/мл антитілом проти gD-мітки (для нормування диференціальних рівнів експресії). Після детекції антимишачим антитілом Alexa 488, зразки були промиті і проаналізовані FACS, і дана інтенсивність флуоресценції була нормована на сигнал анти-gD після віднімання будь-якого фонового фарбування на клітинах 293 дикого типу, що служать як негативний контроль. Як показано на фігурі 16, 7D9 зв'язується з химерою #399 людина:миша (що має амінокислоти людини 1-213), але ні з повнорозмірним мишачим мезотеліном #385, ні з #398 (що має амінокислоти людини тільки з 1 по 131), вказуючи на те, що 7D9 зв'язує епітоп між 131 і 213. Його здатність зв'язувати химеру 400 яванська макака:людина (що має амінокислоти людини 131-178), але не повнорозмірну яванської макаки (#383), звузила межі епітопу між амінокислотами 131 і 178. (Відмітно, що відносно більш низький % зв'язування видний за участю 7D9, ніж 22A10, внаслідок використання в 50 разів більш низької концентрації антитіла для 7D9).

Та ж сама химера була використана для картування щурячого, яванської макаки і людського (але не мишачого) реактивного епітопу 22A10. Зв'язування спостерігали на клітинах, експресуючих химеру #399, але не #398. Таким чином, 22A10 зв'язується з епітопом з амінокислотним залишком, який має ключове значення, між амінокислотами 131-213 (фігура 16).

Оскільки 7D9 і 22A10 не конкурують один з одним (фігура 13), вони імовірно зв'язують різні епітопи в межах амінокислот 131-213. Для ідентифікації цих різних епітопів 2-4 амінокислотних ділянки мезотеліну людини були мутовані з утворенням відповідних мишачих амінокислот в фоновій області химери #399. Поєднання амінокислот 132-212 серед чотирьох видів показано на фігурі 17 із пронумерованими прямокутниками, які вказують позицію 15 мутантів. Для кожного із 15 мутантів, перерахованих в таблиці внизу фігури 17, показані послідовності людини (зверху), які були мутовані в мишачі послідовності (внизу). (Відмітно: отримання мутанта #11 не було успішно виконане).

Всі мутанти, за винятком мутанта #11 із фігури 17, були експресовані в клітинах 293 і піддані аналізу FACS, як на фігурі 16, за винятком того, що 5 мкг/мл гуманізованих версій кожного антитіла (тобто, h7D9.v3, h22A10.v83 і h5B6 антитіло проти gD-мітки (позитивний контроль)) були використані, із використанням антиантитіл людини Alexa488 для детекції. Результати показані на фігурі 18A з даними флуоресценції, представлені як процент сигналу анти-gD для нормування рівнів експресії. (Відмітно: мутант #17 не експресувався в клітинах 293 і таким чином був виключений із набору даних). h7D9.v3 зв'язувалося з усіма мутантами за винятком #6 і #9, в той час як h22A10.v83 зв'язувало всі мутанти, за винятком мутанта #15 (стрілки).

Шляхом поєднання різних видів мезотеліну ключові залишки в епітопі h7D9.v3 були точно визначені у вигляді двох одиничних амінокислотних залишків, які відрізнялися між послідовністю людини і послідовністю яванської макаки, що не є перехресно-реактивною: E153 в мутанті #6 і D174 в мутанті #9. Важливість цих залишків для зв'язування антитіла була підтверджена за допомогою мутування еквівалентних залишків в мезотеліні яванської макаки на придатні амінокислотні залишки людини (наприклад, R153 до E і G174 до D). h7D9.v3, яке в іншому випадку не зв'язується з мезотеліном яванської макаки, було здатне зв'язувати мутанти мезотеліну яванської макаки (фігура 18B). Додаткові дослідження, в яких залишок E152 послідовності мезотеліну людини був мutowаний до Q, привели до інгібування зв'язування h7D9.v3, передбачаючи, що залишок E152 також відіграє роль в зв'язуванні антитіла.

На основі нещодавно передбаченої армадило-подібної повторюваної структури мезотеліну (Sathyanarayana et al., BMC Structural Biology 9:1 (2009)), антитіло 7D9, ймовірно, утворює містки між внутрішнім стеблом 4 і зовнішнім стеблом 5 мезотеліну. Аналогічно, оскільки h22A10.v83 перехресно реагує із щурячою, але не з мишачою послідовністю, залишок E211 в мутанті #15 (у зовнішньому стеблі 6, див. Sathyanarayana et al. вище), мабуть, є критичною детермінантою його епітопу. Фігура 19 відображає залишки, зв'язані h7D9.v3 і h22A10.v83.

Н. Зв'язування h7D9.v3 не інгібується глікозилюванням

Щоб визначити, чи зв'язується h7D9.v3 із глікозилюваним мезотеліном, his-мічений по С-кінцю мезотелін людини був експресований в клітинах CHO, очищений і додатково відділений відповідно до заряду на колонці Mono S у вигляді фракцій з підвищеним (фракція A11), середнім (A12), низьким (B1) практично відсутнім (B5) рівнем глікозилювання мезотеліну, як показано фарбуванням кумасі брильянтовим блакитним в SDS-PAGE-гелі. (фігура 20, вгорі зліва). Кожна фракція була нанесена на чип із заздалегідь зв'язаним h7D9.v3, і швидкості асоціації і швидкості дисоціації були виміряні для виявлення ідентичних афінностей (1,5 нМ) для кожної фракції (фігура 20, знизу зліва), вказуючи на те, що зв'язування h7D9.v3 не інгібується глікозилюванням. Ці дані були підтверджені, демонструючи, що h7D9.v3 може імунопреципітувати всі ті ж самі смуги, як гуманізоване анти-gD h5B6 антитіло із клітин HT1080, стабільно експресуючих gD-мезотелін людини (в епітопній мітці gD якого відсутні сайти глікозилювання), вказуючи на те, що h7D9.v3 може імунопреципітувати мезотелін людини незалежно від стану глікозилювання. Навпаки, гуманізоване 22A10 переважно імунопреципітує більше низькомолекулярні види (з нікчемним глікозилюванням), вказуючи на те, що на зв'язування 22A10 впливає глікозилювання. (фігура 20, праворуч).

Щоб оцінити здатність контрольного антитіла зв'язувати глікозилюваний мезотелін в порівнянні із h7D9.v3, був виконаний аналіз FACS, в якому зв'язування контрольного антитіла із клітинами OVCAR3 порівнюється зі зв'язуванням h7D9.v3 з клітинами OVCAR3. Придатні повторні антитіла використовуються для визначення зв'язування h7D9.v3 і контрольного антитіла з клітинами OVCAR3 (наприклад, анти-людські антитіла Alexa 647 використовуються для визначення зв'язування h7D9.v3).

I. Моноклональне антитіло 19C3 блокує взаємодію MUC16 з мезотеліном

Моноклональні антитіла були протестовані з метою визначити, чи здатні вони блокувати зв'язування MUC16 з мезотеліном. Зв'язування очищеного біотинільованого фрагмента MUC16 (Muc16-Bt, що має три муцинові повтори) з мезотеліном, який стабільно експресується в клітинах A431 (які в нормі не експресують мезотелін) показано на фігурі 21 ("без Ab"), ліва панель. Попередня інкубація клітин з 5-кратним молярним відношенням 19C3, але не 7D9, інгібувала зв'язування MUC16-Bt з мезотеліном, що було визначено FACS із стрептавідином-PE, як показано на фігурі 21, ліва панель. Навпаки, зв'язування рекомбінантного his8-міченого по С-кінцю мезотеліну (очищений з клітин 293) з клітинами PC3, які стабільно експресують MUC16 було оцінено за відсутності і у присутності 5-кратного молярного надлишку вказаних антитіл проти мезотеліну (фігура 21 права панель), які були детектовані способом FACS з антитілами Alexa647-анти-his6. Попередня інкубація мезотеліну з 19C3, але не 7D9 або 22A10, інгібувала зв'язування мезотеліну із експресуючими MUC16 клітинами (фігура 21, права панель). Дійсно, 7D9 і 22A10, мабуть, посилюють зв'язування мезотеліну з MUC16 в даному аналізі.

J. Переважання мезотеліну людини в різних типах злоякісного новоутворення

Експресія мезотеліну людини в різних злоякісних пухлинах була проаналізована, використовуючи імуногістохімію. Фіксовані в формаліні, взяті в парафін (FFPE) пухлинні мікроматриці (із одним 1 мм ядром на пухлину) проточної аденокарциноми підшлункової залози (фігура 22), серозної аденокарциноми яєчника (фігура 23) і аденокарциноми недрібноклітинного раку легені (фігура 24) були нарізані на предметне скло мікроскопа, депарафінізовані і регідратували за допомогою використання серії розведеного спирту. Зрізи на предметному склі були заздалегідь оброблені для виявлення антигену, використовуючи Target Retrieval Solution (Dako, Glostrup, Denmark), екрановані, блоковані і забарвлені 10 мкг/мл мишачим моноклональним антитілом проти мезотеліну людини 19C3 протягом 60 хвилин в приладі автоматичного фарбування Dako autostainer. Після промивання, 19C3 детектували біотинільованим антимишачим антитілом із подальшим застосуванням комплексу ABC (VECTASTAIN ABC Elite Kit, Vector Laboratories, Burlingame, CA) і візуалізували, використовуючи DAB (Pierce Laboratories) як хромоген. Потім зрізи були дофарбовані гематоксиліном Майєра і зневоднені серією спиртів і ксилолів із подальшим покриттям покривними стеклами із застосуванням органічного заливного середовища (PermaMount, Fisher Scientific, Pittsburg, PA).

Фарбування мезотеліну (коричневе) було виражене в балах досвідченим патоморфологом відповідно до наведеної нижче схеми, враховуючи інтенсивність (темний відтінок коричневого фарбування), а також об'єм фарбування. Репрезентативний приклад кожного бала фарбування мезотеліну показаний на фігурах 22-24 для кожного типу пухлини.

0 (негативний): дуже слабе або ніякого фарбування в >90 % пухлинних клітин;

1+ (слабке): переважаючий патерн фарбування є слабо вираженим;

2+ (помірне): переважаючий патерн фарбування є помірно вираженим в більшості (>50 %) неопластичних клітин;

3+ (сильне): переважаючий патерн фарбування є понадміру вираженим в більшості (>50 %) неопластичних клітин.

Фігура 22 показує, що 70 % проточних аденокарцином підшлункові залози були позитивними по мезотеліну, демонструючи фарбування на рівні 1+, 2+ або 3+, причому 33 % демонстрували фарбування 2+ або 3+. На фігурі 23 показано, що 98 % серозних аденокарцином яєчника були позитивними по мезотеліну, причому 74 % демонстрували фарбування на рівні 2+ або 3+. Крім того, всі вісім проаналізованих метастазів із серозної аденокарциноми яєчника були позитивними по мезотеліну, передбачаючи, що первинні пухлини яєчника не втрачають експресію мезотеліну після метастазування. На фігурі 24 показано, що 44 % недрібноклітинної карциноми легені (NSCLC, підтип - аденокарцинома) є позитивними по мезотеліну, причому 26 % демонструють фарбування на рівні 2+ або 3+. Крім того, три із восьми (38 %) проаналізованих відповідних метастазів із позитивних по мезотеліну первинних пухлин NSCLC у пацієнта зберігали позитивне по мезотеліну фарбування.

Мезотелін також експресується в мезотеліомах і раку ендометрія, як визначено ІНС, використовуючи антитіло 19C3.

Експресія мезотеліну у яванської макаки також була вивчена. Зрізи мезотелію плеври легені і перикардія серця із людини (фіксовані в формаліні, укладені в парафін зрізи) і із яванської макаки (заморожені зрізи) були нарізані і забарвлені моноклональним антитілом 19C3 або моноклональним антитілом 22A10, відповідно. Мезотелій людини специфічно забарвлювався антитілом 19C3 (фігура 25, зліва), і мезотелій яванської макаки специфічно забарвлювався антитілом 22A10 (фігура 25, праворуч). Ці результати демонструють, що 22A10 може розпізнавати ендегенний мезотелін яванської макаки, який має розподіл, подібний такому у людини.

K. Виробництво кон'югатів антитіла проти мезотеліну-лікарського препарату

Кон'югати антитіла проти мезотеліну-лікарський препарат (ADC) були отримані шляхом ковалентного зв'язування h7D9.v3 і h22A10.v83 із молекулою лікарського препарату MC-vc-PAB-MMAE, що містить лінкер, яка представлена вище в Розділі II.D. Для зручності, молекулу лікарського препарату MC-vc-PAB-MMAE, що містить лінкер, по-іншому називають в цих Прикладах і на фігурах "vcMMAE" або "VCE". (Наприклад, h7D9.v3-MC-vc-PAB-MMAE називають в цих Прикладах і на фігурах як h7D9.v3-vcMMAE або h7D9.v3-VCE). До ковалентного зв'язування антитіла були частково відновлені за допомогою TCEP, використовуючи стандартні способи відповідно до методології, описаної в WO 2004/010957 A2. Частково відновлені антитіла утворювали ковалентний зв'язок із лінкервмісною молекулою лікарського препарату, використовуючи стандартні способи відповідно до методології, описаної в статті Doronina et al. (2003) Nat. Biotechnol. 21:778-784 і US 2005/0238649 A1. Коротко, частково відновлені антитіла були об'єднані із лінкервмісною молекулою лікарського препарату для забезпечення можливості

утворення ковалентного зв'язку молекули із цистеїновими залишками. Реакції утворення ковалентного зв'язку були зупинені, і ADC були очищені. Навантаження лікарським препаратом (середнє число молекул лікарського препарату на одне антитіло) для кожного ADC була визначена і її значення знаходилися в діапазоні від 3,33 до 4,0 у всіх випадках.

5 L. Ефективність h7D9.v3-vcMMAE в in vivo моделі HPAC

Ефективність h7D9.v3-vcMMAE була досліджена, використовуючи модель ксенотрансплантата аденокарциноми підшлункової залози. П'ять мільйонів клітин HPAC (позитивних по мезотеліну (2+) згідно із ІНС з використанням 19C3) в HBSS були ін'єктовані підшкірно у мишей SCID з природженою відсутністю клітин-кілерів, і в пухлині були введені дози h7D9.v3-vcMMAE в концентрації 1,1, 2,7, 5,5, 11 і 16,4 мг/кг (при 3,5 MMAE/антитіло) або h5B6 анти-gD-vcMMAE в концентрації 5, 10 і 15 мг/кг (з 3,3 MMAE на антитіло) або 15 мг/кг незахищеного h7D9.v3 (без MMAE). Як показано на фігурі 26 значне інгібування пухлинного зростання було досягнуто при 5,5 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE, і регресія пухлини була досягнута при 11-16 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE, але ніяких значущих ефектів не спостерігали при введенні незахищеного антитіла або контрольного gD-vcMMAE в дозі 15 мг/кг. Показаний змодельовати підбір кривих, оснований на загальній швидкості зростання. На нижній правій панелі фігури 26 представлений аналіз FACS і інтерналізація h7D9.v3 в клітинах HPAC і ІНС.

М. Ефективність h7D9.v3-vcMMAE в моделі первинної аденокарциноми підшлункової залози

Ефективність h7D9.v3-vcMMAE була досліджена в моделі первинної аденокарциноми підшлункової залози (Oncotest, GMBH, Germany). Шматки позитивних по мезотеліну первинних пухлин підшлункової залози людини (експресуючих мезотелін на рівні 1-2+ згідно з ІНС) були імплантовані підшкірно у самиць безтимусних мишей NMRI, яким вводили дози h7D9.v3-vcMMAE в концентрації 5, 10 і 20 мг/кг (3,5 MMAE/антитіло). На фігурі 27 відкладені середні значення об'єму пухлини \pm стандартне відхилення. Значне інгібування пухлинного зростання було виявлено при всіх дозах h7D9.v3-vcMMAE. ІНС первинної пухлини підшлункової залози показана праворуч.

N. Ефективність h7D9.v3-vcMMAE в моделі раку яєчника

Ефективність h7D9.v3-vcMMAE була досліджена, використовуючи модель ксенотрансплантата раку яєчника. Мільйон клітин OvCar3 \times 2.1 (позитивних по мезотеліну (2-3+) згідно з ІНС з використанням 19C3) були ін'єктовані в скупчення жирової тканини молочної залози мишей CB17 SCID із природженою відсутністю клітин-кілерів, якою послідовно вводили дози 1, 2,5, 5, 10 і 15 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE (3,5 MMAE/антитіло) або h5B6 анти-gD-vcMMAE (3,3 MMAE/антитіло). Як показано на фігурі 28, помірну активність спостерігали при 2,5 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE і регресію пухлини - при 5 мг/кг і вище, в той час як анти-gD-vcMMAE не виявляло активності в дозі нижче за 5 мг/кг (тільки помірною активністю - при 10 мг/кг і зупинка зростання пухлини - при 15 мг/кг). Показаний змодельовати підбір кривих, оснований на загальній швидкості зростання. На правій панелі фігури 28 представлений аналіз FACS і інтерналізація h7D9.v3 в клітинах OvCar3 \times 2.1 і ІНС.

O. Ефективність h7D9.v3-vcMMAE в моделі раку легені

Ефективність h7D9.v3-vcMMAE була досліджена, використовуючи модель ксенотрансплантата раку легені (плоскоклітинної карциноми). П'ять мільйонів клітин H226 \times 2 (позитивних по мезотеліну (3+) згідно з ІНС) були ін'єктовані в суміші 50:50 Matrigel:HBSS в здухвинну ділянку мишей CB17 SCID. На фігурі 29 відкладені середні значення об'єму пухлини \pm стандартне відхилення. Виявлена помірною активністю h7D9.v3-vcMMAE (3,5 MMAE/антитіло) в дозі 5 мг/кг і зупинка пухлинного зростання при 10 мг/кг, в той час як не було виявлено ніякої значущої активності контрольного кон'югата анти-gD-vcMMAE (3,97 MMAE/антитіло) в будь-якій дозі. На правій панелі фігури 29 представлений аналіз FACS і інтерналізація h7D9.v3 в клітинах H226 \times 2 і ІНС.

