



Oficio N° 18722 de 29 de noviembre de 2021

Ref. Expediente N° NC2019/0013020

<p>“A” Documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.</p> <p>“E” Solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.</p> <p>“L” Documento citado para llamar la atención sobre por ejemplo, dudas acerca de una reivindicación de prioridad o para determinar la fecha de publicación de otro cita, siempre van acompañados de una explicación, por la cual se citan.</p> <p>“O” Documento del tipo actos de confidencia, este tipo de documentos siempre estará acompañado por otra letra que indique la pertinencia del documento, por ejemplo, O,X, O,Y o bien O,A.</p> <p>“P” Documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.</p>	<p>“T” Documento publicado en fecha posterior a la de presentación o la de prioridad de la solicitud internacional y no entra en conflicto con dicha solicitud, pero puede ser útil para la mejor comprensión del principio o teoría en que se basa la invención, o para demostrar que el razonamiento o los hechos en los que se basa dicha invención son incorrectos.</p> <p>“X” Documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento sistemáticamente considerado.</p> <p>“Y” Documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.</p>
Fecha del reporte de búsqueda: 08/11/2021	
Examinador: PAULA ANDREA MORENO GONZALEZ	



Notice of Reasons for Refusal

Application number: Japanese Patent Application No. 2021-002874
Date of Drafting: Reiwa 4(2022) January 28
Patent examiner: TAMAI, Makoto 1585 Four B00
Representative/Applicant: ISHIBASHI, Koki (other binary name)
Applied Provisions: Article 29 (2) (Inventive Step) Article 36 (4) (i) (Enablement Requirement) Article 36 (6) (i) (Support Requirement)

<<<< Notification of Reason(s) for Refusal including Reason(s) based on Patent Act Article 50bis >>>>

This application should be refused for the reason mentioned below. If the applicant has any opinion(s) against the reason, a written opinion should be submitted within 60 days from the date on which this notification was dispatched.

Reason

1. (Inventive step) The claimed invention(s) listed below of this patent application shall not be granted a patent under the provision of Patent Act Article 29 (2) for the reason that the claimed invention(s) could have easily been made by persons who have common knowledge in the technical field to which the claimed invention(s) pertains, on the basis of the invention(s) described in the distributed publication listed below or made available to the public through electric telecommunication lines in Japan or other foreign countries prior to the filing of the patent application.
2. (Enablement Requirement) This patent application does not fulfill the requirement of the provision of Patent Act Article 36(4)(i) in terms of the item(s) listed below regarding the statement of the detailed explanation of the invention.
3. (Support Requirement) This patent application does not fulfill the requirement of the provision of Patent Act Article 36(6)(i) in terms of the item(s) listed below regarding the statement of the scope of claims.

Note (For the cited documents, please refer to the list of cited documents below.)

- Reason 1 (Inventive step)

- Claims 1, 4, 6, 7, and 14-22
- Cited Documents, etc. 1, and 2
- Remarks

Cited Document 1 describes a conjugate in which an antibody specifically binding to an epitope of human CDC6 is conjugated to a drug via a linker (see Claim 1), and an optional therapeutic or diagnostic agent is used as a drug (see [00110]).

Cited Document 2 describes an antibody-drug conjugate between an antineoplastic compound and an anti-TROP 2 antibody, wherein the anti-tumor compound has the structure indicated in [Chemical Formula 1] (see Claim 1). In addition, cited document 2 also describes an embodiment in which an antineoplastic compound is conjugated to a sulfhydryl group of an anti-TROP 2 antibody via a linker. It is described to react with an antineoplastic compound having the structure shown in the upper part of [Chemical Formula 31] to an antibody having a reduced disulfide bond (refer to the 14,15, [0245 in Example]). In addition, Cited Document 2 describes that, in addition to the Anti-TROP 2 antibody, hRS 7 antibody is conjugated with an antineoplastic compound (see Reference Example 18).

Here, the compound shown in the upper part of [Chemical Formula 31] of Cited Document 2 has the same structure as the compound described in [Chemical Formula 1] of Claim 1 of the present application.

Cited Document 1 does not describe that the structure described in Claim 1 of Claim 1 is used as a linker and a drug, and is different from the invention according to Claim 1 of the present application. However, Cited Document 1 describes that an arbitrary therapeutic agent can be used as a drug, and the antitumor compound having the structure shown in [Chemical Formula 1] of Claim 1 of the present application was publicly known at the time of filing the present application, as described in Cited Document 2. Consequently, it could have been easily conceived by a person skilled in the art to use the invention described in Cited Document 2 as a linker and drug to be coupled when preparing a conjugate based on the description in Cited Document 1.

Subsequently, the effects exerted by the present invention will be discussed below. It is confirmed in the Description of the present application that an antibody specifically binding to EC 3 of CDC6 exhibits high endogenous activity and cytotoxic activity (Example 6), and it is recognized that this effect is an advantageous effect on the descriptions of Cited Documents 1 and 2. However, since the invention according to Claim 1 of the present application includes an embodiment of binding a pharmaceutical agent to an arbitrary ANTI-CD6 antibody, the invention according to Claim 1 of the present application, which covers also a conjugate that does not specifically bind to EC 3 of CDC6, is generally used throughout the invention. It is not recognized that a particularly remarkable effect cannot be predicted from the advantageous effects on the inventions described in Cited Documents 1 and 2. In view of the common general technical knowledge that the binding activity of an antibody is determined by a combination of 6 CDR sequences, the inventions according to Claims 4 and 7 of the present application are described in the Claims. Since it is recognized that it includes a conjugate not specifically binding to EC 3 of CDC6, the inventions according to Claims 4 and 7 of the present application cannot be considered to achieve a particularly remarkable effect that cannot be predicted from the descriptions in Cited Documents 1 and 2.

Hence, the inventions according to Claims 22, and of the present application are

inventions which could have been easily conceived by a person skilled in the art based on the inventions described in Cited documents 1 and 2. 1,4,6,7,14 .

- Reason 2 (Enablement Requirement) , Reason 3 (Support Requirement)

- Claims 4, 6, 7, and 14-22

The invention according to Claim 4, as the 3 CDRs of a light chain variable region, as one of the CDRs of rB 019 antibody, rG 055 antibody, rG 056 antibody, and rG 061 antibody, as one CDR of a heavy chain variable region, and 3 CDRs of a heavy chain variable region. An antibody containing a CDR of an rG 019 antibody, rG 055 antibody, Rg 056 antibody, Rg 061 antibody or CHg 019 antibody or a functional fragment of the antibody ([0062] - [0065],[0077]) is a functional fragment of the antibody or the antibody.