P. h7D9.v3-vcMMAE і h22A10.v83-vcMMAE мають схожу ефективність

Була досліджена ефективність h7D9.v3-vcMMAE в порівнянні із h22A10.v83-vcMMAE. Двадцять мільйонів клітин BJAB, які стабільно експресують або gD-мезотелін людини (зліва) або gD-мезотелін яванської макаки (праворуч), були інокульовані підшкірно мишам CB17 SCID в буфері HBSS. Мишам вводили дози 0,5 або 2 мг/кг h7D9.v3-vcMMAE (мишам, якому інокульовали BJAB-gD-мезотелін людини) або h22A10.v83-vcMMAE (мишам, якому інокульовали BJAB-gD-мезотелін яванської макаки) або 2 мг/кг анти-gD-vcMMAE, що використовується як позитивний контроль і для нормування будь-яких відмінностей в експресії між двома видами клітинної лінії. На фігурі 30 відкладені середні значення об'єму пухлини \pm стандартне відхилення. Як h7D9.v3-vcMMAE, так і h22A10.v83-vcMMAE виявляли кращу активність в дозі 2 мг/кг в порівнянні із контролем gD-vcMMAE відносно дії на BJAB-gD-мезотелінової пухлини людини і BJAB-gD-мезотелінової пухлини яванської макаки, відповідно. Негативним контролем

в цьому експерименті було антитіло, яке не має до даного впливу, кон'юговане із vcMMAE, яке не виявляло ніякої значущої активності.

Для подальшої оцінки активності h22A10.v83-vcMMAE, в пухлині H226 × 2 фігури 29 і в пухлині OvCar3 × 2.1, вирощені як описано на фігурі 28, вводили дози із вказаними концентраціями h7D9.v3-vcMMAE і h22A10.v83-vcMMAE (3,53 MMAE/антитіло), або anti-gD-vcMMAE як негативний контроль. На фігурі 31 відкладені середні значення об'єму пухлини ± стандартне відхилення. Незважаючи на значно більш слабе зв'язування незахищеного h22A10.v83 в порівнянні із h7D9.v3 із обома цими клітинними лініями згідно із FACS аналізом, h22A10.v83-vcMMAE мало схожу із h7D9.v3-vcMMAE ефективність в моделі H226×2 (верхня ліва панель) і лише трохи меншою активністю в моделі OvCar3 × 2.1 (верхня права панель), на що вказує більш швидка регресія пухлин після введення дози 6 мг/кг.

Q. MUC16 і мезотелін утворюють комплекс на "позитивних по двох антигенах" клітинних лініях

Була досліджена взаємодія MUC16 і мезотеліну на клітинних лініях. Клітини OvCar3, які експресують мезотелін і MUC16, були лізовані в 1 % буфері NP40. Як показано на фігурі 32, лівої панелі, лізати були імунопреципітовані під дією m7D9 або ізотипним контрольним IgG і проаналізовані Вестерн-блотингом із використанням антитіл проти MUC16 (верхній блот) або h7D9 (нижній блот) для виявлення комплексів мезотелін:MUC16 або загального мезотеліну, відповідно. (20 % неімунопреципітованого нанесеного лізату показано в лівій ямці). m7D9 було здатне спільно імунопреципітувати MUC16 із мезотеліном із лізатів клітин OvCar3. Ці дані демонструють, що MUC16 утворює комплекс із мезотеліном в клітинних лініях, які експресують як мезотелін, так і MUC16 (тобто є "позитивними по двох антигенах" клітинними лініями).

Як показано на фігурі 32, правої панелі, антитіла або до мезотеліну, або до MUC16 були використані для імунопреципітації (IP) цих білків із кондиціонованих середовищ, в яких культивували вказані клітинні лінії. Клітинні лінії експресували тільки мезотелін (HPAC), тільки MUC16 (A431), жоден із даних антигенів (H520) або обидва даних антигени (OvCar3, CAPAN-2, EKVX і OvCar429 клітини). Або химерне антитіло проти мезотеліну ch7D9 (верхня і нижня панелі), або антитіла проти MUC16 (середня панель) були використані для імунопреципітації. Промиті імунопреципітати були проаналізовані способом Вестерн-блотингу (WB) із використанням мишачого антитіла проти мезотеліну 2E5 (верхня панель) або мишачим антитілом 1.B.823 проти В-домену MUC16 (M11-подібного) (US Biological, Swampscott, MA; середня і нижня панелі). Відповідно, на верхній панелі продемонстрований імунопреципітований мезотелін із клітинних ліній, які експресують мезотелін, на середній панелі продемонстрований імунопреципітований MUC16 із клітинних ліній, які експресують MUC16, і на нижній панелі продемонстровані спільно імунопреципітовані комплекси мезотелін:MUC16, які специфічні для клітинних ліній, експресуючих обидва білки, (позитивних по двох антигенах клітинних ліній). Ці результати вказують на те, що мезотелін може виділятися в середовище в пов'язаному із MUC16 вигляді. Відповідно, антитіла і імунокон'югати за винаходом придатні для лікування позитивного по мезотеліну злоякісного новоутворення, включаючи позитивні по двох антигенах злоякісні пухлини.

R. 19C3, але не 7D9, витісняє попередньо зв'язаний із мезотеліном MUC16

Було досліджено зв'язування 19C3 із мезотеліном в присутності MUC16. MUC16-біотин (1 мкг/мл, або 9,2 нМ) був попередньо зв'язаний із клітинами HT1080, експресуючими мезотелін. 19C3 (5 мкг/мл) було додано, щоб визначити чи може воно витіснити попередньо зв'язаний MUC16. MUC16-біотин виявляли за допомогою реагенту детекції SAPE, і зв'язане антитіло виявляли за допомогою антимишачого антитіла Alexa488. На фігурі 33 показано, що 19C3 дійсно здатне витіснити MUC16 і зв'язатися із мезотеліном. Антитіло 7D9 (33 нМ), яке зв'язується із ділянкою мезотеліну поза сайтом зв'язуванням MUC16, було використано як негативний контроль і, як і очікувалося, не було здатне витіснити заздалегідь зв'язаний MUC16. Додаткові експерименти показали, що 19C3 також витісняє MUC16 в концентрації 0,1 мкг/мл, в той час як антитіло 2E5 може витіснити MUC16 тільки при концентрації ≥ 5 мкг/мл (дані не представлені).

Хоч вищевикладений винахід був описано досить детально за допомогою ілюстрацій і прикладів із метою виключення двозначного тлумачення, описи і приклади не треба тлумачити як обмеження об'єму даного винаходу. Опубліковані дані про всі патенти і наукова

ПЕРЕЛІК ПОСЛІДОВНОСТЕЙ

<110> GENENTECH, INC.; F. HOFFMANN-LA ROCHE AG; Mark DENNIS; Suzanna J. SCALES;
Susan D. SPENCER; Yin ZHANG

<120> АНТИТИЛА ПРОТИ МЕЗОТЕЛІНУ І ІМУНОКОН'ЮГАТИ

<130> P4532R1-WO

<140>

<141>

<150> 61/459,962

<151> 2010-12-20

<160> 74

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 108

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 2

<211> 113

<212> Білок

<213> Mus sp.

<400> 2

Asp Ile Met Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser

```

                20                25                30
Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln
   35                40                45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
   50                55                60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
   65                70                75                80

Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys His Gln
   85                90                95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
   100                105                110

```

Arg

<210> 3
 <211> 113
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 поліпептид

```

<400> 3
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1                5                10                15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser
   20                25                30

Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
   35                40                45

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
   50                55                60

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
   65                70                75                80

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln
   85                90                95

Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
   100                105                110

```

Arg

<210> 4

<211> 113

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 4

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	

Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ser	Ser	Gln	Ser	Val	Leu	Tyr	Ser
			20					25					30		

Ser	Asn	Gln	Lys	Asn	Tyr	Leu	Ala	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys
		35					40					45			

Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	Glu	Ser	Gly	Val
	50					55					60				

Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr
65					70					75				80	

Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	His	Gln
			85						90					95	

Tyr	Leu	Ser	Ser	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
		100						105					110		

Arg

<210> 5

<211> 112

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 5

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30		

Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
			35				40					45			

Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

<210> 6
<211> 115
<212> Білок
<213> Mus sp.

<400> 6
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Thr Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Leu
100 105 110

Thr Val Ser
115

<210> 7
<211> 115
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 7

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser
 115

<210> 8

<211> 115

<212> Вілок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 поліпептид

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95
Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser
115

<210> 9
<211> 108
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 9
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Leu Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 10
<211> 97
<212> Білок
<213> Mus sp.

<400> 10
Gly Ala Ser Leu Gly Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
1 5 10 15

Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr
20 25 30

Val Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro
35 40 45

Ser Arg Phe Ser Ala Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile

50 55 60

Ser Asn Leu Glu Gln Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly
65 70 75 80

Asn Thr Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
85 90 95

Arg

<210> 11
<211> 108
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 12
<211> 108
<212> Білок
<213> Штучна послідовність

<220>
<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

```

1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
                20                25                30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
                35                40                45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
                50                55                60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
        65                70                75                80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr
                85                90                95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                100                105

```

<210> 13
 <211> 113
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

```

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
                20                25                30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
                35                40                45
Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
                50                55                60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
        65                70                75                80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                90                95
Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
                100                105                110

```

Ser

<210> 14
 <211> 117
 <212> Білок
 <213> Mus sp.

<400> 14

Glu Leu Leu Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ala Lys Asn Asn Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 15
 <211> 117
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 поліпептид

<400> 15

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 16

<211> 117

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 16

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Phe Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 17

<211> 17

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 17

Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 18

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 18

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 19

<211> 8

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 19

His Gln Tyr Leu Ser Ser Tyr Thr
1 5

<210> 20

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 20

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met His
1 5 10

<210> 21

<211> 18

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 21

Gly Tyr Ile Arg Pro Ser Thr Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
1 5 10 15

Lys Asp

<210> 22

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 22

Ala Arg Ser Arg Trp Leu Leu Asp Tyr
1 5

<210> 23

<211> 23

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 24

<211> 15

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 24

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 25

<211> 15

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 25

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 26

<211> 32

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 26

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 27

<211> 32

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
поліпептид

<400> 27

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 28

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 28

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 29

<211> 25

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 30

<211> 13

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10

<210> 31

<211> 30

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний поліпептид

<400> 31

Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 32

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 32

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний пептид

<400> 33

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 34

<211> 7

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 34

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1 5

<210> 35

<211> 9

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 35

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 36

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Phe Met Ser
1 5 10

<210> 37

<211> 18

<212> Білок

<213> Штучна послідовність

<220>

<223> Опис штучної послідовності: синтетичний
пептид

<400> 37

Ala Thr Ile Ser Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly

<210> 38
 <211> 10
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 пептид

<400> 38
 Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 39
 <211> 10
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 пептид

<400> 39
 Ala Arg Phe Asp Gly Tyr Ile Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 40
 <211> 30
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 поліпептид

<400> 40
 Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
 1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 41
 <211> 11
 <212> Білок
 <213> Штучна послідовність

<220>
 <223> Опис штучної послідовності: синтетичний
 пептид

<400> 41
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 1 5 10

<210> 42
 <211> 622
 <212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 42

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
210 215 220

Ala Ala Leu Gln Gly Gly Gly Pro Pro Tyr Gly Pro Pro Ser Thr Trp
225 230 235 240

Ser Val Ser Thr Met Asp Ala Leu Arg Gly Leu Leu Pro Val Leu Gly

					245						250					255
Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Trp	Arg	
			260					265					270			
Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu	Arg	Thr	Ile	
		275					280					285				
Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Ala	Cys	Pro	Ser	
	290					295					300					
Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys	
305					310					315					320	
Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met	
				325					330					335		
Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	
			340					345					350			
Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val	
		355					360					365				
Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile	
	370					375					380					
Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	
385					390					395					400	
Val	Asn	Lys	Gly	His	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp	
				405					410					415		
Arg	Phe	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr	
			420					425					430			
Leu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Pro	Gly	Tyr	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	
		435					440					445				
Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Ser	Ile	Trp	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	
	450					455					460					
Leu	Asp	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala	
465					470					475					480	
Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	Asn	Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	
			485					490						495		
Gln	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	

	500		505		510										
Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	Leu	Ala	Thr	Phe	Met	Lys	Leu	Arg	Thr
	515						520					525			
Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	Val	Ala	Glu	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly
	530					535					540				
Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala	Glu	Glu	Arg	His	Arg	Pro	Val	Arg
545					550					555					560
Asp	Trp	Ile	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln	Asp	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Leu
				565					570					575	
Gly	Leu	Gln	Gly	Gly	Ile	Pro	Asn	Gly	Tyr	Leu	Val	Leu	Asp	Leu	Ser
			580					585					590		
Met	Gln	Glu	Ala	Leu	Ser	Gly	Thr	Pro	Cys	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Pro
		595					600					605			
Val	Leu	Thr	Val	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala		
	610					615					620				
<210> 43															
<211> 285															
<212> Білок															
<213> Homo sapiens															
<400> 43															
Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Ala	Cys	Pro	Ser	Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile
1			5						10					15	
Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys	Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val
			20					25					30		
Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met	Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro
	35						40					45			
Phe	Thr	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu
	50					55					60				
Tyr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val	Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu
65					70					75					80
Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile	Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr	Ser
				85					90					95	
Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu	Val	Asn	Lys	Gly	His	Glu	Met
			100					105					110		

Ser Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly
115 120 125

Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly
130 135 140

Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser
145 150 155 160

Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg
165 170 175

Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met
180 185 190

Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala
195 200 205

Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp
210 215 220

Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr
225 230 235 240

Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys
245 250 255

Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg
260 265 270

Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly
275 280 285

<210> 44

<211> 630

<212> Билнок

<213> Homo sapiens

<400> 44

Met Ala Leu Pro Thr Ala Arg Pro Leu Leu Gly Ser Cys Gly Thr Pro
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ser Leu Leu Phe Leu Leu Phe Ser Leu Gly Trp Val Gln
20 25 30

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg

50							55								60
Gln	Leu	Leu	Gly	Phe	Pro	Cys	Ala	Glu	Val	Ser	Gly	Leu	Ser	Thr	Glu
65					70					75					80
Arg	Val	Arg	Glu	Leu	Ala	Val	Ala	Leu	Ala	Gln	Lys	Asn	Val	Lys	Leu
				85					90					95	
Ser	Thr	Glu	Gln	Leu	Arg	Cys	Leu	Ala	His	Arg	Leu	Ser	Glu	Pro	Pro
			100					105					110		
Glu	Asp	Leu	Asp	Ala	Leu	Pro	Leu	Asp	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Asn	Pro
		115					120					125			
Asp	Ala	Phe	Ser	Gly	Pro	Gln	Ala	Cys	Thr	Arg	Phe	Phe	Ser	Arg	Ile
	130					135					140				
Thr	Lys	Ala	Asn	Val	Asp	Leu	Leu	Pro	Arg	Gly	Ala	Pro	Glu	Arg	Gln
145					150					155					160
Arg	Leu	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Ala	Cys	Trp	Gly	Val	Arg	Gly	Ser	Leu
				165					170					175	
Leu	Ser	Glu	Ala	Asp	Val	Arg	Ala	Leu	Gly	Gly	Leu	Ala	Cys	Asp	Leu
			180					185					190		
Pro	Gly	Arg	Phe	Val	Ala	Glu	Ser	Ala	Glu	Val	Leu	Leu	Pro	Arg	Leu
		195					200					205			
Val	Ser	Cys	Pro	Gly	Pro	Leu	Asp	Gln	Asp	Gln	Gln	Glu	Ala	Ala	Arg
		210				215					220				
Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Tyr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp
225					230					235					240
Ser	Val	Ser	Thr	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Gly
				245					250					255	
Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Trp	Arg
			260					265					270		
Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu	Arg	Thr	Ile
		275					280					285			
Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Ala	Cys	Pro	Ser
		290				295					300				
Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys

305		310		315		320									
Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met
				325					330					335	
Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu
			340					345					350		
Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val
		355					360					365			
Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile
	370					375					380				
Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu
385					390					395					400
Val	Asn	Lys	Gly	His	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Ala	Pro	Arg	Arg	Pro	Leu
				405					410					415	
Pro	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp	Arg	Phe	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Gln
			420					425					430		
Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr	Leu	Thr	Ala	Phe	Tyr	Pro	Gly	Tyr
		435					440					445			
Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Glu	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Ser	Ser
	450					455					460				
Ile	Trp	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu	Asp	Thr	Cys	Asp	Pro	Arg	Gln
465					470					475					480
Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala	Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	Asn
			485						490					495	
Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	Gln	Ser	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	Pro
			500					505					510		
Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	Leu
		515					520					525			
Ala	Thr	Phe	Met	Lys	Leu	Arg	Thr	Asp	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	Val
		530				535					540				
Ala	Glu	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	Ala
545					550					555					560
Glu	Glu	Arg	His	Arg	Pro	Val	Arg	Asp	Trp	Ile	Leu	Arg	Gln	Arg	Gln

```

                    565                    570                    575
Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn
    580                    585                    590

Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr
    595                    600                    605

Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu
    610                    615                    620

Leu Ala Ser Thr Leu Ala
625                    630

<210> 45
<211> 293
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 45
Glu Val Glu Lys Thr Ala Cys Pro Ser Gly Lys Lys Ala Arg Glu Ile
1          5          10          15

Asp Glu Ser Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
    20          25          30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Thr Gln Met Asp Arg Val Asn Ala Ile Pro
    35          40          45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu
    50          55          60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Gln His Leu Gly Tyr Leu
65          70          75          80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser
    85          90          95

Leu Glu Thr Leu Lys Ala Leu Leu Glu Val Asn Lys Gly His Glu Met
    100         105         110

Ser Pro Gln Ala Pro Arg Arg Pro Leu Pro Gln Val Ala Thr Leu Ile
    115         120         125

Asp Arg Phe Val Lys Gly Arg Gly Gln Leu Asp Lys Asp Thr Leu Asp
    130         135         140

Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu
145         150         155         160

```

Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln
165 170 175

Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys
180 185 190

Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys
195 200 205

Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu
210 215 220

Ser Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg
225 230 235 240

Thr Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu
245 250 255

Gly Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val
260 265 270

Arg Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly
275 280 285

Leu Gly Leu Gln Gly
290

<210> 46

<211> 285

<212> Білок

<213> *Macaca fascicularis*

<400> 46

Asp Val Glu Arg Thr Thr Cys Pro Pro Glu Lys Glu Val His Glu Ile
1 5 10 15

Asp Glu Asn Leu Ile Phe Tyr Lys Lys Arg Glu Leu Glu Ala Cys Val
20 25 30

Asp Ala Ala Leu Leu Ala Ala Gln Met Asp Arg Val Asp Ala Ile Pro
35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Asp Val Leu Lys His Lys Leu Asp Glu Leu
50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Val Ile Arg His Leu Gly His Leu
65 70 75 80

Phe Leu Lys Met Ser Pro Glu Asp Ile Arg Lys Trp Asn Val Thr Ser

				85					90					95		
Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Lys	Val	Ser	Lys	Gly	His	Glu	Met	
			100					105					110			
Ser	Ala	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp	Arg	Val	Val	Val	Gly	Arg	Gly	
		115					120					125				
Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Val	Asp	Thr	Leu	Thr	Ala	Phe	Cys	Pro	Gly	
	130					135					140					
Cys	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Pro	Glu	Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Pro	Pro	Ser	
145					150					155					160	
Val	Ile	Gly	Ala	Val	Arg	Pro	Gln	Asp	Leu	Asp	Thr	Cys	Gly	Pro	Arg	
				165					170					175		
Gln	Leu	Asp	Val	Leu	Tyr	Pro	Lys	Ala	Arg	Leu	Ala	Phe	Gln	Asn	Met	
			180					185					190			
Ser	Gly	Ser	Glu	Tyr	Phe	Val	Lys	Ile	Arg	Pro	Phe	Leu	Gly	Gly	Ala	
		195					200					205				
Pro	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Ala	Leu	Ser	Gln	Gln	Asn	Val	Ser	Met	Asp	
	210					215					220					
Leu	Ala	Thr	Phe	Met	Lys	Leu	Arg	Arg	Glu	Ala	Val	Leu	Pro	Leu	Thr	
225					230					235					240	
Val	Ala	Glu	Val	Gln	Lys	Leu	Leu	Gly	Pro	His	Val	Glu	Gly	Leu	Lys	
				245					250					255		
Val	Glu	Glu	Gln	His	Ser	Pro	Val	Arg	Asp	Trp	Ile	Leu	Lys	Gln	Arg	
			260					265					270			
Gln	Asp	Asp	Leu	Asp	Thr	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Gln	Gly				
		275					280					285				
<210>	47															
<211>	285															
<212>	Bilok															
<213>	Rattus sp.															
<400>	47															
Asp	Thr	Glu	Gln	Lys	Ala	Cys	Pro	Pro	Gly	Lys	Glu	Pro	Asn	Val	Val	
1				5					10					15		
Asp	Glu	Asn	Leu	Ile	Phe	Tyr	Gln	Asn	Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	
			20					25					30			

Asp Gly Thr Leu Leu Ala Gly Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro
 35 40 45
 Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr
 50 55 60
 Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Lys Gln Leu Gly His Phe
 65 70 75 80
 Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile Arg Gln Trp Asn Val Thr Ser
 85 90 95
 Pro Asp Thr Val Asn Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met
 100 105 110
 Asp Ala Gln Val Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly
 115 120 125
 Lys Leu Asp Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser
 130 135 140
 Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser
 145 150 155 160
 Val Met Trp Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg
 165 170 175
 His Leu Gly Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val
 180 185 190
 Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala
 195 200 205
 Ser Arg Glu Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp
 210 215 220
 Ile Ala Thr Phe Lys Lys Leu Gln Val Asp Ala Leu Val Gly Leu Ser
 225 230 235 240
 Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly Pro His Ile Gly Asp Leu Lys
 245 250 255
 Thr Glu Glu Asp Lys Ser Pro Val Arg Asp Trp Leu Phe Arg Gln Gln
 260 265 270
 Gln Lys Asp Leu Asp Ser Leu Gly Leu Gly Leu Gln Gly
 275 280 285

<210> 48
 <211> 285
 <212> Білок
 <213> Mus sp.

<400> 48

Asp Ala Glu Gln Lys Ala Cys Pro Pro Gly Lys Glu Pro Tyr Lys Val
 1 5 10 15

Asp Glu Asp Leu Ile Phe Tyr Gln Asn Trp Glu Leu Glu Ala Cys Val
 20 25 30

Asp Gly Thr Met Leu Ala Arg Gln Met Asp Leu Val Asn Glu Ile Pro
 35 40 45

Phe Thr Tyr Glu Gln Leu Ser Ile Phe Lys His Lys Leu Asp Lys Thr
 50 55 60

Tyr Pro Gln Gly Tyr Pro Glu Ser Leu Ile Gln Gln Leu Gly His Phe
 65 70 75 80

Phe Arg Tyr Val Ser Pro Glu Asp Ile His Gln Trp Asn Val Thr Ser
 85 90 95

Pro Asp Thr Val Lys Thr Leu Leu Lys Val Ser Lys Gly Gln Lys Met
 100 105 110

Asn Ala Gln Ala Ile Ala Leu Val Ala Cys Tyr Leu Arg Gly Gly Gly
 115 120 125

Gln Leu Asp Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser
 130 135 140

Tyr Leu Cys Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser
 145 150 155 160

Val Met Trp Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg
 165 170 175

His Leu Gly Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val
 180 185 190

Ser Gly Leu Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala
 195 200 205

Ser Val Lys Asp Leu Arg Ala Leu Ser Gln His Asn Val Ser Met Asp
 210 215 220

Ile Ala Thr Phe Lys Arg Leu Gln Val Asp Ser Leu Val Gly Leu Ser

<211> 4
 <212> Білок
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 53
 Asp Val Glu Arg
 1

<210> 54
 <211> 81
 <212> Білок
 <213> *Homo sapiens*

<400> 54
 Lys Asp Thr Leu Asp Thr Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Glu Glu Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp
 20 25 30

Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp
 35 40 45

Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser
 50 55 60

Glu Tyr Phe Val Lys Ile Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu
 65 70 75 80

Asp

<210> 55
 <211> 81
 <212> Білок
 <213> *Macaca fascicularis*

<400> 55
 Lys Asp Thr Val Asp Thr Leu Thr Ala Phe Cys Pro Gly Cys Leu Cys
 1 5 10 15

Ser Leu Ser Pro Glu Arg Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Val Ile Gly
 20 25 30

Ala Val Arg Pro Gln Asp Leu Asp Thr Cys Gly Pro Arg Gln Leu Asp
 35 40 45

Val Leu Tyr Pro Lys Ala Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Ser Gly Ser
 50 55 60

Glu Tyr Phe Val Lys Ile Arg Pro Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu
 65 70 75 80

Asp

<210> 56
 <211> 81
 <212> Білок
 <213> Rattus sp.

<400> 56
 Glu Asp Ile Val Lys Ala Leu Asp Asn Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys
 1 5 10 15
 Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ala Ile Pro Ser Ser Val Met Trp
 20 25 30
 Leu Val Gly Leu His Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly
 35 40 45
 Ile Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu
 50 55 60
 Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Arg Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Arg Glu
 65 70 75 80

Asp

<210> 57
 <211> 81
 <212> Білок
 <213> Mus sp.

<400> 57
 Glu Asp Met Val Lys Ala Leu Gly Asp Ile Pro Leu Ser Tyr Leu Cys
 1 5 10 15
 Asp Phe Ser Pro Gln Asp Leu His Ser Val Pro Ser Ser Val Met Trp
 20 25 30
 Leu Val Gly Pro Gln Asp Leu Asp Lys Cys Ser Gln Arg His Leu Gly
 35 40 45
 Leu Leu Tyr Gln Lys Ala Cys Ser Ala Phe Gln Asn Val Ser Gly Leu
 50 55 60
 Glu Tyr Phe Glu Lys Ile Lys Thr Phe Leu Gly Gly Ala Ser Val Lys
 65 70 75 80

Asp

<210> 58
<211> 4
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 58
Lys Asp Thr Leu
1

<210> 59
<211> 4
<212> Білок
<213> Mus sp.

<400> 59
Glu Asp Met Val
1

<210> 60
<211> 4
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 60
Thr Ala Phe Tyr
1

<210> 61
<211> 4
<212> Білок
<213> Mus sp.

<400> 61
Gly Asp Ile Pro
1

<210> 62
<211> 4
<212> Білок
<213> Homo sapiens

<400> 62
Glu Glu Leu Ser
1

<210> 63
<211> 4
<212> Білок
<213> Mus sp.

<400> 63
Gln Asp Leu His
1

<210> 64
<211> 4
<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 64

Pro Ser Ser Ile

1

<210> 65

<211> 4

<212> Білок

<213> Mus sp.

<400> 65

Ser Ser Val Met

1

<210> 66

<211> 4

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 66

Thr Cys Asp Pro

1

<210> 67

<211> 4

<212> Білок

<213> Mus sp.

<400> 67

Lys Cys Ser Gln

1

<210> 68

<211> 5

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 68

Gln Leu Asp Val Leu

1

5

<210> 69

<211> 5

<212> Білок

<213> Mus sp.

<400> 69

His Leu Gly Leu Leu

1

5

<210> 70

<211> 4

<212> Білок

<213> Homo sapiens

<400> 70

Met Asn Gly Ser

1

<210> 71
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Mus sp.

<400> 71
 Val Ser Gly Leu
 1

<210> 72
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Homo sapiens

<400> 72
 Pro Thr Glu Asp
 1

<210> 73
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Mus sp.

<400> 73
 Ser Thr Lys Asp
 1

<210> 74
 <211> 4
 <212> Білок
 <213> Mus sp.

<400> 74
 Ser Val Lys Asp
 1

ФОРМУЛА ВИНАХОДУ

- 5 1. Виділене антитіло, яке зв'язує мезотелін, де антитіло містить (i) HVR-H1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:20, (ii) HVR-H2, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:21, (iii) HVR-H3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:22, (iv) HVR-L1, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:17, (v) HVR-L2, що містить амінокислотну

послідовність SEQ ID NO:18, і (vi) HVR-L3, що містить амінокислотну послідовність SEQ ID NO:19.

2. Антитіло за п. 1, яке є моноклональним антитілом.

3. Антитіло за п. 1, яке є людським, гуманізованим або химерним антитілом людини.

5 4. Антитіло за п. 1, яке є фрагментом антитіла, який зв'язує мезотелін.

5. Антитіло за п. 1, де мезотелін є мезотеліном людини SEQ ID NO:43.

6. Антитіло за п. 1, де антитіло зв'язує епітоп SEQ ID NO:43, де епітоп містить E153 і D174 відповідно до нумерації SEQ ID NO:43, і яке в деяких випадках має одну або декілька наведених нижче характерних властивостей:

10 (a) не проявляє зниженого зв'язування з глікозилованими формами мезотеліну в порівнянні з неглікозилованими формами мезотеліну;

(b) не блокує зв'язування мезотеліну з муцином 16 (MUC16); і/або

(c) зв'язує мезотелін з афінністю, що дорівнює ≤ 5 nM.

7. Антитіло за п. 6, де антитіло не блокує зв'язування мезотеліну з MUC16.

15 8. Антитіло за п. 7, де антитіло не блокує зв'язування глікозилованих форм мезотеліну з MUC16 в порівнянні з неглікозилованими формами мезотеліну.

9. Антитіло за п. 6, де антитіло не виявляє зниженого зв'язування з глікозилованими формами мезотеліну в порівнянні з неглікозилованими формами мезотеліну.

20 10. Антитіло за п. 1, яке додатково містить варіабельний домен легкого ланцюга, що містить послідовність FR2 каркасної ділянки SEQ ID NO:25 і послідовність FR3 SEQ ID NO:27.

11. Антитіло за п. 1, де антитіло містить:

(a) послідовність VH, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:8;

25 (b) послідовність VL, яка принаймні на 95 % ідентична амінокислотній послідовності SEQ ID NO:4;

(c) послідовність VH, як в (a), і послідовність VL, як в (b).

12. Антитіло за п. 1, що містить послідовність VH SEQ ID NO:8.

13. Антитіло за п. 1, що містить послідовність VL SEQ ID NO:4.

14. Антитіло, що містить послідовність VH SEQ ID NO:8 і послідовність VL SEQ ID NO:4.

30 15. Антитіло за п. 1, яке є IgG1, IgG2a або IgG2b антитілом.

16. Антитіло за п. 1, кон'юговане з міткою.

17. Антитіло за п. 16, де міткою є випромінювач позитронів.

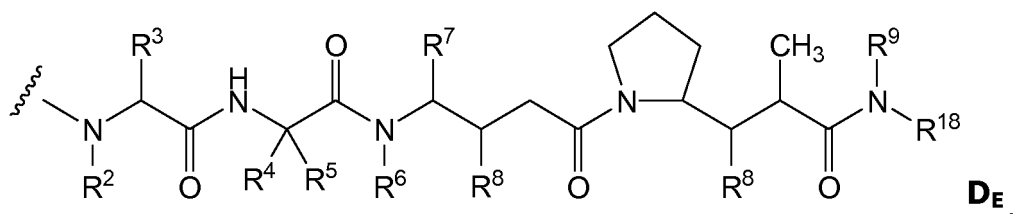
18. Антитіло за п. 17, де випромінювачем позитронів є ^{89}Zr .

19. Імунокон'югат з формулою Ab-(L-D)_p, де:

35 (a) Ab є антитілом за п. 1;

(b) L є лінкером;

(c) D є лікарським засобом з формулою D_E



40

і де R² і R⁶ кожний є метилом, R³ і R⁴ кожний є ізопропілом, R⁵ є H, R⁷ є втор-бутилом, кожний R⁸ незалежно вибраний із CH₃, O-CH₃, OH і H; R⁹ є H; і R¹⁸ являє собою -C(R⁸)₂-C(R⁸)₂-арил; і (d) p приймає значення від 1 до 8.

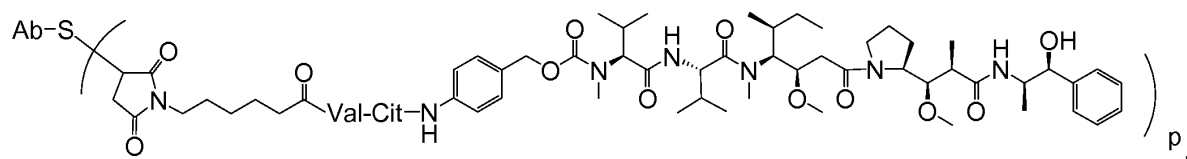
20. Імунокон'югат за п. 19, де лікарським засобом є ауристатин.

45 21. Імунокон'югат за п. 20, де лікарським засобом є монометилауристатин E (MMAE).

22. Імунокон'югат за п. 19, де лінкер здатний до розщеплення протеазою.

23. Імунокон'югат за п. 22, де лінкер містить дипептид val-cit.

24. Імунокон'югат за п. 19, що має формулу:



50

де S є атомом сірки.

25. Імунокон'югат за п. 24, де р приймає значення від 2 до 5.

26. Імунокон'югат за п. 24, що містить антитіло за п. 6.

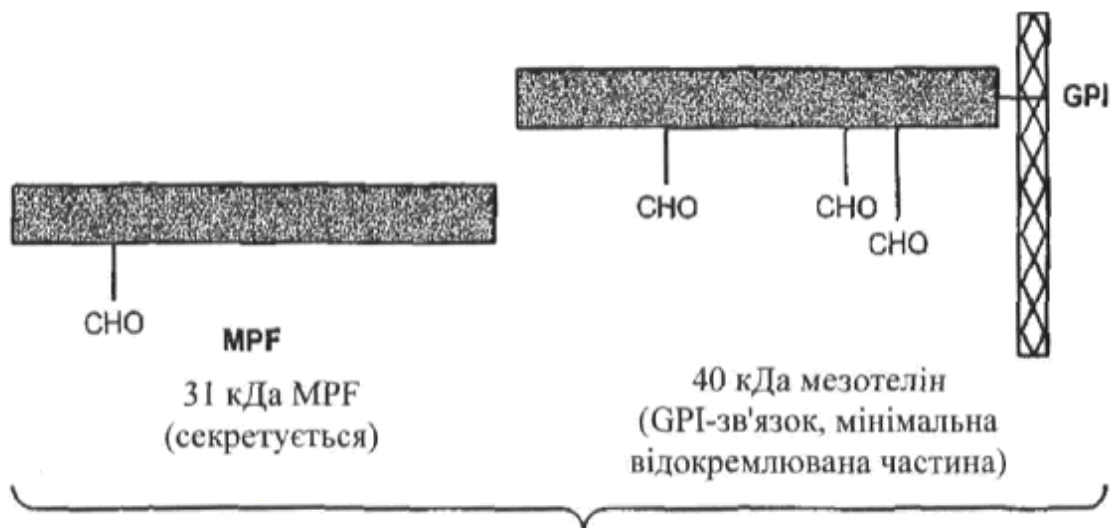
27. Імунокон'югат за п. 24, що містить антитіло за п. 14.

5 28. Фармацевтична композиція, що містить імунокон'югат за п. 19 і фармацевтично прийнятний носій.

29. Фармацевтична композиція за п. 28, що додатково містить додатковий терапевтичний засіб.

30. Фармацевтична композиція за п. 29, де додатковим терапевтичним засобом є гемцитабін.

10 31. Фармацевтична композиція за п. 29, де додатковим терапевтичним засобом є анти-MUC16 антитіло, кон'юговане із цитотоксичним агентом.