However, since the binding ability of the antibody is understood to be exerted based on the appropriate combination of CDRs, an antibody comprising various combinations of CDRs of rG 019 antibody, rG 055 antibody, rG 056 antibody, rG 061 antibody, or CHg 019 antibody is included. It is highly likely that the binding ability of "specifically binding to the amino acid sequence described in SEQ ID NO : 4" is lost, as specified in Claim 2.

Further, even if the detailed description of the invention is taken into consideration, it cannot be found that an antibody comprising various combinations of those derived from the 5 kinds of antibodies described above is specifically binding to the amino acid sequence described in SEQ ID NO : 4.

In that case, an antibody "specifically binds to the amino acid sequence described in SEQ ID NO : 4" which is constituted by including various combinations of CDRs of rG 019 antibody, Rg 055 antibody, rB 056 antibody, Rg 061 antibody, or CHg 019 antibody, which is an antibody covered by Claim 4 It is not found to be disclosed with sufficient support in the description of the detailed description of the invention.

Similarly, to obtain an antibody that "binds specifically to the amino acid sequence described in SEQ ID NO : 4" from among antibodies composed of a variety of CDRs of rG 019 antibody, Rg 055 antibody, rG 056 antibody, rG 061 antibody, or CHg 019 antibody imposes an excessive burden on a person skilled in the art.

The same applies to the invention according to Claim 7, including an antibody formed by including, as the sequence of the light chain variable region, the variable regions of hL 02 or hL 03, the sequence of the heavy chain variable region, the sequence of the heavy chain variable region of hH 01, hH 02, or hH 04, and the sequence of the heavy chain variable region of hH 1. Furthermore, the inventions according to Claims 6 and 14-22, which are dependent on Claim 4 or 7, are similar to each other.

<Claim(s) in which no reason for refusal is found>

At present, no reasons for refusal are found with respect to the inventions according to Claims 2 3 5, and 8-13. If any reason for refusal is found later, it will be notified.

<The list of cited documents etc.>

1. International Publication No. W02016/024195
2. International Publication No. W02015/098099

<Notification of Patent Act Article 50bis>

The reasons for refusal related to this notice of reasons for refusal are identical to the reasons for refusal of the reasons for refusal pertaining to the notice of reasons for refusal filed on the Reiwa 2(2020) September 29, 2019, which was filed at the same time as the present application, in the following points : (518773). Accordingly, any amendment which will be made to the claimed invention in response to this notification of reasons for refusal must fulfill the requirements under the provisions of Patent Act Article 17bis (5) and (6).

Note

Reasons for refusal of the present application

Reasons for refusal 2 and 3

- Claims 4, 6, 7, and 14-22

Reasons for refusal of Japanese Patent Application No. 2019 - 518773

Reasons for refusal 2 and 3

- Claims 3, 5, 6, 13, 14, 20-36, and 40-53

Record of the result of prior art search

- Technical fields searched:

IPC

C07K 16/00

DB name CAPlus/REGISTRY (STN)

This record of the result of prior art search does not constitute the reasons for refusal.

<Suggestions in amending>

(1) When making amendment to the description or the scope of claims, the amended parts should be underlined so as to be clearly identified (please refer to Note 6 and 7 of Form 13, Regulations under the Patent Act).

(2) Amendments must not go beyond the description, scope of claims, or drawings of the present application as originally filed. In addition, when amending the scope of claims, the amendment should be limited to deletion of the claimed invention, restriction of the scope, correction of errors, and clarification of ambiguous statements (i.e., only those specified in the notification of reasons for refusal). In addition, for the evidence of the legality of each amendment, it is advisable to

allege the legality in a written opinion with clear indication of the corresponding parts in the original description, claims and drawings.

(3) One should make sure not to perform any corrections that invoke a violation against Patent Act Article 17-2(4) when amending the scope of claims.

If you have any question or are willing to make an interview with the examiner to discuss issues on this notification of reasons for refusal, please contact us at: When sending of a draft amendment etc. is wished by E-mail etc., please inform me of that by telephone.

Third Examination Department biotechnology Masato Tamai (** now thing)
TEL.03-3581-1101 Extension 3448

A Director(p.p.), an examiner, assistant examiner NIIDOME, Yutaka, TAMAI, Makoto, and
9639 1585

P.1

拒絶理由通知書

特許出願の番号	特願2021-002874
起案日	令和4年1月28日
特許庁審査官	玉井 真人 1585 4B00
特許出願人代理人	石橋 公樹（ほか2名）様
適用条文	第29条第2項（進歩性） 第36条第4項第1号（実施可能要件） 第36条第6項第1号（サポート要件）

<<<< 特許法第50条の2の通知を伴う拒絶理由通知 >>>>

この出願は、次の理由によって拒絶をすべきものです。これについて意見がありましたら、この通知書の発送の日から60日以内に意見書を提出してください。

理由

- 1.（進歩性）この出願の下記の請求項に係る発明は、その出願前に日本国内又は外国において、頒布された下記に刊行物に記載された発明又は電気通信回線を通じて公衆に利用可能となった発明に基いて、その出願前にその発明の属する技術の分野における通常の知識を有する者が容易に発明をすることができたものであるから、特許法第29条第2項の規定により特許を受けることができない。
- 2.（実施可能要件）この出願は、発明の詳細な説明の記載が下記の点で、特許法第36条第4項第1号に規定する要件を満たしていない。
- 3.（サポート要件）この出願は、特許請求の範囲の記載が下記の点で、特許法第36条第6項第1号に規定する要件を満たしていない。

記 （引用文献等については引用文献等一覧参照）

●理由1（進歩性）について

- ・請求項 1、4、6、7、14-22
- ・引用文献等 1、2
- ・備考

P.2

引用文献1には、ヒトCDH6のエピトープに特異的に結合する抗体が、リンカーを介して薬物と結合したコンジュゲートが記載されており（請求項1参照）、薬物としては、任意の治療剤又は診断剤が用いられること（[00110]参照）が記載されている。

引用文献2には、抗腫瘍性化合物と抗TROP2抗体との抗体-薬物コンジュゲートであって、抗腫瘍性化合物が、[化1]で示される構造を有するコンジュゲートが記載されている（請求項1参照）。また、引用文献2には、抗腫瘍性化合物を、リンカーを介して抗TROP2抗体のスルフヒドリル基に結合する態様も記載されており、ジスルフィド結合を還元した抗体に、[化31]の上段に示された構造を有する抗腫瘍性化合物を反応させることが記載されている（実施例14、15、[0245]参照）。加えて、引用文献2には、抗TROP2抗体以外にも、hRS7抗体を抗腫瘍性化合物とコンジュゲートさせたことも記載されている（参考例18参照）。