Фіг. 1

2204885_s_at gen.NM_005823 мезотелін *Homo sapiens*, транскрипційний варіант 1

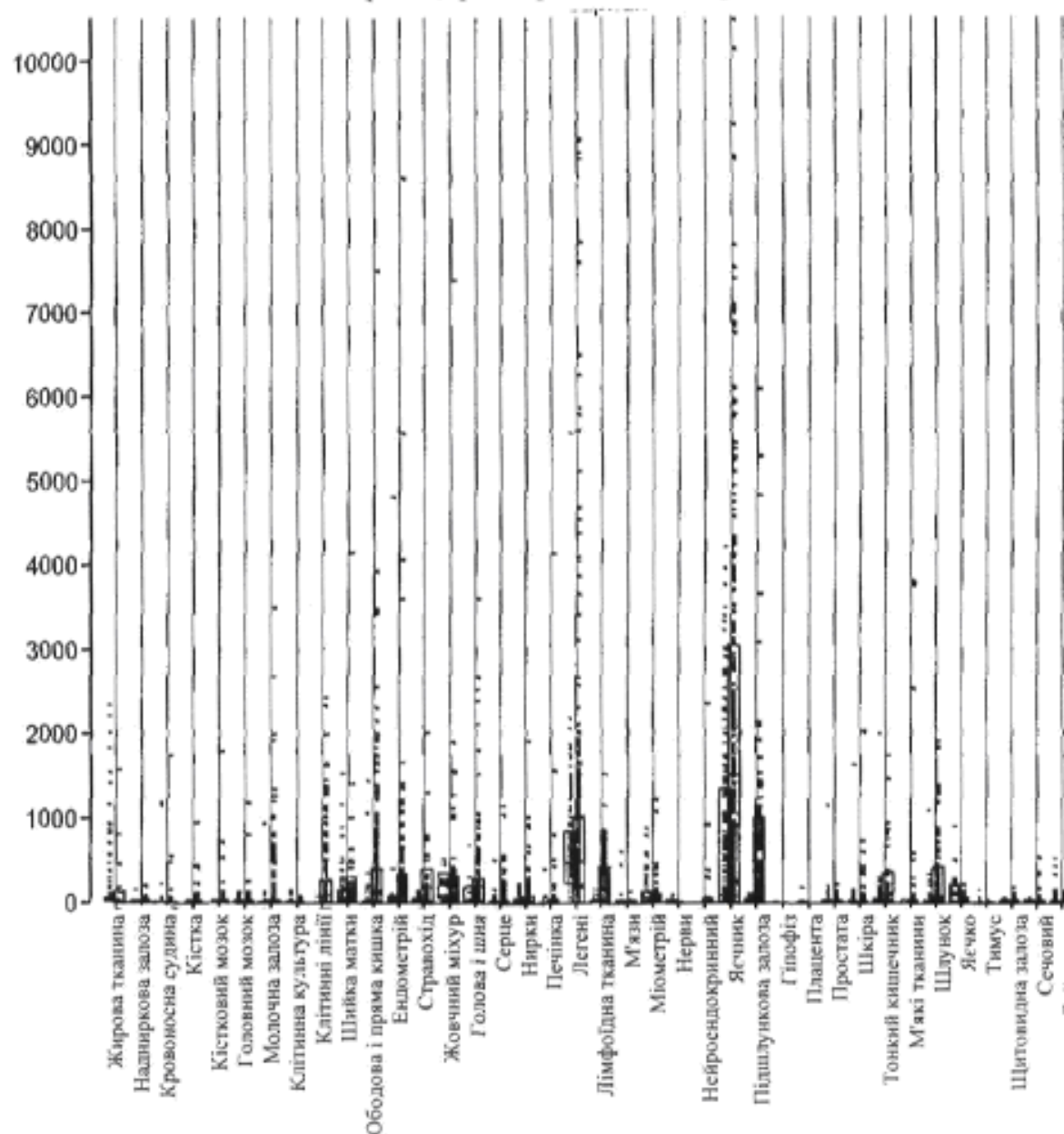


Fig. 2

Моноклональні антитіла проти мезотеліну

mAb	Ізотип	Група епітопу	Ділянка епітопу	Блокує зв'язування msc16?	Kd (nM) Biacore
7D9	G1	A	152-175	Посилює	0.23
19C3	G2b	C	1-70	Так	0.06
2E5	G2	C	1-70	Так	0.49
8B11	G1	B1	71-131	Ні	138
17A5	G1	B1	71-131	Ні	Не визначено
11H8	G2b	B1	71-131	Ні	Не визначено
16D5	G2a	B2	71-131	Посилює	2.21
18D12	G2b	B3	131-178	Ні	Не визначено
3H2	G1	B	71-131	Посилює	Не визначено
22A10	G2a	D	209-212	Посилює	4.25
15F7	G2a	E	1-131	Ні	Не визначено
12F6	G2a	E	Не визначено	Не визначено	780

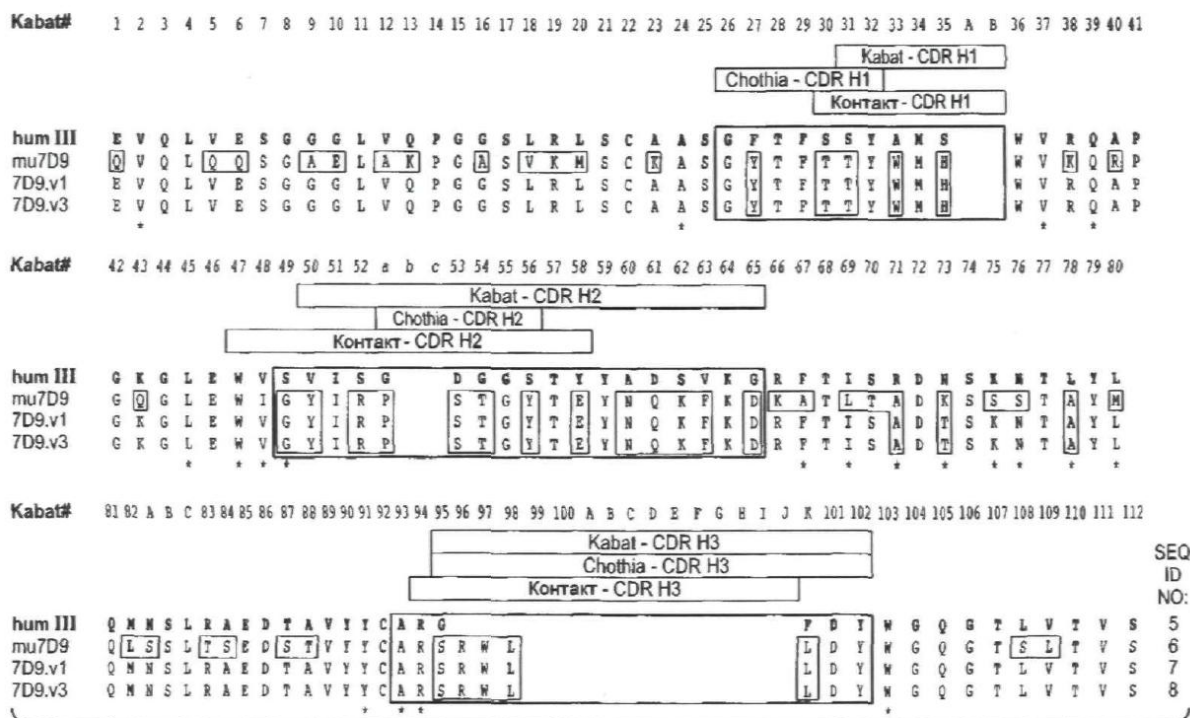
Фіг. 3

Поеднання варіабельних ділянок легкого ланцюга (мишаче і гуманізоване 7D9)

Kabat#	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	A	B	C	D	E	F	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37															
huK1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	R	A	S	Q	S	I	S	N	Y	L	A	N	Y	Q																					
mu7D9	D	I	H	M	T	Q	S	P	S	S	L	A	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	N	F	Q															
7D9.v1	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	N	V	Q															
7D9.v3	D	I	Q	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	A	S	V	G	D	R	V	T	I	T	C	K	S	S	Q	S	V	L	Y	S	S	N	Q	K	N	Y	L	A	N	F	Q															
	*		*																																							*	*															
Kabat#	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	A	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80														
huK1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	A	A	S	S	L	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P															
mu7D9	Q	K	P	G	Q	S	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	D	R	F	T	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	V	Q	A															
7D9.v1	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P															
7D9.v3	Q	K	P	G	K	A	P	K	L	L	I	Y	W	A	S	T	R	E	S	G	V	P	S	R	F	S	G	S	G	S	G	T	D	F	T	L	T	I	S	S	L	Q	P															
	*			*		*	*	*	*		*															*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*														
Kabat#	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	A	B	C	D	E	F	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	SEQ ID No:																							
huK1	E	D	F	A	T	Y	I	C	Q	Q	Y	N	S	L	P																																											
mu7D9	E	D	L	A	V	I	F	C	H	Q	Y	L	S	S																																												
7D9.v1	E	D	F	A	T	Y	I	C	H	Q	Y	L	S	S																																												
7D9.v3	E	D	F	A	T	I	F	C	H	Q	Y	L	S	S																																												
	*					*																																																				

Фіг. 4

А Поеднання варіабельних ділянок важкого ланцюга (мишаче і гуманізоване 7D9)



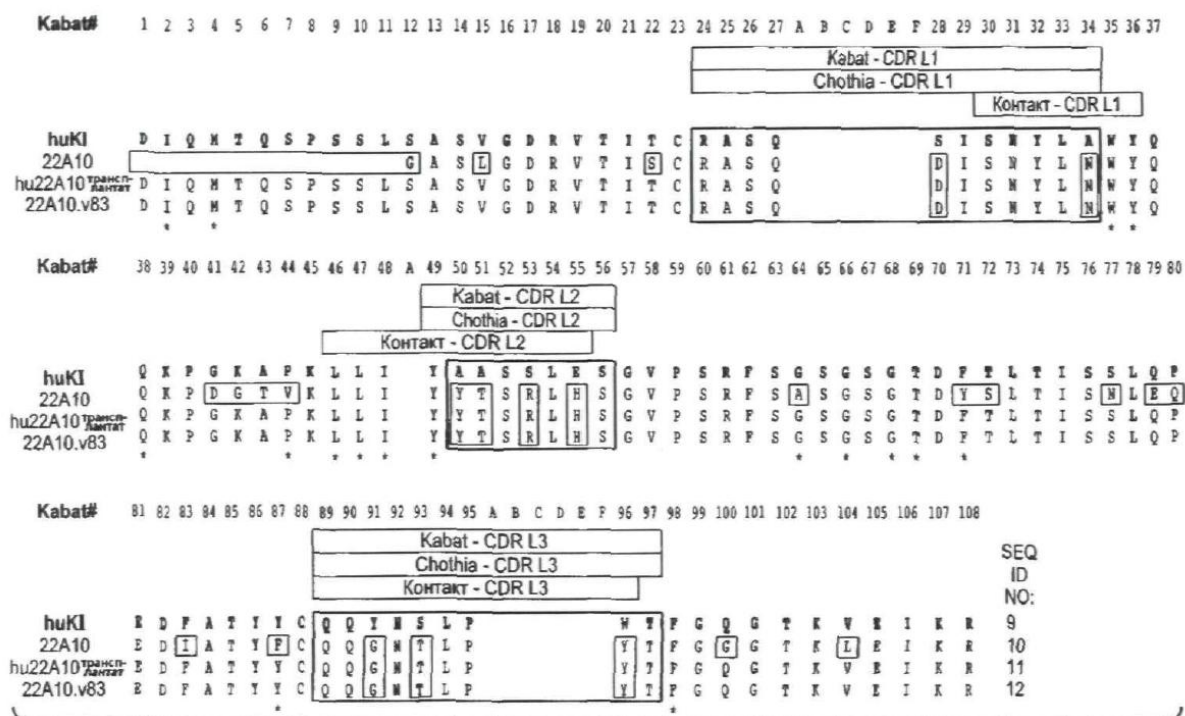
Фіг. 5

Химерні і гуманізовані варіанти 7D9

	LC	HC	KD (нМ) відносно MSLN людини
Химерне 7D9	Химерна	Химерна	1.84
7D9.v1	V _{KI} трансплантат	VH _{ATA} трансплантат	3.98
7D9.v2	Y36F, Y87F	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S и L80M	1.78
7D9.v3	Y36F, Y87F	VH _{ATA} трансплантат	1.9
7D9.v4	V _{KI} трансплантат	V48I, F67A, I69L, K75S, N76S и L80M	3.01
7D9.v5	Y36F	VH _{ATA} трансплантат	3.49
7D9.v6	Y87F	VH _{ATA} трансплантат	4.08

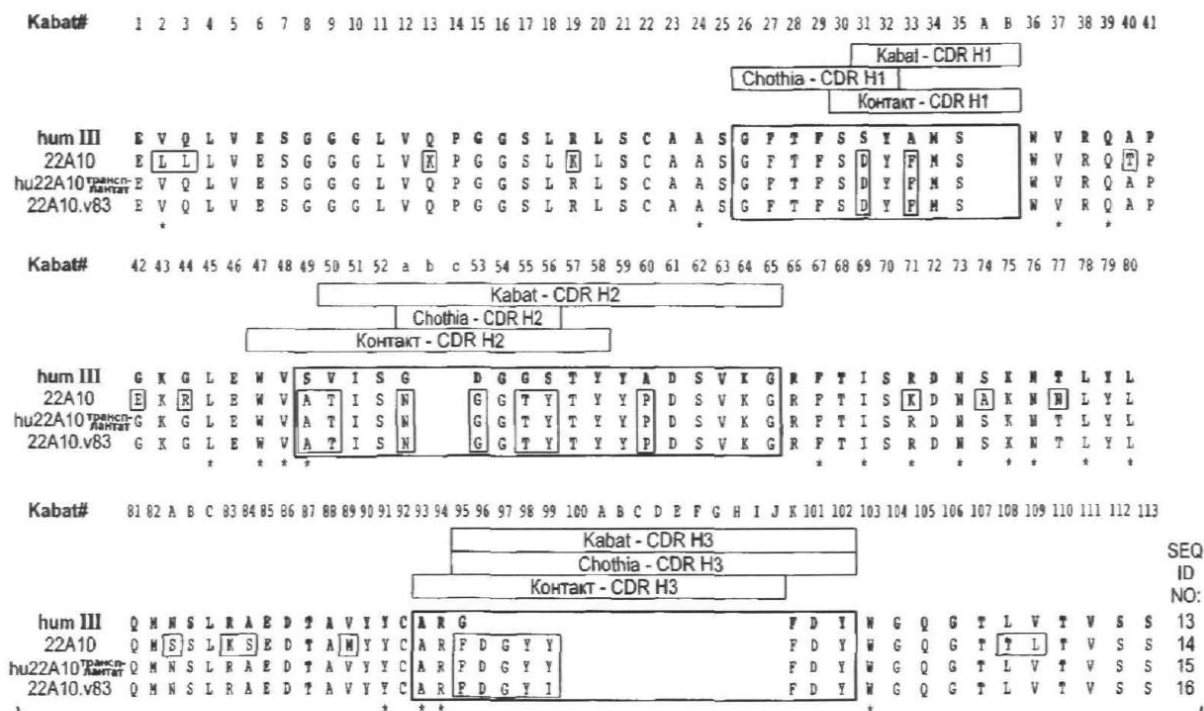
Фіг. 6

Посадження варіабельних ділянок легкого ланцюга (мишаче і гуманізоване 22A10)



Фіг. 7

Посадження варіабельних ділянок важкого ланцюга (мишаче і гуманізоване 22A10)

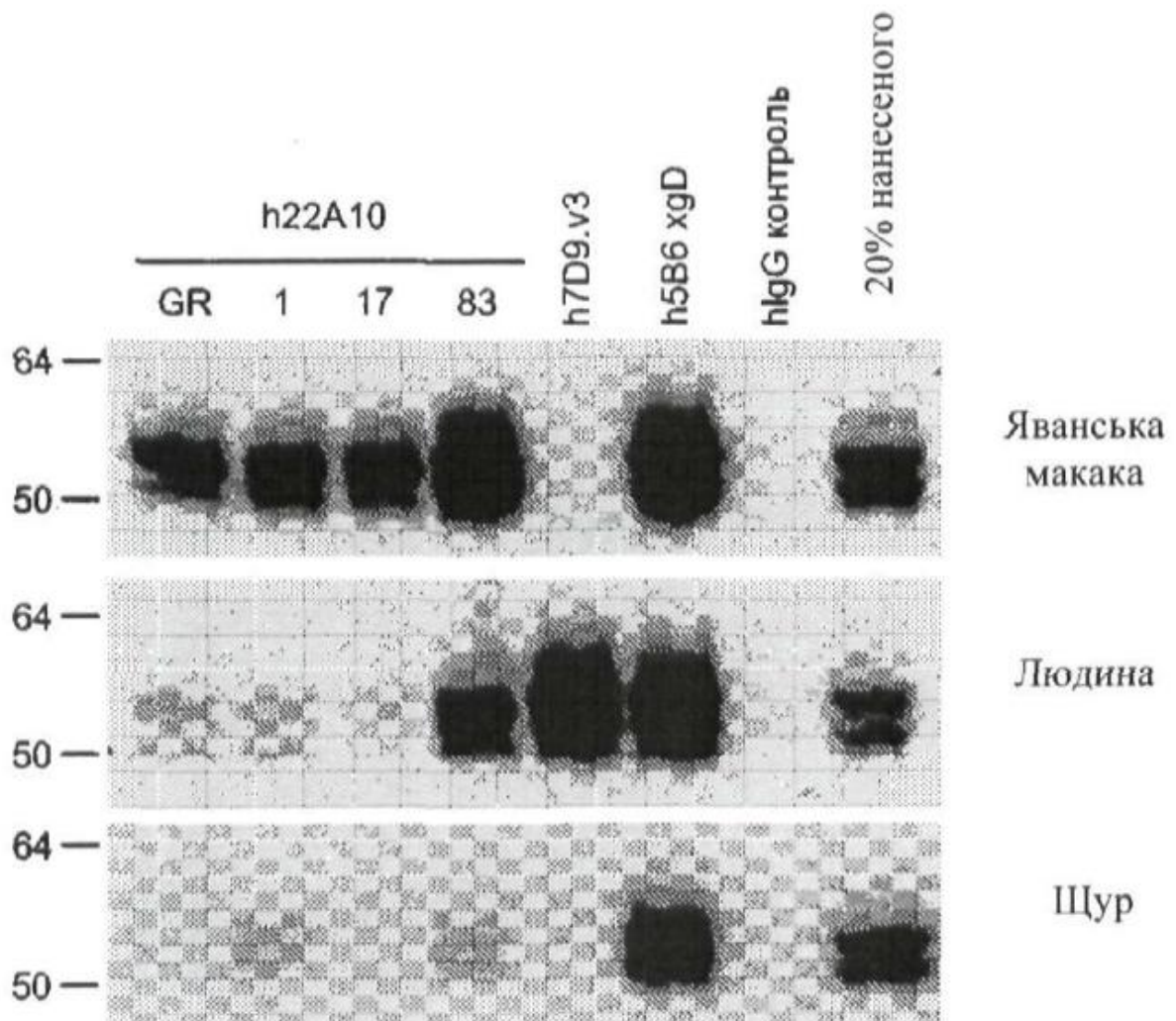


Фіг. 8

Аналіз Скетчарда гуманізованих варіантів 22A10 на стабільних клітинах ВЈАВ, трансфікованих gD-мезотеліном

Приєднані до			Яванська макака		Яванська макака+людина		Яванська макака	
версія h22A10	Трансплантат нМ	Сайти трансплантата	v1 нМ	v1 сайти	v17 нМ	v17 сайти	v83 нМ	v83 сайти
ВЈАВ яванської макаки	1.0	25000	1.0	21000	1.0	25000	1.3	45000
ВЈАВ людини	1.6	18000	1.9	16000	1.7	17000	1.8	31000
ВЈАВ щура	1.9	22400	2.8	15000	3.9	24000	2.7	31000