ここで、引用文献2の[化31]の上段に示された化合物は、本願請求項1の[化1]で示された化合物と同一の構造を有している。

引用文献1には、リンカー及び薬物として本願請求項1の[化1]で示される構造のものをを用いることは記載されておらず、この点で本願請求項1に係る発明と相違する。

しかしながら、引用文献1には、薬物としては任意の治療剤を用いることができると記載されているし、引用文献2に記載のとおり、本願請求項1の[化1]で示される構造の抗腫瘍性化合物は、本願出願時に公知であった。

そうすると、引用文献1の記載に基づいてコンジュゲートを作製するにあたり、結合させるリンカー及び薬物として、引用文献2で記載されたものをを用いることは、当業者が容易になし得たことである。

続いて、本願発明の奏する効果について検討する。本願明細書には、CDH6のEC3に特異的に結合する抗体が、高い内在活性及び細胞障害活性を示すことが確認されており（実施例6）、これは引用文献1、2の記載に対して有利な効果であると認められる。

しかしながら、本願請求項1に係る発明には、任意の抗CDH6抗体に薬剤を結合させる態様が包含されているから、CDH6のEC3に特異的に結合しないコンジュゲートをも包含する本願請求項1に係る発明が、その全般にわたって、引用文献1、2に記載の発明に対する有利な効果から予測できない格別顕著な効果を奏するとは認められない。

また、抗体の結合活性は6つのCDR配列の組み合わせによって決定されるという技術常識に鑑みると、本願請求項4、7に係る発明は、CDH6のEC3に特異的に結合しないコンジュゲートを包含していると認められるから、本願請求

P.3

項4、7に係る発明も、同様に、引用文献1、2の記載から予測できない格別顕著な効果を奏するとはいえない。

よって、本願請求項1、4、6、7、14-22に係る発明は、引用文献1、2に記載の発明に基づいて、当業者が容易に想到し得た発明である。

●理由2（実施可能要件）、理由3（サポート要件）について

・請求項 4、6、7、14-22

請求項4に係る発明は、軽鎖可変領域の3つのCDRとして、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体又はrG061抗体のいずれかのCDR、重鎖可変領域の3つのCDRとして、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体、rG061抗体又はchG019抗体のいずれかのCDRを含む抗体又は当該抗体の機能性断片である（[0062]-[0065]、[0077]）。

しかし、抗体の結合能はCDRの適切な組み合わせに基づき発揮されるものと解されることから、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体、rG061抗体又はchG019抗体のCDRを多様な組み合わせで含んで構成される抗体は、その大部分が請求項2で特定された「配列番号4に記載のアミノ酸配列に特異的に結合」という結合能を喪失する蓋然性が高い。

また、発明の詳細な説明の記載を参酌しても、重鎖可変領域、軽鎖可変領域それぞれのCDRとして、上記の5種類の抗体に由来するものを様々な組み合わせで含む抗体が、いずれも配列番号4に記載のアミノ酸配列に特異的に結合するものとは認められない。

そうすると、請求項4に包含されている抗体である、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体、rG061抗体又はchG019抗体のCDRを多様な組み合わせで含んで構成された「配列番号4に記載のアミノ酸配列に特異的に結合」する抗体については、発明の詳細な説明の記載において十分な裏付けを伴って開示されているものとは認められない。

同様に、rG019抗体、rG055抗体、rG056抗体、rG061抗体又はchG019抗体のCDRを多様な組み合わせで含んで構成された抗体の中から、「配列番号4に記載のアミノ酸配列に特異的に結合」する抗体を取得することは、当業者に過度の負担を課すものである。

軽鎖可変領域の配列として、hL02又はhL03の可変領域の配列、重鎖可

P.4
変領域の配列として h H 0 1、h H 0 2 又は h H 0 4 の重鎖可変領域の配列を様々な組み合わせで含んで構成される抗体を含む、請求項 7 に係る発明も同様である。

また、請求項 4 又は 7 を引用する、請求項 6、1 4-2 2 に係る発明も同様である。

＜拒絶の理由を発見しない請求項＞

請求項 2、3、5、8-1 3 に係る発明については、現時点では、拒絶の理由を発見しない。拒絶の理由が新たに発見された場合には拒絶の理由が通知される。

＜引用文献等一覧＞

1. 国際公開第 2 0 1 6 / 0 2 4 1 9 5 号
2. 国際公開第 2 0 1 5 / 0 9 8 0 9 9 号

＜特許法第 5 0 条の 2 の通知＞

この拒絶理由通知に係る拒絶の理由は、下記の点で、本願と同時に出願されたこととなっている特願 2 0 1 9-5 1 8 7 7 3 号の令和 2 年 9 月 2 9 日付けでされた拒絶理由通知に係る拒絶の理由と同一である。

したがって、この拒絶理由通知に対して行う特許請求の範囲の補正は、同法第 1 7 条の 2 第 5 項及び第 6 項に規定されている要件を満たさなければならない。

記

本願の拒絶の理由

- ・拒絶の理由 2、3
- ・請求項 4、6、7、1 4-2 2

特願 2 0 1 9-5 1 8 7 7 3 号の拒絶の理由

- ・拒絶の理由 2、3
- ・請求項 3、5、6、1 3、1 4、2 0-3 6、4 0-5 3

＜先行技術文献調査結果の記録＞

- ・調査した分野 I P C C 0 7 K 1 6 / 0 0
D B 名 C A P l u s / R E G I S T R Y (S T N)

この先行技術文献調査結果の記録は拒絶理由を構成するものではありません。

P.5

＜補正をする際の注意＞

（１）明細書、特許請求の範囲について補正をする場合は、補正により記載を変更した個所に下線を引いてください（特許法施行規則様式第１３備考６、７）。

（２）補正は、この出願の出願当初の明細書、特許請求の範囲又は図面に記載した事項の範囲内で行わなければなりません。さらに、特許請求の範囲について補正をする際には、請求項の削除、特許請求の範囲の限定的減縮、誤記の訂正又は明瞭でない記載の釈明（拒絶の理由に示す事項についてするものに限る）を目的とする補正に限られます。また、意見書で、各補正事項について補正が適法なものである理由を、根拠となる出願当初の明細書等の記載箇所を明確に示したうえで主張してください。

（３）特許請求の範囲について補正をする際には、特許法第１７条の２第４項に違反する補正とならないよう、注意してください。

この拒絶理由通知の内容に関するお問合せ又は面接のご希望がありましたら次の連絡先までご連絡ください。電子メール等で補正案等の送付を希望される場合は、その旨を電話でお知らせください。

審査第三部生命工学 玉井真人（たまいまこと）
TEL. 03-3581-1101 内線3448

審査長／代理	審査官	審査官補
新留 豊	玉井 真人	
9 6 3 9	1 5 8 5	

**PARTIAL ENGLISH LANGUAGE TRANSLATION OF OFFICE ACTION ISSUE FOR MX/a/2019/013597
DATED SEPTEMBER 17, 2021**

The official action can be summarized as follows:

1. Lack of clarity of claims

Objections outlined below concerning the clarity of the claims are made under the provisions set forth in articles 47 section III of the Industrial Property Law (IPL) and 29 of the IPL Regulations.

The Applicant is informed that the antibody disclosed in claim 1 is not defined based on its **specific technical characteristics**, rather it is defined based on its **functional characteristics**, i.e., it is defined because it specifically binds to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4 and having internalization ability that permits cellular uptake. In this regard, the Applicant is informed that it is well established that in the formation of

an intact antigen-binding site, the maintenance of antigen-binding specificity and affinity, as well as **the functional characteristics of an antibody depend on the sequence of amino acids and conformation of each of the CDRs and/or sequence of the variable region of the light and heavy chain of the antibody.**

2. Foreign substantive examination

During the substantive examination process carried out to the present application, the counterpart Patent **US 11,077,202 B2**, corresponding to the priority claimed, was analyzed. In accordance with articles 54, 55 of the Industrial Property Law (IPL) and 43, 44 of the IPL Regulations, Applicant is requested to comply with the following requirement:

Since the patentability criterion of the Mexican Patent Office is in agreement with that of the USPTO, it is requested to file a new set of claims conforming the claims on record to the US claims as granted in the aforementioned patent.

In the event that the applicant decides not to comply with said requirement, Applicant shall submit a copy of the following prior art documents:

- CORADA M ET AL: "Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability", BLOOD, THE AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 97, no. 6, 15 March 2001 (2001-03-15), pages 1679-1684.

- CARL U. BIALUCHA ET AL: "Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers", CANCER DISCOVERY, vol. 7, no. 9, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 1030-1045.

**Gaceta de la
Propiedad Industrial**
México

Gaceta de Notificaciones de la
Dirección Divisinal de Patentes



Dirección Divisinal de Patentes

Fecha de Puesta en Circulación

17 de septiembre de 2021



IMPI
INSTITUTO MEXICANO
DE LA PROPIEDAD
INDUSTRIAL



SE
SECRETARÍA
DE ECONOMÍA

13140

México 17 de septiembre, 2021

Gaceta de la Propiedad Industrial

GACETA DE NOTIFICACIONES DE LA DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES

Solicitudes de Patentes

Descripción general del asunto	Expediente	Fecha del Oficio	Número del Oficio	Enlace electrónico
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/008739	07 de Septiembre de 2021	82856	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/82856
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/013597	07 de Septiembre de 2021	82908	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/82908
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/013181	07 de Septiembre de 2021	82913	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/82913
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/003174	07 de Septiembre de 2021	82924	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/82924
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/006289	08 de Septiembre de 2021	83030	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83030
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/015189	07 de Septiembre de 2021	83045	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83045
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/006634	07 de Septiembre de 2021	83150	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83150
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/000727	07 de Septiembre de 2021	83211	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83211
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/010369	08 de Septiembre de 2021	83309	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83309
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/008029	08 de Septiembre de 2021	83361	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83361
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2021/001032	08 de Septiembre de 2021	83713	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83713
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/015876	09 de Septiembre de 2021	84168	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84168
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/015817	09 de Septiembre de 2021	84293	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84293
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/006557	10 de Septiembre de 2021	84608	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84608
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/005567	10 de Septiembre de 2021	84724	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84724
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/013956	10 de Septiembre de 2021	84782	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84782
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/004988	10 de Septiembre de 2021	84853	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84853
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/017144	10 de Septiembre de 2021	84935	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/84935
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/005748	13 de Septiembre de 2021	85127	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85127
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/014790	13 de Septiembre de 2021	85187	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85187
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/013028	13 de Septiembre de 2021	85221	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85221
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/001580	13 de Septiembre de 2021	85283	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85283
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/001414	13 de Septiembre de 2021	85312	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85312
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/012017	13 de Septiembre de 2021	85347	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85347
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/002910	13 de Septiembre de 2021	85399	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85399
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/012522	14 de Septiembre de 2021	85513	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85513
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/013113	14 de Septiembre de 2021	85532	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85532
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/009171	14 de Septiembre de 2021	85544	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85544
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/009173	14 de Septiembre de 2021	85546	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85546
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/009177	14 de Septiembre de 2021	85547	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85547
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/000720	14 de Septiembre de 2021	85614	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85614
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/016764	14 de Septiembre de 2021	85635	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85635
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/015770	14 de Septiembre de 2021	85665	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85665
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2018/012808	14 de Septiembre de 2021	85677	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85677
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/015239	14 de Septiembre de 2021	85678	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85678
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/003437	14 de Septiembre de 2021	85690	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85690
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2016/010364	14 de Septiembre de 2021	85691	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85691
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/002463	14 de Septiembre de 2021	85735	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85735
Se informa 1er requisito de fondo.	MX/a/2017/013376	14 de Septiembre de 2021	85763	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85763
Se informa 2° requisito de fondo.	MX/a/2018/008782	14 de Septiembre de 2021	85525	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85525
Se informa 2° requisito de fondo.	MX/a/2017/011019	08 de Septiembre de 2021	83507	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/83507
Se informa 3° requisito de fondo.	MX/a/2017/004077	30 de Agosto de 2021	80291	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/80291
Se informa 3° requisito de fondo.	MX/a/2017/001030	06 de Septiembre de 2021	82698	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/82698
Se informa 3° requisito de fondo.	MX/a/2017/000956	02 de Septiembre de 2021	81759	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/81759
Se informa 4° requisito de fondo.	MX/a/2018/006485	14 de Septiembre de 2021	85539	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/85539
Se informa 4° requisito de fondo.	MX/a/2015/008535	25 de Agosto de 2021	79183	https://vindex.impi.gob.mx/visor?id=MX/2021/79183

2021: Año de la Independencia



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
BIOTECNOLÓGICA

Certificado de acuse de
recibo registro(s):
MX/2020/009836;
MX/2021/013715

Expediente de Patente PCT fase nacional Capítulo I MX/a/2019/013597

Asunto: Se informa 1er requisito de fondo.