Фіг. 9А



Фіг. 9В

Ділянка гуманізованого антитіла 7D9	Послідовність	SEQ ID NO:
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L1	KSSQSVLYSSNQKNYLA	17
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L2	WASTRES	18
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-L3	HQYLSSYT	19
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H1	GYTFTTYWMH	20
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H2	GYIRPSTGYTEYNQKFKD	21
h7D9.v1, h7D9.v3 HVR-H3	ARSRWLLDY	22
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h7D9.v1 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h7D9.v3 VL-FR2	WFQQKPGKAPKLLIY	25
h7D9.v1 VL-FR3	GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	26
h7D9.v3 VL-FR3	GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYFC	27
h7D9.v1, h7D9.v3 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC	31
h7D9.v1, h7D9.v3 VH-FR4	WGQGTLLTVS	32

Fig. 10A

Ділянка гуманізованого антитіла 22A10	Послідовність	SEQ ID NO:
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 HVR-L1	RASQDISNYLN	33
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v.83 HVR-L2	YTSRLHS	34
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v.83 HVR-L3	QQGNTLPYT	35
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v.83 HVR-H1	GFTFSDYFMS	36
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v.83 HVR-H2	ATISNGGTYTYYPDSVKG	37
h22A10 <small>транс-плантат</small> HVR-H3	ARFDGYIFYDY	38
h22A10.v.83 HVR-H3	ARFDGYIFYDY	39
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VL-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITC	23
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VL-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	24
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VL-FR3	GVPSRFGSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	26
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VL-FR4	FGQGTKVEIKR	28
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VH-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	29
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VH-FR2	WVRQAPGKGLEWV	30
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VH-FR3	RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC	40
h22A10 <small>транс-плантат</small> h22A10.v83 VH-FR4	WGQGTLLTVSS	41

Fig. 10B

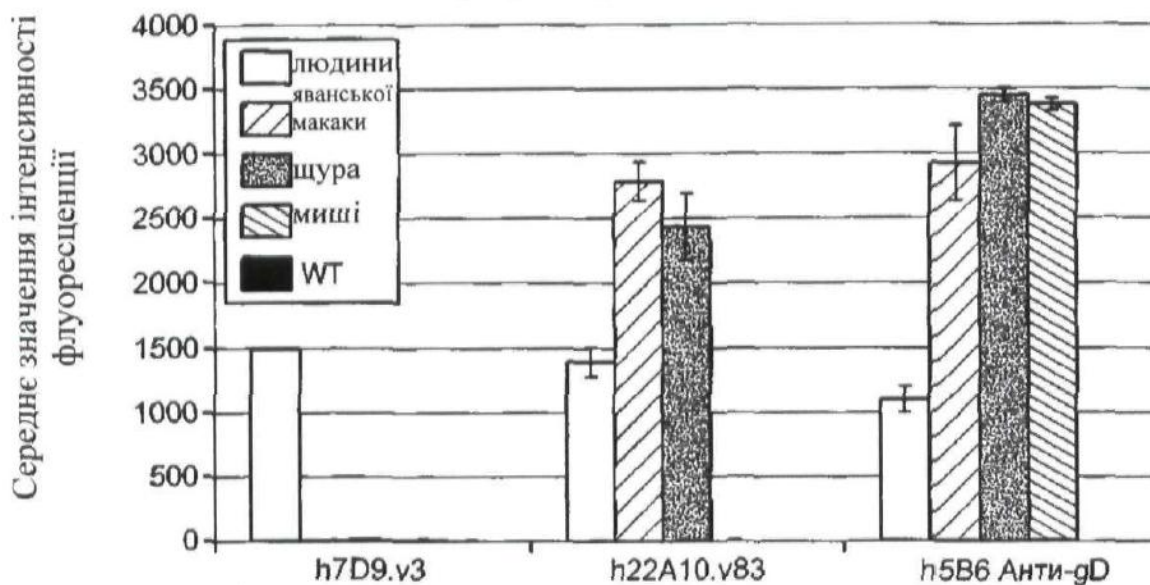
Гомологія послідовності мезотеліну серед різних видів

Людина 1	E V E K T A C P S G K K A R E I D E S L I F Y K K W E L E A C V D A A L L A T Q M D R V N A I P F T	50
Шимпанзе-яванська макака 1	D V E R T T C P P E K E V H E I D E N L I F Y K K R E L E A C V D A A L L A A Q M D R V D A I P F T	50
Щур 1	D T E Q K A C P P G K E P N V V D E N L I F Y Q N W E L E A C V D G T L L A G Q M D L V N E I P F T	50
Миша 1	D A E Q K A C P P G K E P Y K V D E D L I F Y Q N W E L E A C V D G T M L A R Q M D L V N E I P F T	50
↕		
Людина 51	Y E Q L D V L K H K L D E L Y P Q G Y P E S V I Q H L G Y L F L K M S P E D I R K W N V T S L E T L	100
Шимпанзе-яванська макака 51	Y E Q L D V L K H K L D E L Y P Q G Y P E S V I R H L G H L F L K M S P E D I R K W N V T S L E T L	100
Щур 51	Y E Q L S I F K H K L D K T Y P Q G Y P E S L I K Q L G H F F R Y V S P E D I R Q W N V T S P D T V	100
Миша 51	Y E Q L S I F K H K L D K T Y P Q G Y P E S L I Q Q L G H F F R Y V S P E D I H Q W N V T S P D T V	100
↕		
Людина 101	K A L L E V N K G H E M S P Q V A T L I D R F V K G R G Q L D K D T L D T L T A F Y P G Y L C S L S	150
Шимпанзе-яванська макака 101	K A L L K V S K G H E M S A Q V A T L I D R V V V G R G Q L D K D T V D T L T A F C P G C L C S L S	150
Щур 101	N T L L K V S K G Q K M D A Q V I A L V A C Y L R G G G K L D E D I V K A L D N I P L S Y L C D F S	150
Миша 101	K T L L K V S K G Q K M N A Q A I A L V A C Y L R G G G Q L D E D M V K A L G D I P L S Y L C D F S	150
↕		
Людина 151	P E E L S S V P P S I W A V R P Q D L D T C D P R Q L D V L Y P K A R L A F Q N M N G S E Y F V K	200
Шимпанзе-яванська макака 151	P E R L S S V P P S V I G A V R P Q D L D T C G P R Q L D V L Y P K A R L A F Q N M N G S E Y F V K	200
Щур 151	P Q D L H A I P S S V M W L V G L H D L D K C S Q R H L G I L Y Q K A C S A F Q N V S G L E Y F E K	200
Миша 151	P Q D L H S V P S S V M W L V G P Q D L D K C S Q R H L G L Y Q K A C S A F Q N V S G L E Y F E K	200
↕		
Людина 201	I Q S F L G G A P T E D L K A L S Q Q N V S M D L A T F M K L R T D A V L P L T V A E V Q K L L G P	250
Шимпанзе-яванська макака 201	I R P F L G G A P T E D L K A L S Q Q N V S M D L A T F M K L R R E A V L P L T V A E V Q K L L G P	250
Щур 201	I R T F L G G A S R E D L R A L S Q H N V S M D I A T F K K L Q V D A L V G L S V A E V Q K L L G P	250
Миша 201	I K T F L G G A S V K D L R A L S Q H N V S M D I A T F K R L Q V D S L V G L S V A E V Q K L L G P	250
↕		
Людина 251	H V E G L K A E E R H R F V R D W I L R Q R Q D D L D T L G L G L Q G	285
Шимпанзе-яванська макака 251	H V E G L K V E E Q H S F V R D W I L K Q R Q D D L D T L G L G L Q G	285
Щур 251	H I G D L K T E E D K S P V R D W L F R Q Q Q K D L D S L G L G L Q G	285
Миша 251	N I V D L K T E E D K S P V R D W L F R Q Q H Q K D L D R L G L G L Q G	285

↕ N-глікозилювання
 ↕ Консервативна/різна

Фіг. 11

Перехресна реактивність h7D9.v3 і h22A10.v83



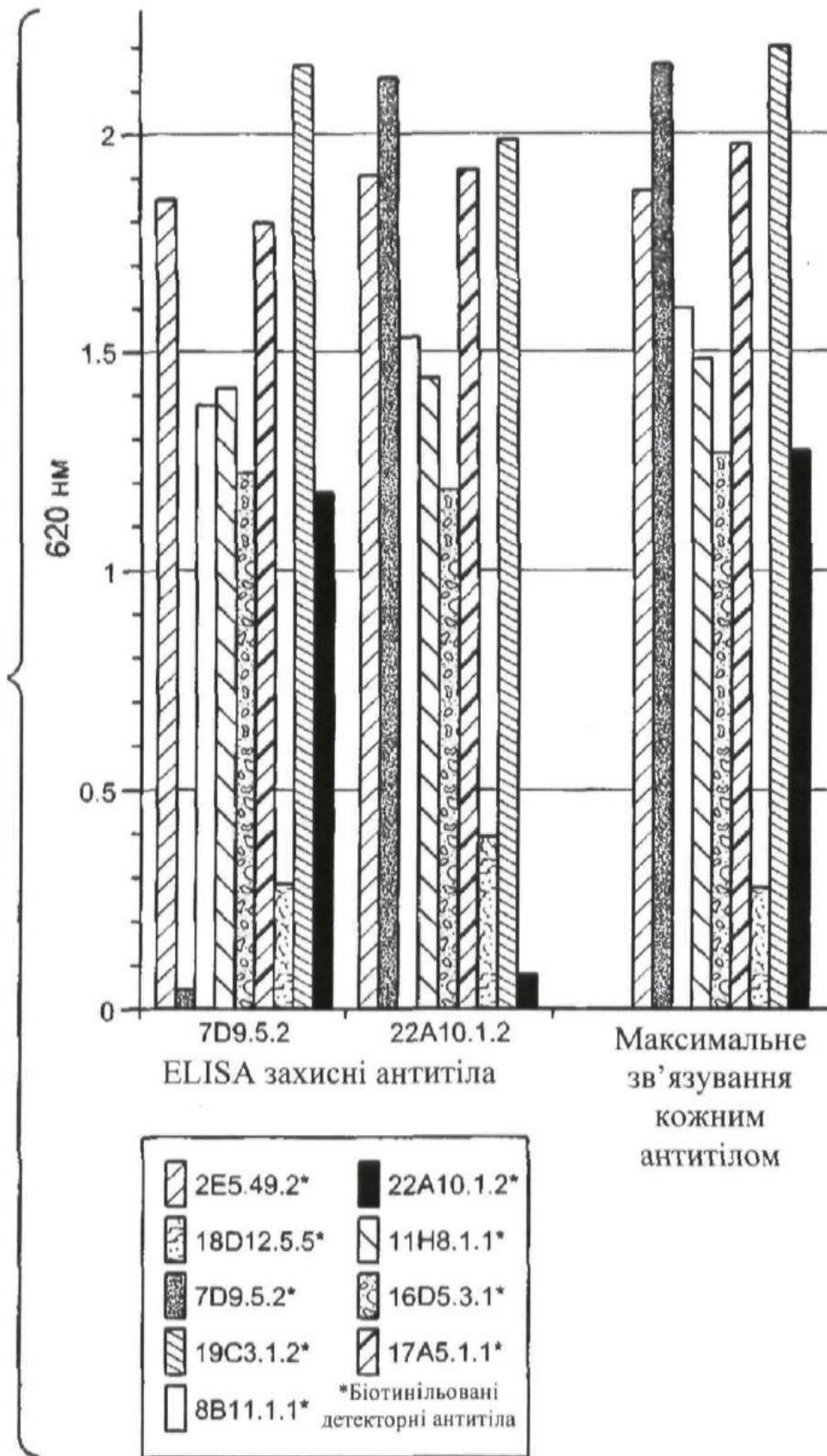
Фіг. 12

Афінність антитіла проти мезотеліну
Аналіз Скетчарда на клітинних лініях із стабільно трансфікованим і
ендогенним мезотеліном

	h7D9.v3 Kd (нМ)	Число копій	h22A10.v83 Kd (нМ)	Число копій
ВІАВ людини	0.25	20000	1.8	45000
ВІАВ яванської макаки	Не визначено		1.3	31000
ВІАВ щура	Не визначено		2.7	31000
293 людини	0.2	Не визначено	2.7	80500
293 яванської макаки	Не визначено		4.3	356000
293 щура	Не визначено		7.3	81000
НТ 1080 людини	0.97	130000	6.2	38000
НТ 1080 яванської макаки	Не визначено		6.4	113000
4/4-RM4 щура	Не визначено		6.2	171000
ОvCar3	0.53	14178	9.2	5516
ОvCar3x2.1	0.56	39963	9	15294
HPAC	1	2600	9.4	7300
Capan2	0.63	10000	4.2	11250
AsPC1	0.58	2300	9.3	7100
HPAF-II	0.41	4200	10.45	6400

Ендогенний

Фіг. 13



Фіг. 14

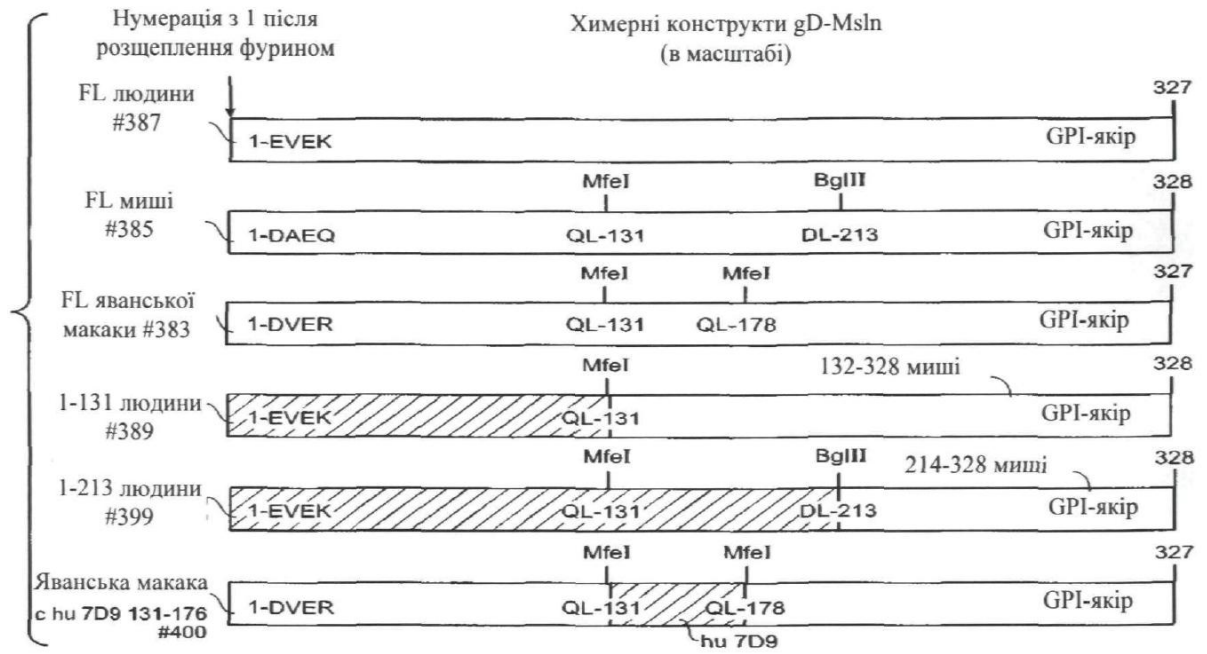
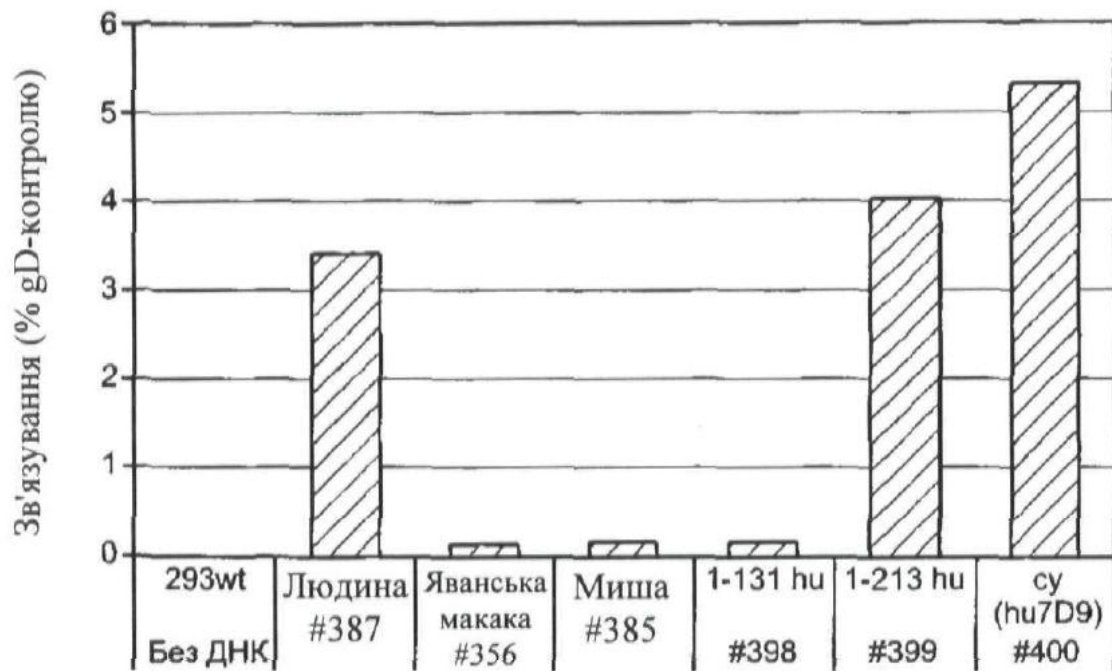