Ciudad de México, a 7 de septiembre de 2021.

SERGIO LUIS OLIVARES LOBATO

No. Folio: **82908**

Apoderado de
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
Pedro Luis Ogazón No. 17
Col. San Ángel C.P. 01000,
Alcaldía Álvaro Obregón, Ciudad de México, México

REF: Su solicitud No. MX/a/2019/013597 de Patente PCT presentada el 14 de mayo de 2018.

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en los artículos 53 de la Ley de la Propiedad Industrial (LPI) y 42 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial (RLPI), se le comunica lo siguiente:

El examen fue realizado en base a los siguientes documentos de la solicitud:

Descripción: Páginas 1 a 103, como originalmente fueron presentadas.

Reivindicaciones: No. 1 a 53, como fueron presentadas en su enmienda No. MX/E/2021/013715 de fecha 19 de febrero de 2021.

Figuras: No. 1 a 16 (1/29-29/29), como originalmente fueron presentadas.

Listado de secuencias: SEQ ID NO: 1 a 86, como originalmente fueron presentadas.



MX/2021/82908

Arenal No. 580, Pueblo Santa María Tenepan, Ciudad de México, C.P. 16000, CDMX
Creatividad para el Bienestar

www.gob.mx/impi



2021: Año de la Independencia



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
BIOTECNOLÓGICA

1. Derivado de la materia descrita y reivindicada en la solicitud que nos ocupa, se ha entendido que ésta se refiere a:

Anticuerpos que se unen a CDH6 y conjugados de los mismos, composiciones farmacéuticas que los comprenden y uso de los mismos.

2. Las objeciones que se exponen a continuación concernientes a las reivindicaciones son hechas bajo el supuesto de los artículos 47 fracción III de la LPI y 29 del RLPI.

- Se le comunica al solicitante que el anticuerpo descrito en la **reivindicación 1** no está definido en función de sus **CARACTERÍSTICAS TÉCNICAS ESPECÍFICAS**, más bien está definido en función de sus **CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES**, es decir, esta reivindicado porque se une específicamente a la secuencia de aminoácidos mostrada en la SEQ ID NO: 4 y que tiene capacidad de internalización que permite captación celular. Al respecto, se le comunica al solicitante que está bien establecido que en la formación de un sitio de unión al antígeno intacto, el mantenimiento de la especificidad y afinidad de unión al antígeno, así como **LAS CARACTERÍSTICAS FUNCIONALES DE UN ANTICUERPO dependen de la secuencia de aminoácidos y conformación de cada uno de los CDRs y/o secuencia de la región variable de la cadena ligera y pesada del anticuerpo**.

3. Se le comunica al solicitante que durante el proceso de examen de fondo practicado a su solicitud se analizó la patente **US 11,077,202 B2**, correspondiente con la prioridad reclamada. En cumplimiento a lo dispuesto en los artículos 54 y 55 de la LPI, y 43 y 44 del RLPI se le requiere para que cumpla con lo siguiente:

- En este caso el resultado del examen de fondo de la invención coincide con el de la Oficina Estadounidense de Patentes, por lo que se le requiere que modifique el capítulo reivindicatorio apegándose a lo otorgado en dicha patente.

La patente **US 11,077,202 B2** se encuentra en la siguiente liga electrónica:

<https://worldwide.espacenet.com/patent/search/family/064273811/publication/US11077202B2?q=gn%3DUS11077202>

4. Se le informa al solicitante que en caso de no convenir a sus intereses el modificar la materia de su invención a lo otorgado en la patente Estadounidense **US 11,077,202 B2** deberá atender a lo siguiente:

Durante el proceso de examen de búsqueda practicado a su solicitud de patente se encontró el informe de búsqueda suplementario para la solicitud de patente No. **PCT/JP2018/018572**, correspondiente con la prioridad reclamada No. de publicación **WO 2018/212136** de fecha 19 de enero de 2021, practicado por la Oficina Europea de patentes, donde se citan documentos de categoría "Y". En cumplimiento a lo dispuesto en los arts. 54 y 55 LPI y 43 y 44 del RLPI deberá presentar los documentos:



2021: Año de la Independencia



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
BIOTECNOLÓGICA

- CORADA M ET AL, "Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability", BLOOD, vol. 97, no. 6, 15 de marzo de 2001, páginas 1679-1684.
- CARL U. BIALUCHA ET AL, "Discovery and Optimization of HKT288, a Cadherin-6-Targeting ADC for the Treatment of Ovarian and Renal Cancers", CANCER DISCOVERY, vol. 7, no. 9, 1 de septiembre de 2017, páginas 1030-1045.

El informe de búsqueda suplementario de la solicitud de patente No. **WO 2018/212136** se encuentra en la siguiente liga electrónica:

<https://register.epo.org/application?documentId=E5Q6WN9W0977DSU&number=EP18802536&lng=en&npi=false>

e

Las aclaraciones o modificaciones realizadas ya sea en la descripción, en los dibujos y/o en las reivindicaciones, no deberán contener materia adicional con mayor alcance que la materia presentada originalmente en la solicitud y/o elementos que den soporte a reivindicaciones adicionales, de tal manera que se cumpla con lo establecido en el artículo 55 BIS LPI.

Asimismo, deberá efectuar el pago que establece la tarifa vigente y exhibir el comprobante correspondiente.

Para que satisfaga estos requisitos, se le concede un plazo de dos meses contados a partir del día siguiente a la fecha en que se le notifique el presente oficio, apercibido que de no cumplir este requerimiento en el plazo señalado se considerará abandonada su solicitud de Patente de conformidad con lo dispuesto por los arts. 55 y 58 de la Ley de la Propiedad Industrial.

El presente oficio corresponde al primer requerimiento de examen de fondo, el cual se emite, además de lo fundamentado anteriormente, conforme al artículo 13 del Acuerdo por el que se establecen Reglas y Criterios para la resolución de diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 9 de agosto de 2004.

Por lo anterior, la presente resolución se emite con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracciones I y XIX, 9 y 10 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a) sub inciso ii) segundo guion, 4º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 5º fracción V inciso a) sub inciso ii) segundo guion, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º, 5º fracciones VII y XV y penúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.



2021: Año de la Independencia



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACEÚTICA Y
QUÍMICA
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
BIOTECNOLÓGICA

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento.

El presente documento electrónico, su integridad y autría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impi.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1° fracción III; 2° fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

ATENTAMENTE
COORDINADORA DEPARTAMENTAL DE
EXAMEN DE FONDO ÁREA BIOTECNOLÓGICA
MARÍA GABRIELA CABRERA VALLADARES
 MGCV/AAM/2021



Cadena Original

MARIA GABRIELA CABRERA VALLADARES|00001000000506482289|SERVICIO DE ADMINISTRACION TRIBUTARIA|151|BIO|MX/2021/82908|MX/a/2019/013597|"1er" Requisito de fondo LPI PCT|1800|AAM|Pág(s) 4|k439w1Lx9HTEMFnY11AiOuOLOxd=

Sello Digital

g0Dii6CLsz8CTin5YdEK5Noa56PLXSX6wTZ1gwfFgmotaqCsDrm6Aq4IWtbY
 r13BfZdg4pQjmyspMVGIsz12HLNdnHkhNR11FWZQf0Gmj+s9n52tJSQIEtv
 LDbbXgXkRiG/zc/MKbgHKpy325DtbG2B+uKBINO9LvMgsNH4EZJ+C3q9FAjtG
 /P/H2HZp7gzRuMlpFPsVWxN2W7xUfmxkkoRyWbeEsRNZznQb6xr0Pk0pHyRV
 MGenieXNMJ1IW+KON+XojRjK8N03h6jYew4Ytk2U/Xq+56mtCYwPXhq5e32
 nbDT4Lb2tfr2Log9lr7x34QUPY6/C/xucGikarO+za==

Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica <https://validadocumento.impi.gob.mx/>, escaneando el código bidimensional QR que aparece a un costado de la e-firma del Servidor Público que signó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1° fracción III; 2° fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; en caso de no contar con lector QR o en su defecto no pueda ser leído por su dispositivo, digitar en la página antes referida el siguiente código: zEvuuwAVXAfb38VCLwglAogf/3M=



Electronic Patent Application Fee Transmittal				
Application Number:		16613203		
Filing Date:		13-Nov-2019		
Title of Invention:		ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE		
First Named Inventor/Applicant Name:		Atsuko SAITO		
Filer:		Michael D. Kaminski/Audrey Titus		
Attorney Docket Number:		098065-0249		
Filed as Large Entity				
Filing Fees for U.S. National Stage under 35 USC 371				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
Extension-of-Time:				

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Miscellaneous:				
SUBMISSION- INFORMATION DISCLOSURE STMT	1806	1	260	260
Total in USD (\$)				260

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	45108377
Application Number:	16613203
International Application Number:	
Confirmation Number:	6337
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Audrey Titus
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0249
Receipt Date:	28-FEB-2022
Filing Date:	13-NOV-2019
Time Stamp:	18:06:50
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	CARD
Payment was successfully received in RAM	\$260
RAM confirmation Number	E20222RI07262233
Deposit Account	
Authorized User	
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows:	

File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1		098065-0249_IDS_2022-02-28.pdf	253224	yes	4
			598ea574f1355b89b1d54b6cd72b13473db46d20		
	Multipart Description/PDF files in .zip description				
	Document Description		Start	End	
	Transmittal Letter		1	3	
	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)		4	4	
Warnings:					
Information:					
2	Foreign Reference	CO2017001191_ABS_only.pdf	156555	no	2
			5dc3848c7d071ee0f2fd1691e6a3cf802e99a1c0		
Warnings:					
Information:					
3	Foreign Reference	WO2015098099.pdf	10228595	no	203
			9e404c99147f68d41282fcffb197c35f8bfe4f05		
Warnings:					
Information:					
4	Non Patent Literature	CONC20190013020_OA_2021-08-09.pdf	3786282	no	16
			e5f14cc3a77cae8651e986b8622619235c373c4d		
Warnings:					
Information:					
5	Non Patent Literature	CONC20190013020_OA_2021-11-29.pdf	2255919	no	16
			b109be407ad44fc07d276952c23397a95062b6e2		
Warnings:					
Information:					

6	Non Patent Literature	JP2021002874_OA_2022-02-02.pdf	2394792	no	10				
			177ddefa96f1c1bfa5e2c2284753683f5e6b c97a						
Warnings:									
Information:									
7	Non Patent Literature	MXa2019013597_OA_2021-09-17.pdf	1194816	no	8				
			22c8f8f6592805d05bd757ceaca59013338a 7797						
Warnings:									
Information:									
8	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	38257	no	2				
			0504677d802b12c1674d13bbde6798fd1d 17e8e6						
Warnings:									
Information:									
Total Files Size (in bytes):			20308440						
<p>This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.</p> <p><u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.</p> <p><u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.</p> <p><u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.</p>									

Atty. Dkt. No. 098065-0249

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name: Atsuko SAITO

Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG
CONJUGATE

Application No.: 16/613,203

International Filing Date: May 14, 2018

371(c) Date: November 13, 2019

Examiner: Robert S. LANDSMAN

Art Unit: 1647

Confirmation No.: 6337

INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT
UNDER 37 CFR §1.56

Mail Stop Amendment
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner:

Applicant submits herewith documents for the Examiner's consideration in accordance with 37 CFR §§1.56, 1.97 and 1.98.

Applicant respectfully requests that each listed document be considered by the Examiner and be made of record in the present application and that an initialed copy of Form PTO/SB/08 be returned in accordance with MPEP §609.

Applicant includes copies of all Foreign and Non-Patent Literature reference documents cited on Form PTO/SB/08.

The submission of any document herewith is not an admission that such document constitutes prior art against the claims of the present application or that such document is considered material to patentability as defined in 37 CFR §1.56(b). Applicant does not waive

Atty. Dkt. No. 098065-0249

any rights to take any action which would be appropriate to antedate or otherwise remove as a competent reference any document submitted herewith.

CONCISE EXPLANATION OF RELEVANCE

References D1 and D2 were cited in an Office Actions issued in connection with Colombian Patent Application No. NC2019/0013020, dated August 9, 2021, and November 29, 2021.

References D1 and D2 belong to the same patent family, whereby the English language document may assist the Examiner in understanding the content of D2.

References D1 and D2 also belong to the same patent family with WO-2016/024195-A1 which was previously cited in an IDS submitted on November 13, 2019, and by the Examiner in the PTO-892 dated November 12, 2021. Accordingly, WO-2016/024195-A1 is not recited in the present IDS.