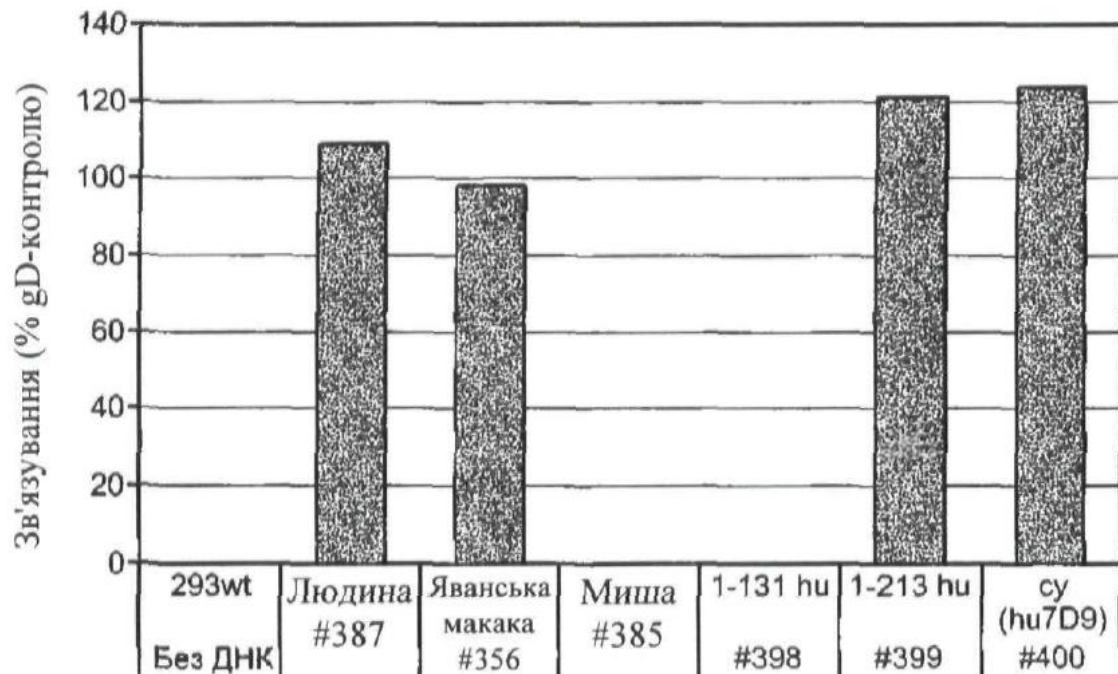
Fig. 15

FACS 7D9 і 22A10 на клітинах, які експресують химерний мезотелін

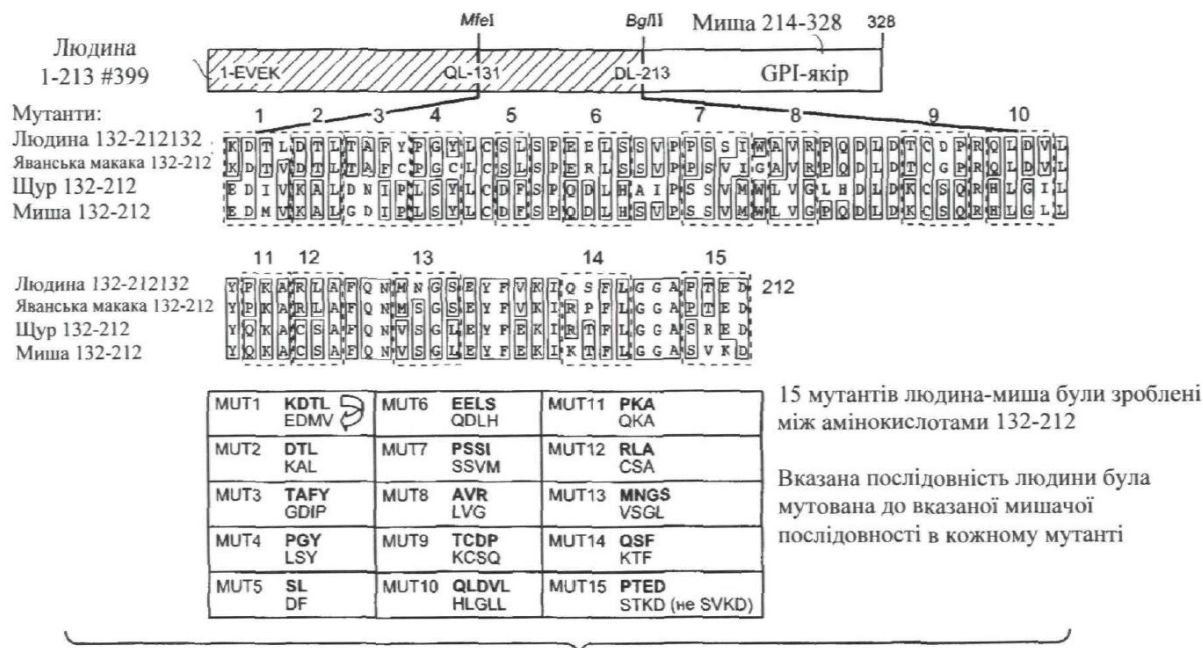
Зв'язування 0,02 мкг/мл m7D9



Зв'язування 1 мкг/мл m22A10

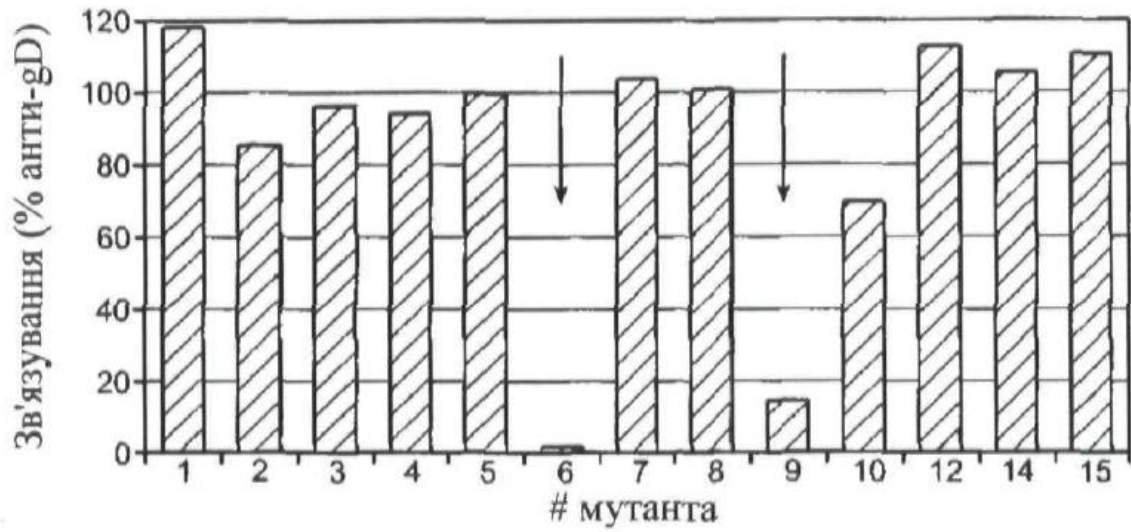


Фіг. 16

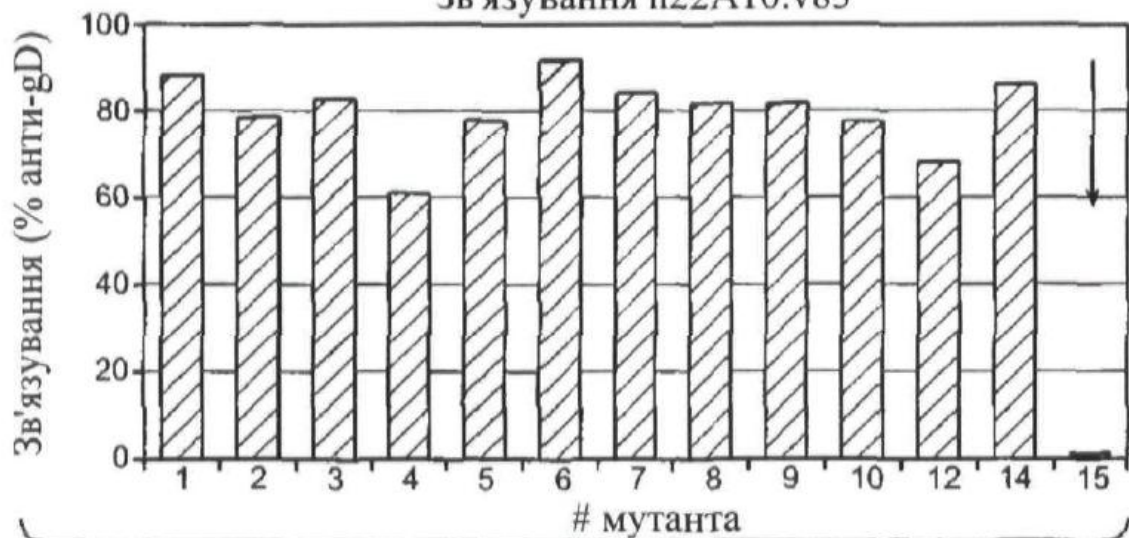


Фіг. 17

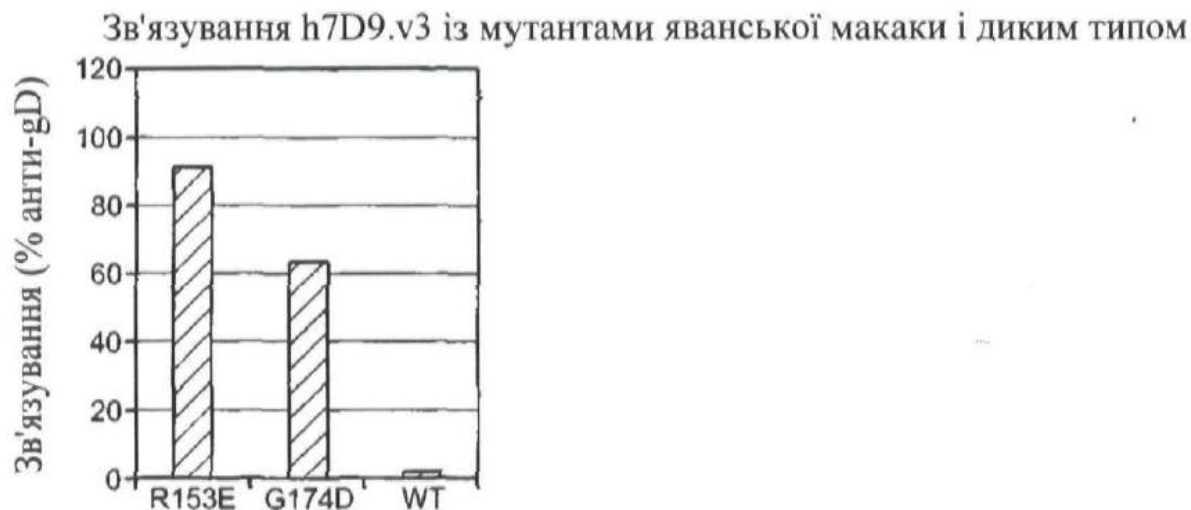
Сканування епітопів мутантних 7D9 і 22A10 із
побудовою карт точної настройки FACS
Зв'язування h7D9.v3



Зв'язування h22A10.v83

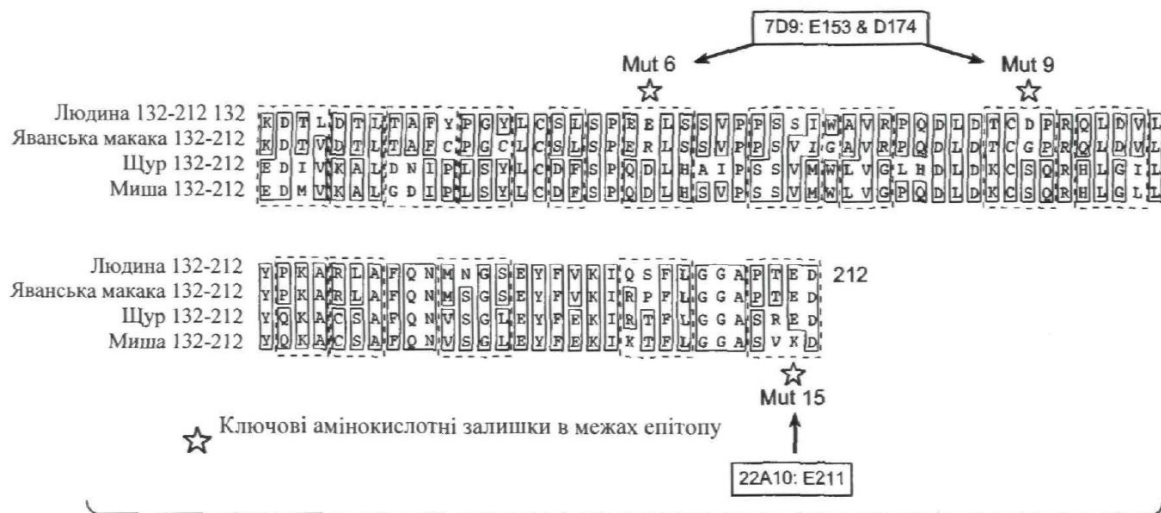


Фіг. 18А

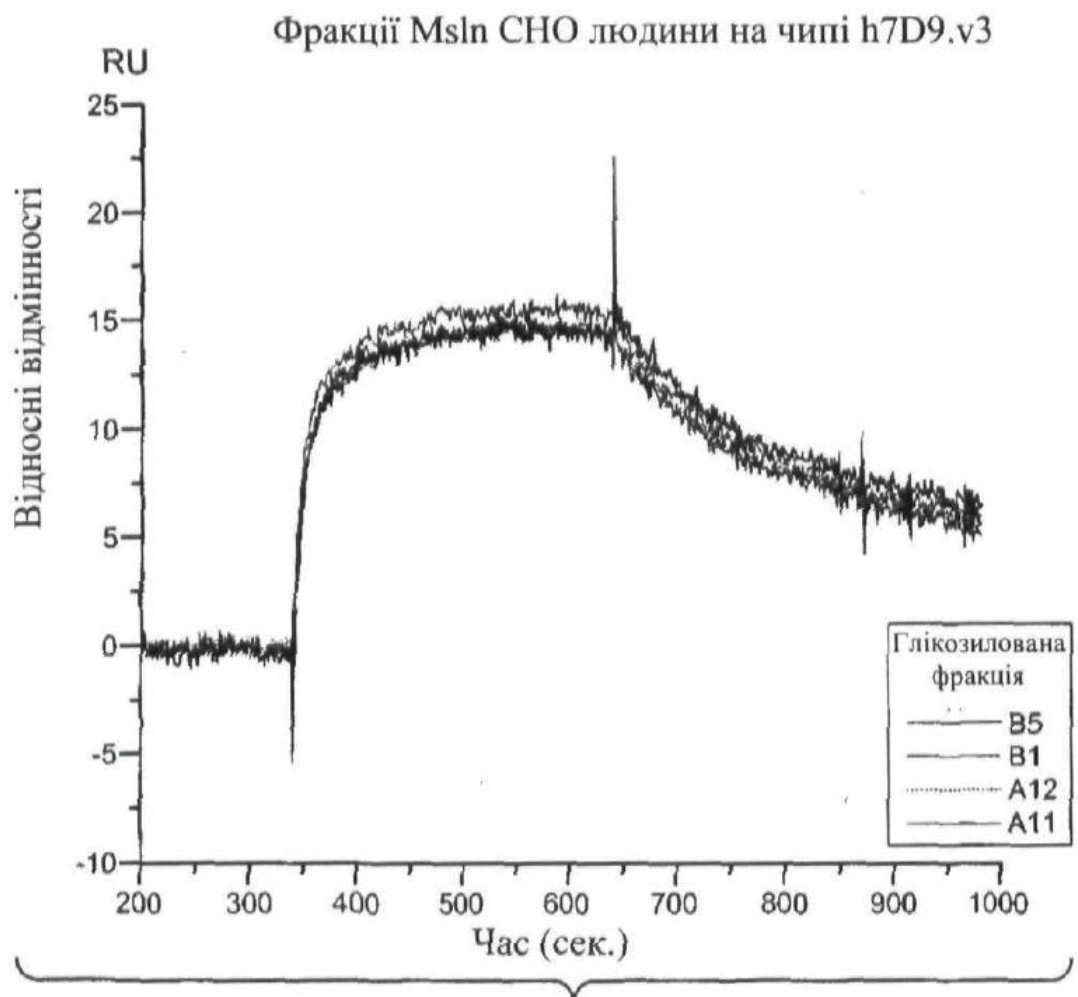
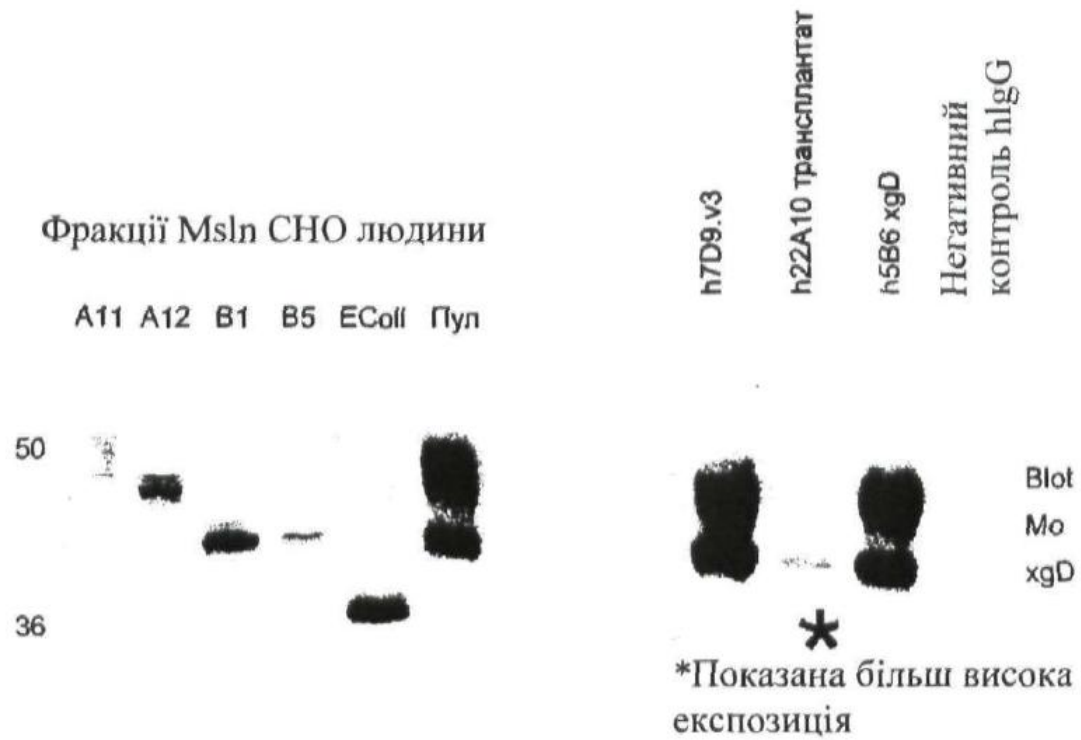