Reference D3 was cited in a Notice of Reason(s) for Refusal issued in connection with Japanese Patent Application No. 2021-002874, dated February 2, 2022. An English language Abstract of reference D3 is provided.

Copies of the Office Actions with their English language translations are submitted herewith as references D4-D7.

TIMING OF THE DISCLOSURE

The listed documents are being submitted in compliance with 37 CFR §1.97(c), before the mailing date of any of a final action under 37 CFR §1.113, a notice of allowance under 37 CFR §1.311, or an action that otherwise closes prosecution in the application.

STATEMENT UNDER 37 CFR §1.97(e)

The undersigned hereby states in accordance with 37 CFR §1.97(e)(1) that items D3 and D6 of information contained in this information disclosure statement were first cited in any communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application not more than three (3) months prior to filing of this Statement.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

FEE

Fees in the amount of \$260.00 associated with an information disclosure statement set forth in 37 CFR 1.17(p) is submitted herewith.

Although Applicant believes that no additional fee is required, the Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be due to Deposit Account No. 19-0741.

Respectfully submitted,

Date 2022-02-28

By /Michael D. Kaminski/

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 672-5490
Facsimile: (202) 672-5399

Michael D. Kaminski
Attorney for Applicant
Registration No. 32,904

Atty. Dkt. No. 098065-0249

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name: Atsuko SAITO
Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG
CONJUGATE
Application No.: 16/613,203
Intn'l Filing Date: 5/14/2018
371(c) Date: 11/13/2019
Examiner: Robert S. LANDSMAN
Art Unit: 1647
Confirmation No.: 6337

AMENDMENT AND REPLY UNDER 37 C.F.R. § 1.111

Mail Stop AMENDMENT
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner:

This communication is responsive to the non-final Office Action mailed February 14, 2022, concerning the above-referenced patent application. This response is timely filed.

Amendments to the Specification are shown on page 2 of this document.

Amendments to the Claims are reflected in the listing of claims which begins on page 11 of this document.

Remarks begin on page 21 of this document.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

Amendments to the Specification

Please amend paragraph [0228] beginning on p. 129 of the as-filed specification as follows:

1)-4 Antibody-producing hybridoma screening according to Cell-ELISA method

1)-4-1 Preparation of antigen gene-expressing cells for use in Cell-ELISA

293 α cells (a stable expression cell line derived from HEK293 cells expressing integrin α_v and integrin β_3) were prepared at 5×10^5 cells/mL in DMEM medium supplemented with 10% FBS. In accordance with transduction procedures for using LIPOFECTAMINE™ Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), DNA of pcDNA3.1-hCDH6 or pcDNA3.1-cynoCDH6, or pcDNA3.1 as a negative control was introduced into the 293 α cells, and the cells were dispensed in an amount of 100 μ L/well onto a 96-well plate (Corning Inc.). Thereafter, the cells were cultured under conditions of 37°C and 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% FBS for 24 to 27 hours. The obtained transfected cells were used for Cell-ELISA in an adhesive state.

Please amend paragraph [0229] beginning on p. 130 of the as-filed specification as follows:

The culture supernatant of the 293 α cells transfected with the expression vector prepared in Example 1)-4-1 was removed, and the culture supernatant from each hybridoma was then added to the 293 α cells transfected with pcDNA3.1-hCDH6 or pcDNA3.1-cynoCDH6, or pcDNA3.1. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells in the wells were washed once with PBS (+) supplemented with 5% FBS, and thereafter, Anti-Rat IgG-Peroxidase antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich Co. LLC) that had been 500-fold diluted with PBS (+) supplemented with 5% FBS was added to the wells. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells in the wells were washed three times with PBS (+) supplemented with 5% FBS, and thereafter, OPD coloring solution (which had been prepared by dissolving o-phenylenediamine dihydrochloride (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) and H₂O₂ in an OPD solution (0.05 M trisodium citrate, 0.1 M disodium hydrogen phosphate 12-water; pH 4.5), so that the substances became 0.4 mg/ml and 0.6% (v/v), respectively, was added in an amount of 100 μ L/well to the wells. A coloring

Atty. Dkt. No. 098065-0249

reaction was carried out with occasional stirring. Thereafter, 1 M HCl was added to the plate (100 μ L/well) to terminate the coloring reaction, followed by measurement of the absorbance at 490 nm using a plate reader (ENVISION™; PerkinElmer, Inc.). Hybridomas that produced a culture supernatant exhibiting higher absorbance in the 293 α cells transfected with the pcDNA3.1-hCDH6 or pcDNA3.1-cynoCDH6 expression vector than that in the 293 α cells transfected with the control pcDNA3.1 were selected as hybridomas producing antibodies binding to human CDH6 and cynomolgus monkey CDH6.

Please amend paragraph [0230] beginning on p. 131 of the as-filed specification as follows:

1)-5 Selective screening for antibody binding to cynomolgus monkey CDH6 according to flow cytometry

1)-5-1 Preparation of antigen gene-expressing cells for use in flow cytometry analysis

293T cells were seeded in a 225-cm² flask (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.) at 5×10^4 cells/cm², and the cells were then cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂ in DMEM medium supplemented with 10% FBS. pcDNA3.1-cynoCDH6 or pcDNA3.1 as a negative control was introduced into the 293T cells using LIPOFECTAMINE™ ~~Lipofectamine~~ 2000, and the cells were further cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂. The 293T cells transfected with each vector were treated with TRYPLE™ ~~TryPLE~~ Express (Thermo Fisher Scientific Corp.), and the cells were washed with DMEM supplemented with 10% FBS, and then suspended in PBS supplemented with 5% FBS. The obtained cell suspension was used in flow cytometry analysis.

Please amend paragraph [0234] beginning on p. 133 of the as-filed specification as follows:

1)-7-2 Purification of rat anti-CDH6 antibody

An antibody (rat anti-CDH6 antibody (rG019, rG055, rG056 or rG061)) was purified from the culture supernatant of hybridomas prepared in Example 1)-7-1 according to Protein G affinity chromatography. The antibody was adsorbed on a Protein G column (GE Healthcare

Atty. Dkt. No. 098065-0249

Biosciences Corp.), the column was then washed with PBS, and the antibody was then eluted with a 0.1 M glycine/HCl aqueous solution (pH 2.7). 1 M Tris-HCl (pH 9.0) was added to the eluate, so that the pH was adjusted to pH 7.0 to 7.5. Thereafter, using Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN®20 (molecular weight cutoff: UF30K, Sartorius Inc.), the buffer was replaced with HBSor (25 mM histidine/5% sorbitol, pH 6.0), while the antibody was concentrated, so that the concentration of the antibody was adjusted to 1 mg/mL. Finally, the antibody was filtrated through a Minisart-Plus filter (Sartorius Inc.) to obtain a purified sample.