Фіг. 18В

Епітопи 7D9 і 22A10, картовані на різних сайтах

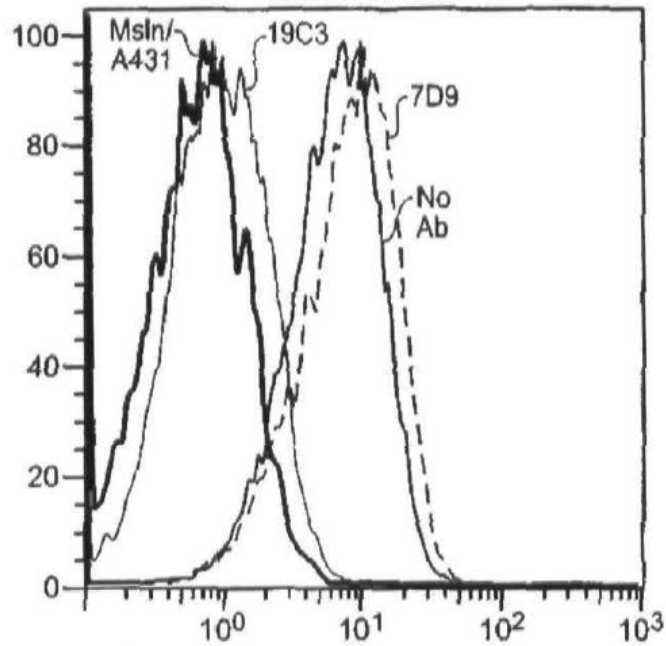


Фіг. 19



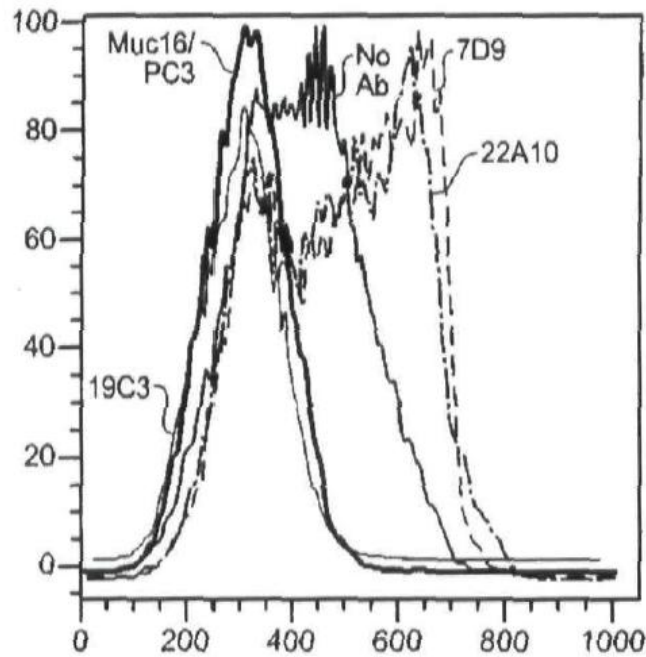
Фіг. 20

19C3, але не 7D9 або 22A10,
блокує взаємодію
Muc16:Msln



Зв'язування Muc16-bt із Msln клітин

- Конкурує із 19C3
- Але не з 7D9 (або із Ab, що не має до цього взаємодії)



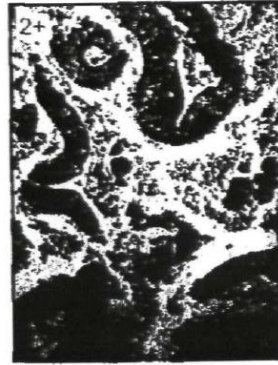
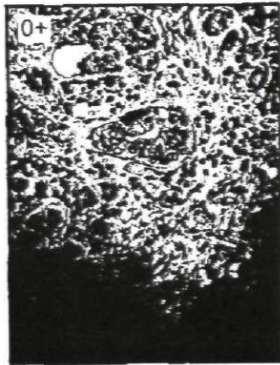
Зв'язування Msln-his8 із Muc16 клітин

- Конкурує з 19C3
- Посилюється дією 7D9, 22A10

Фіг. 21

ІНС мезотеліну в протоковій аденокарциномі підшлункової залози(PDAC)

	Бали ІНС			
	0+	1+	2+	3+
PDAC (N=76)	30%	37%	24%	9%

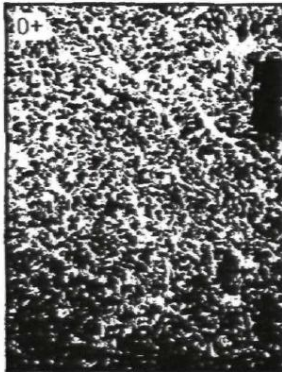


Позитивні 70% PDAC, 33%>2+

Фіг. 22

ІНС мезотеліну в пухлинах яєчника

	Бали ІНС			
	0+	1+	2+	3+
Серозна аденокарцинома (N=43)	2%	23%	44%	30%

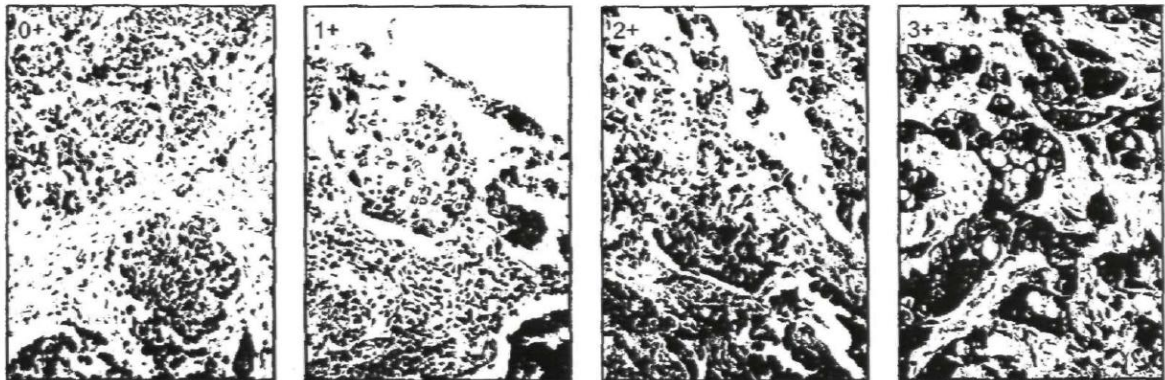


Позитивні 98% серозних, 74%>2+. 8/8 відповідало позитивним по мезотеліну метастазам серозних пухлин

Фіг. 23

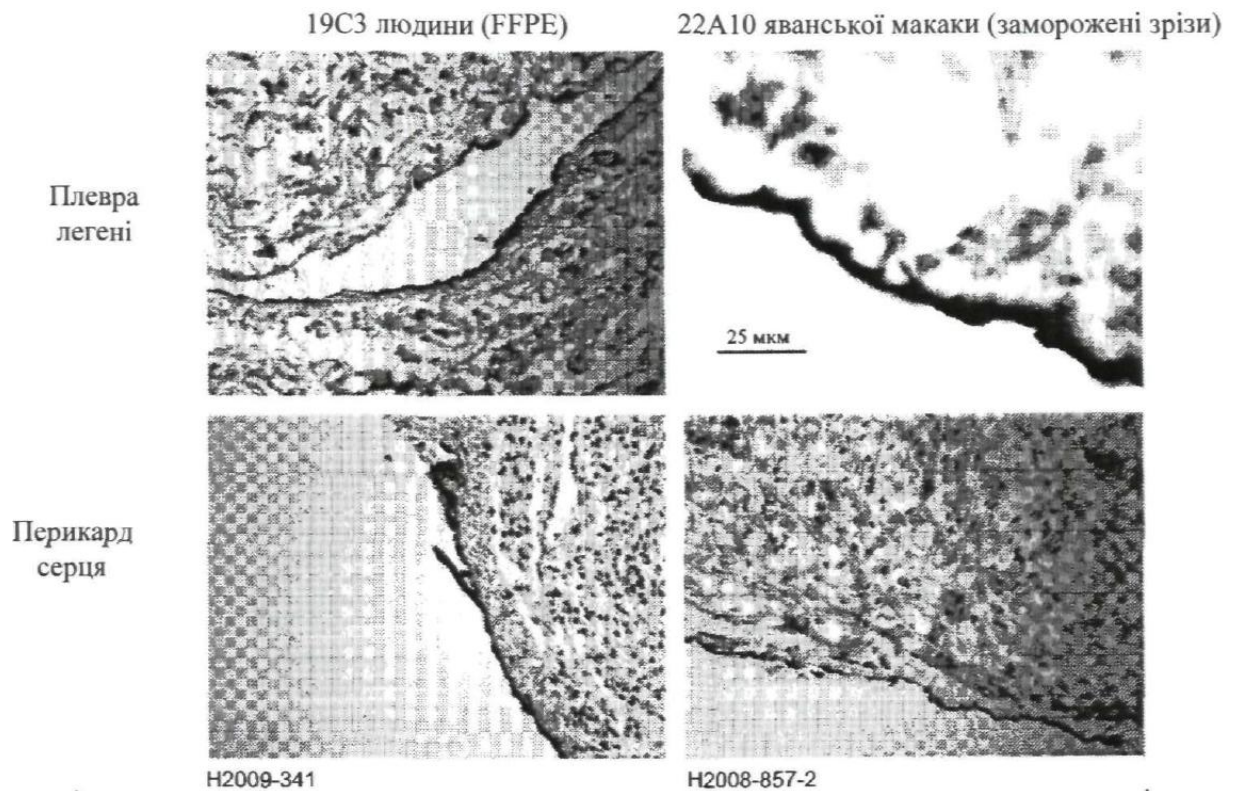
ІНС мезотеліну в аденокарциномі NSCLC

	Бали ІНС			
	0+	1+	2+	3+
NSCLC (N=77)	56%	18%	16%	10%



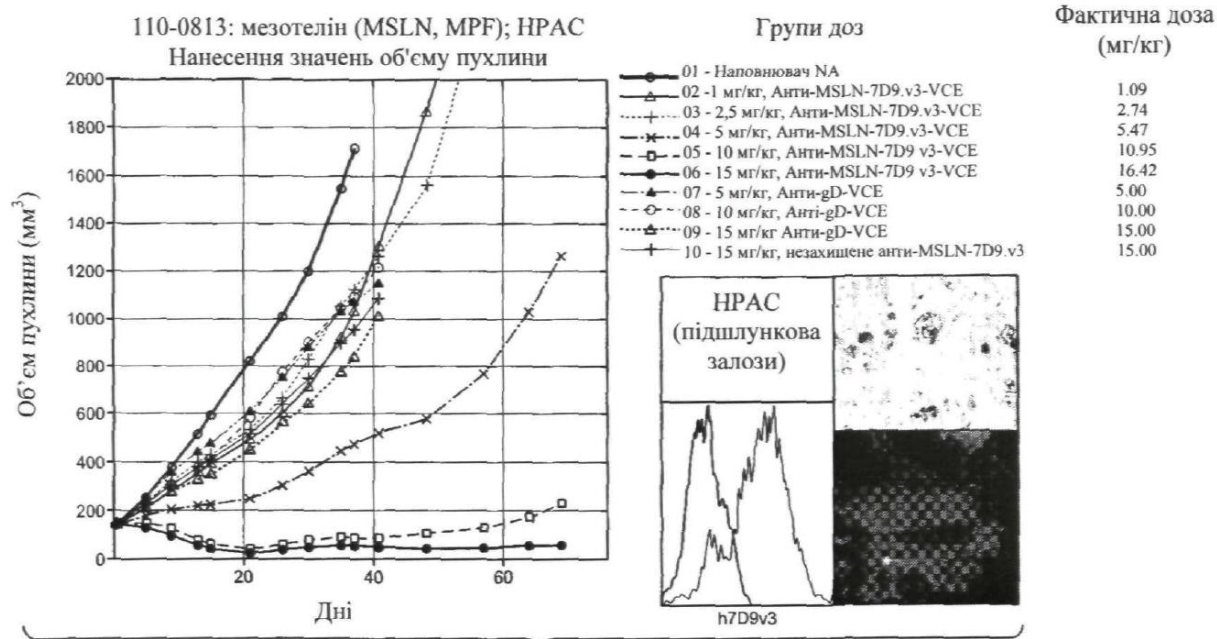
44% позитивних NSCLC, 26% >2+, 3/8 (38%) відповідало позитивним по мезотеліну метастазам

Фіг. 24



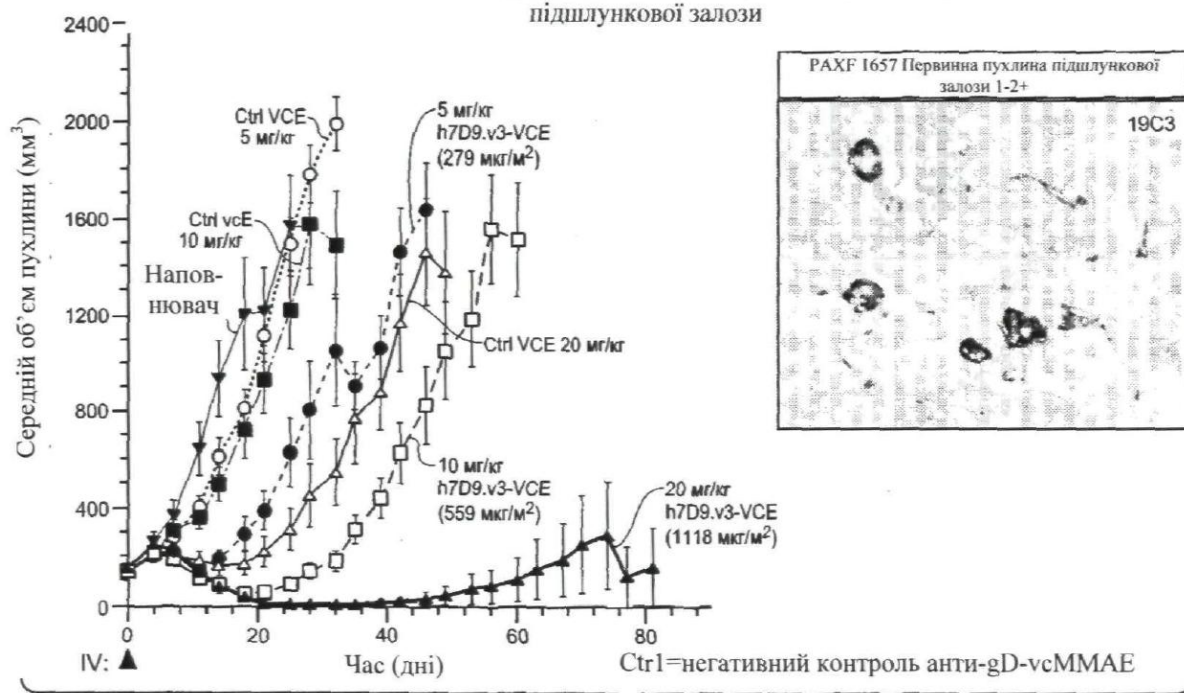
Фіг. 25

h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність в ксенотрансплантаті НРАС підшлункової залози



Фіг. 26

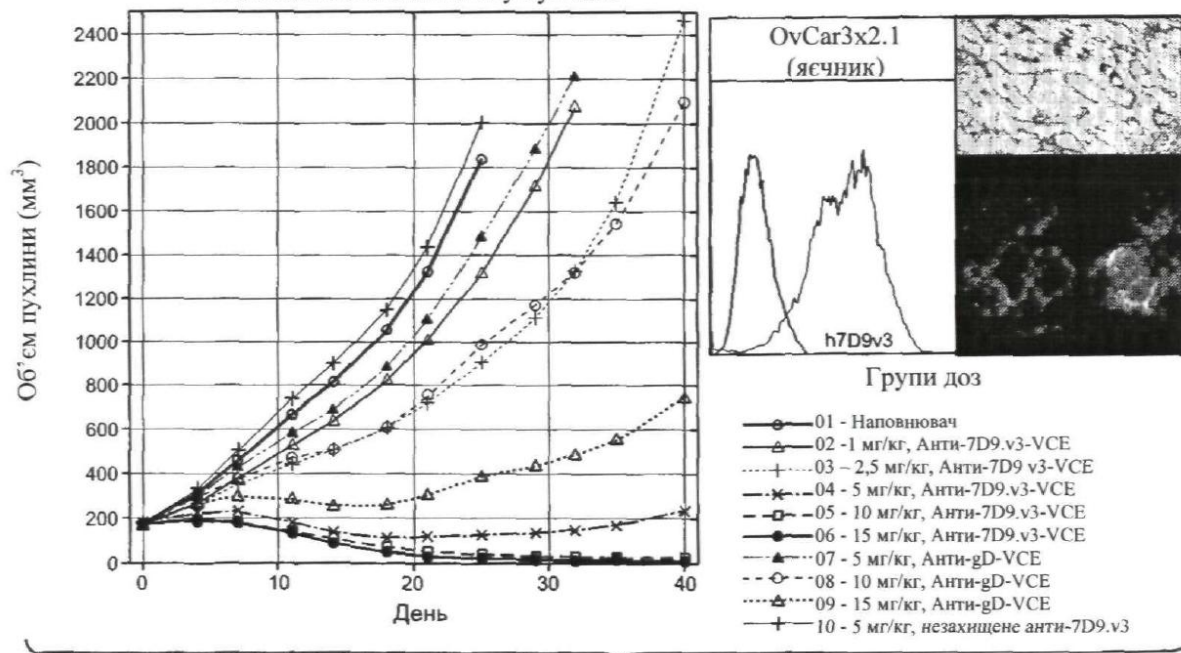
h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність в первинному ксенотрансплантаті підшлункової залози



Фіг. 27

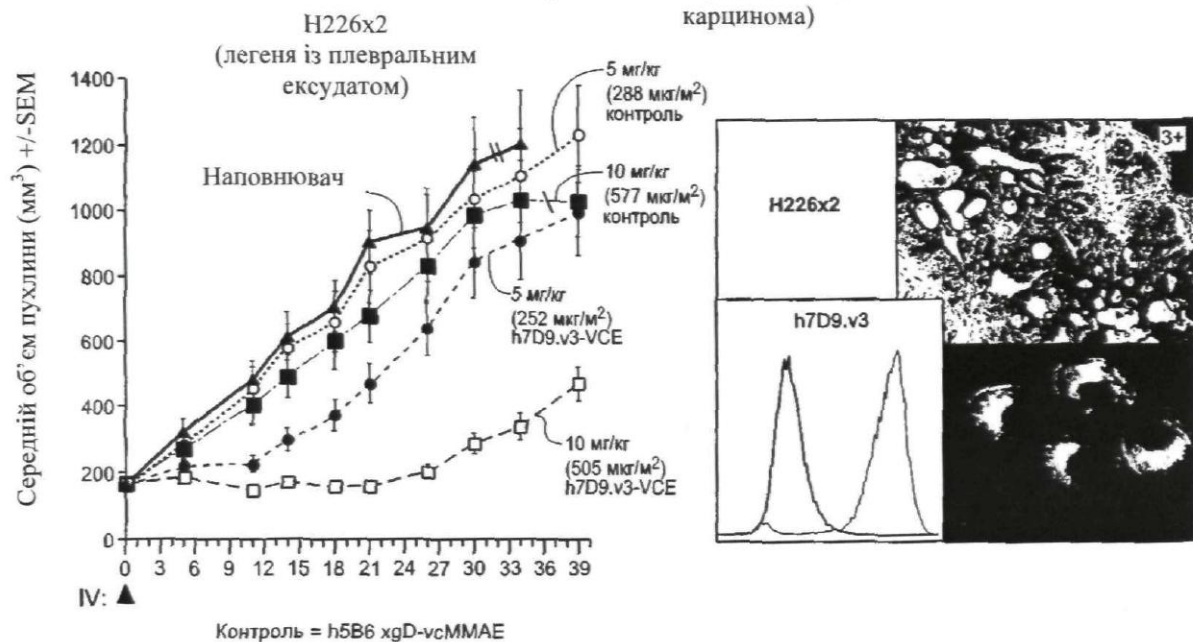
h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність в моделі ксенотрансплантата яєчника
10-0813 C: мезотелін (MSLN, MPF); OvCar3x2.1

Нанесення значень об'єму пухлини



Фіг. 28

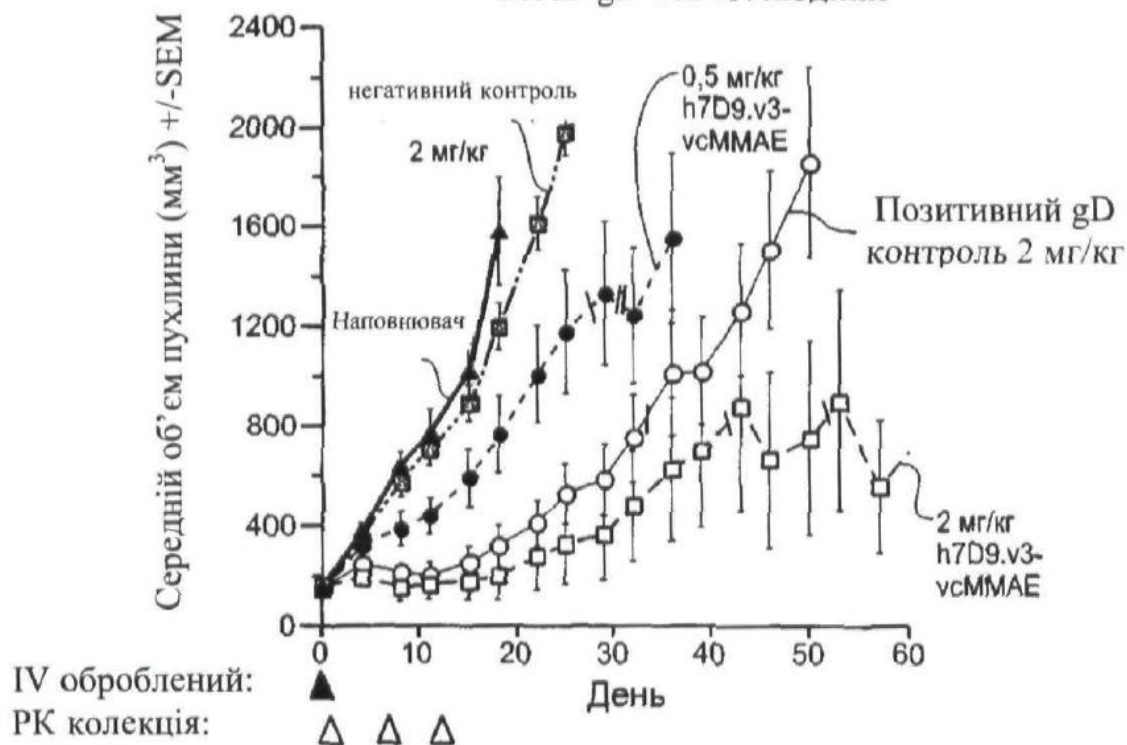
h7D9.v3-vcMMAE демонструє ефективність у моделі
ксенотрансплантата раку легені (плоскоклітинна
карцинома)



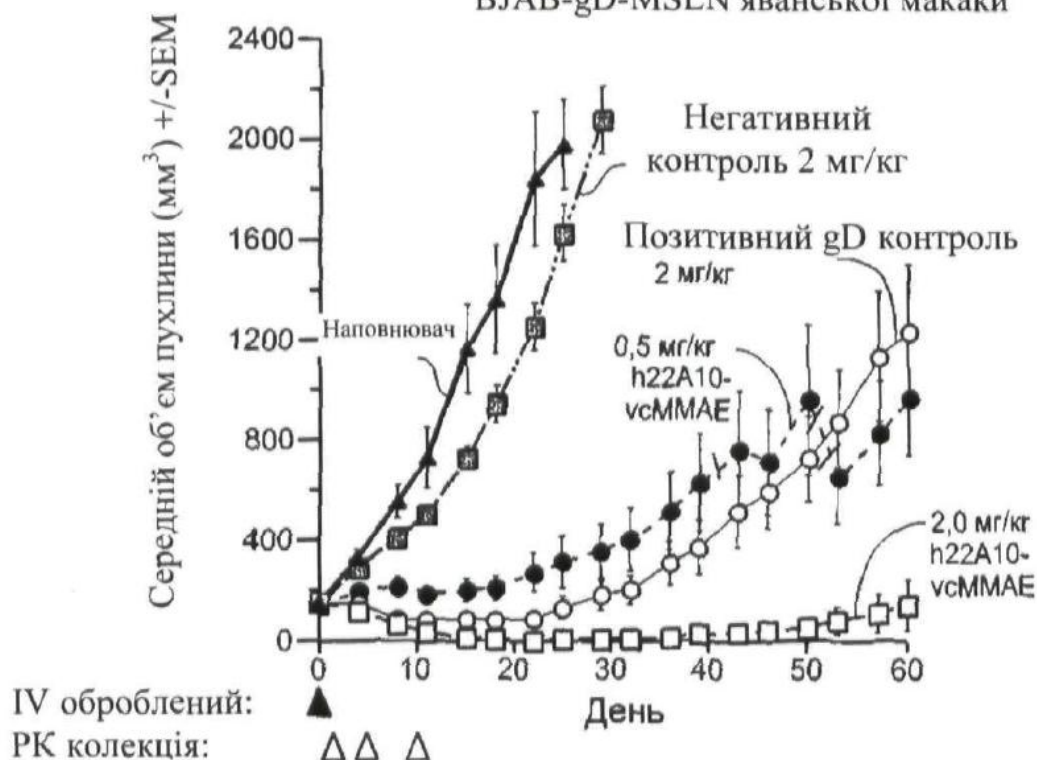
Фіг. 29

Ефективність h7D9.v3-vcMMAE подібна h22A10-vcMMAE

BJAB-gD-MSLN людини

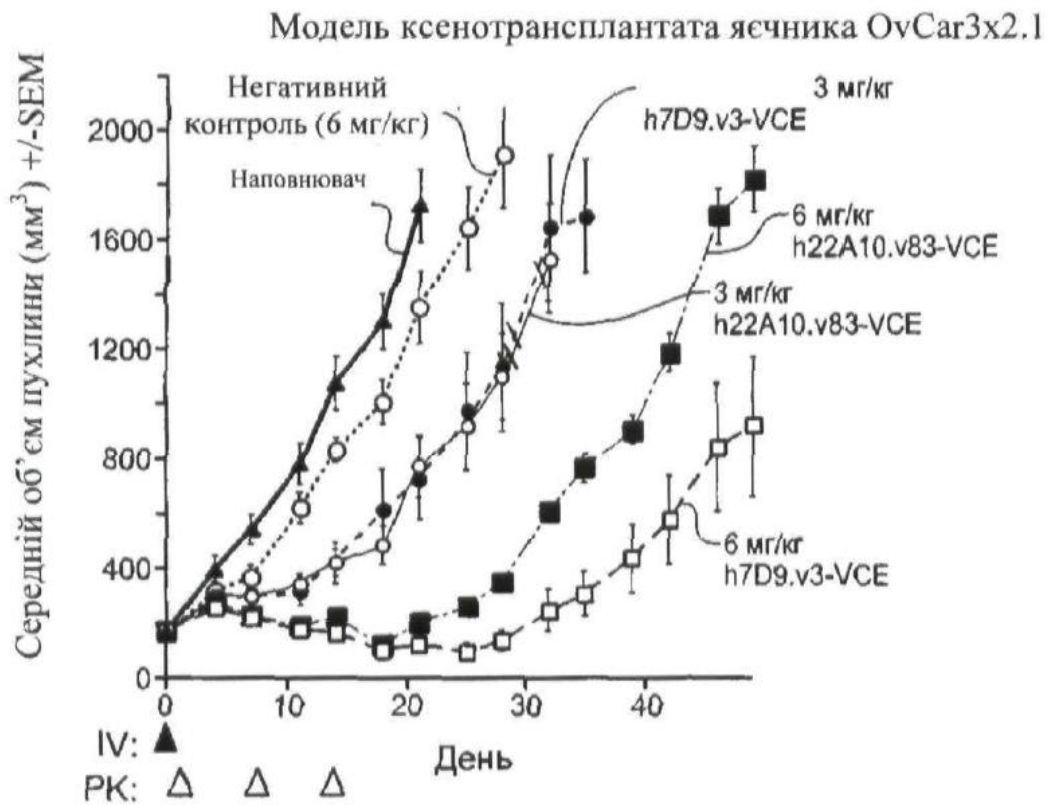
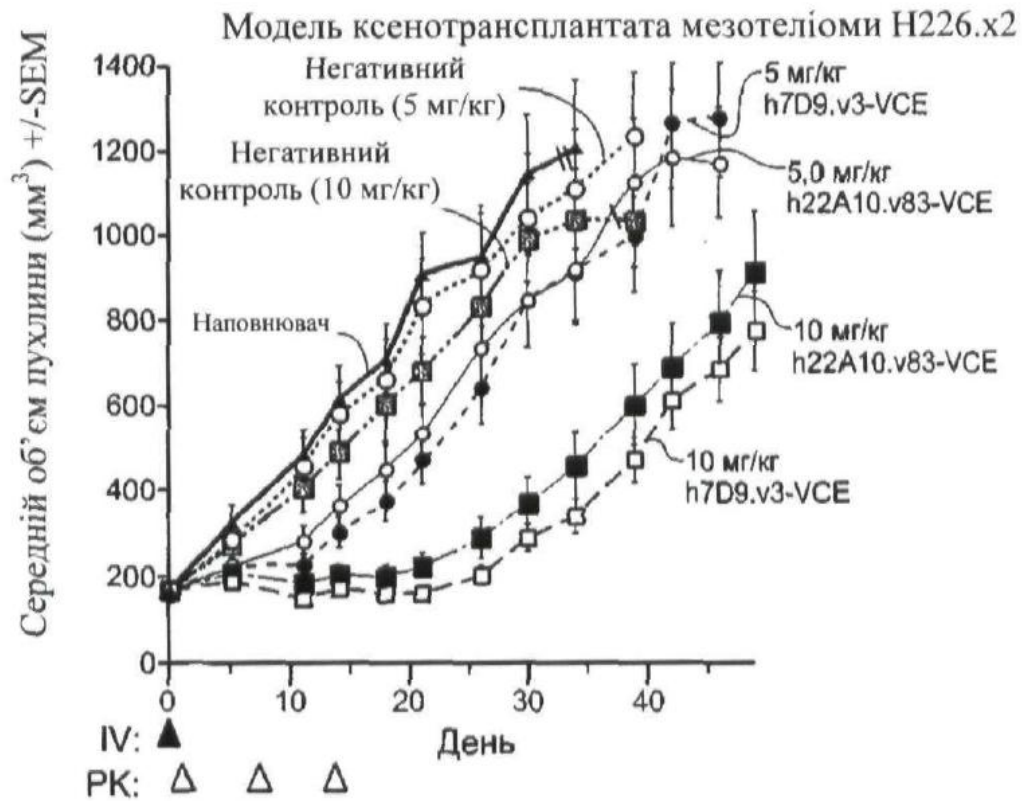


BJAB-gD-MSLN яванської макаки



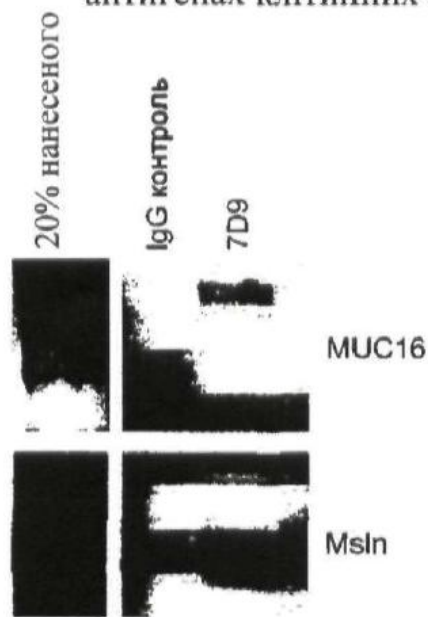
Фіг. 30

Ефективність h7D9.v3-vcMMAE подібна h22A10-vcMMAE

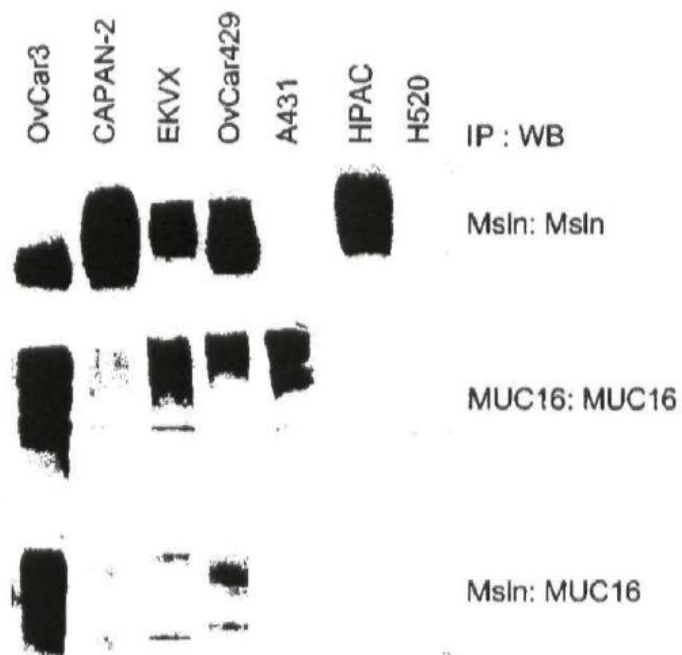


Фіг. 31

MUC16 утворює комплекс із мезотеліном, і два білки виділяються з позитивних по двох антигенах клітинних ліній

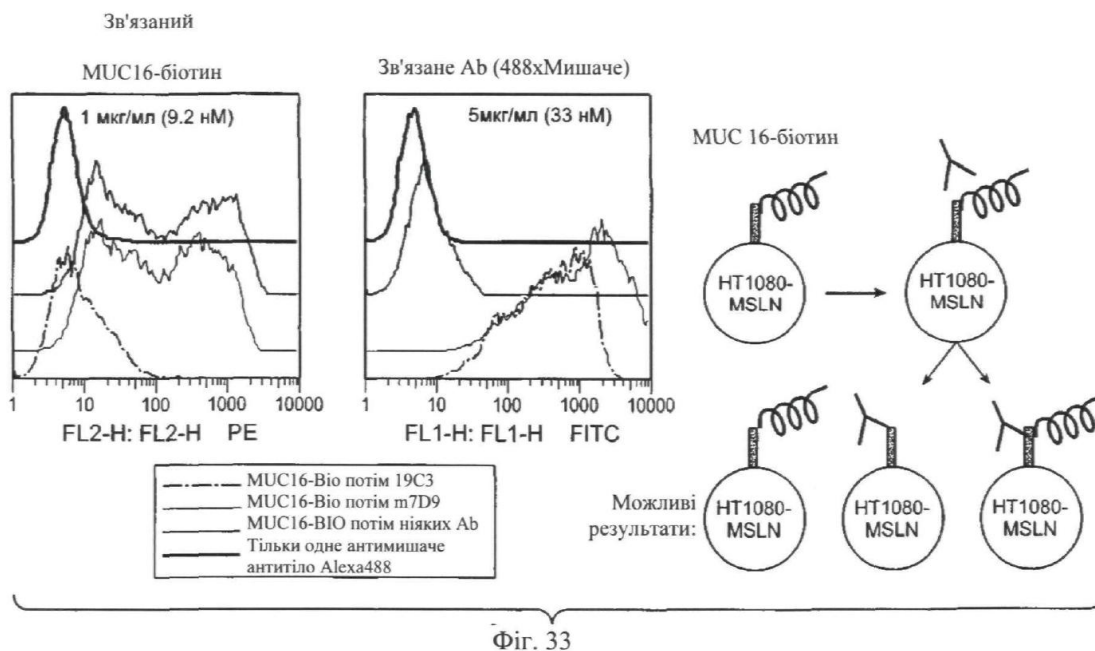


MUC16 імунопреципітує разом із Msln в клітинних лізатах OvCar3



Кондиціоновані середовища демонструють спільну імунопреципітацію Msln із MUC16 тільки із ліній, які експресують обидва білки

Фіг. 32



Комп'ютерна верстка Г. Паяльніков

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601