Please amend paragraph [0235] beginning on p. 134 of the as-filed specification as follows:

[Example 2: *In vitro* evaluation of rat anti-CDH6 antibody]

2)-1 Evaluation of binding ability of rat anti-CDH6 antibody by flow cytometry

The human CDH6-binding activity of the rat anti-CDH6 antibody produced in Example 1)-7 was evaluated by flow cytometry. Using LIPOFECTAMINE™ ~~Lipofectamine~~ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), pcDNA3.1-hCDH6 produced in Example 1)-1 was transiently introduced into 293T cells (ATCC). The cells were cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂, and thereafter, a cell suspension was prepared. The suspension of the transfected 293T cells was centrifuged, and the supernatant was then removed. Thereafter, the cells were suspended by the addition of each of the 4 rat anti-CDH6 monoclonal antibodies (clone Nos: rG019, rG055, rG056 and rG061), which had been prepared in Example 1)-7, or rat IgG control (R&D Systems, Inc.) (final concentration: 10 ng/mL). The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, and then suspended by the addition of Anti-Rat IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich Co. LLC) that had been 50-fold diluted with PBS supplemented with 5% FBS. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, followed by detection using a flow cytometer (FC500; Beckman Coulter, Inc.). The data was analyzed using FlowJo (Tree Star, Inc.). The results are shown in Figure 1. In the histogram of Figure 1, the abscissa depicts FITC fluorescence intensity indicating the amount of the antibody bound, and the ordinate depicts a cell count. The shaded histogram shows that

Atty. Dkt. No. 098065-0249

negative control 293T cells untransfected with hCDH6 were used, and the open solid line histogram shows that hCDH6-transfected 293T cells were used. As seen, fluorescence intensity was enhanced by the binding of the antibody to hCDH6 on the cell surface. The rat IgG control binds to neither of the cells. As a result, it was confirmed that the 4 produced rat anti-CDH6 monoclonal antibodies bind to 293T cells transfected with pcDNA3.1-hCDH6.

Please amend paragraph [0237] beginning on p. 135 of the as-filed specification as follows:

2)-2-2 Epitope analysis of rat anti-CDH6 antibody by flow cytometry using domain deletion mutant

The epitopes to which the rat anti-human CDH6 antibodies bound were identified by flow cytometry analysis using a 293 α cell line transfected with each EC domain deletion vector. Using LIPOFECTAMINE™ ~~Lipofectamine~~ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), each domain deletion mutant expression vector produced in Example 2)-2-1, or pcDNA3.1-hCDH6 for the expression of full-length human CDH6 was transiently introduced into a 293 α cell line, which was a cell line derived from HEK293 cells by stable transfection with integrin α v and integrin β 3 expression vectors. The cells were cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂, and thereafter, a cell suspension was prepared. The suspension of the transfected 293 α cells was centrifuged, and a supernatant was then removed. Thereafter, the cells were suspended by the addition of each of the 4 rat anti-CDH6 monoclonal antibodies (clone Nos: rG019, rG055, rG056 and rG061), which had been prepared in Example 1)-7, or rat IgG control (R&D Systems, Inc.) (final concentration: 20 nM). The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, and then suspended by the addition of Anti-Rat IgG (whole molecule)-FITC antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich Co. LLC) that had been 50-fold diluted with PBS supplemented with 5% FBS. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, followed by detection using a flow cytometer (Canto II; BD Biosciences). The data was analyzed using FlowJo (Tree Star, Inc.). The results are shown in Figures 2-1 to 2-6. In the histograms of Figures 2-1 to 2-6, the abscissa depicts FITC fluorescence intensity indicating the amount of the

Atty. Dkt. No. 098065-0249

antibody bound, and the ordinate depicts cell count. The shaded histogram shows that negative control untransfected 293 α cells were used, and the open solid line histogram shows that 293 cells expressing full-length hCDH6 or each EC domain deletion mutant were used. Fluorescence intensity is enhanced when the antibody binds to full-length hCDH6 or each EC domain deletion mutant on the surface of cells. The rat IgG control binds to none of the transfected cells. The 4 produced rat anti-CDH6 monoclonal antibodies bind to the full-length hCDH6, the EC1 deletion mutant, the EC2 deletion mutant, the EC4 deletion mutant, and the EC5 deletion mutant, but do not bind to the EC3 deletion mutant. From this result, it was demonstrated that the 4 rat anti-CDH6 monoclonal antibodies specifically bind to hCDH6 with EC3 as an epitope.

Please amend paragraph [0258] beginning on p. 144 of the as-filed specification as follows:

4)-2-2 Purification of chG019

An antibody was purified from the culture supernatant obtained in Example 4)-2-1 by a one-step process according to rProtein A affinity chromatography. The culture supernatant was applied to a column that had been packed with MabSelectSuRe (GE Healthcare Biosciences Corp.) equilibrated with PBS, and thereafter, the column was washed with PBS in an amount of two or more times the volume of the column. Subsequently, the antibody was eluted with a 2 M arginine hydrochloride solution (pH 4.0), so that a fraction containing an antibody was collected. The fraction was dialyzed (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), so that the buffer was replaced with HBSor (25 mM histidine/5% sorbitol, pH 6.0). Using a Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN®20 (molecular weight cutoff: UF10K, Sartorius Inc.), the antibody was concentrated, so that the concentration of IgG was adjusted to 5 mg/ml or more. Finally, the antibody was filtrated through a Minisart-Plus filter (Sartorius Inc.) to obtain a purified sample.

Please amend paragraph [0259] beginning on p. 145 of the as-filed specification as follows:

4)-3 Evaluation of binding activity of human chimeric anti-CDH6 antibody chG019

Atty. Dkt. No. 098065-0249

The CDH6-binding activity of the human chimeric anti-CDH6 antibody chG019 purified in 4)-2 was confirmed by flow cytometry. Using LIPOFECTAMINE™ Lipofectamine 2000, pcDNA3.1-hCDH6 or pcDNA3.1-cynoCDH6 produced in Example 1)-1, or pcDNA3.1 was transiently introduced into 293 α cells. The cells were cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂, and thereafter, a cell suspension was prepared. chG019 was added to the suspension of each of these cells. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. Thereafter, the cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, and then suspended by the addition of PE-labeled F(ab')₂ Fragment anti-human IgG, Fc γ antibody (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) that had been 500-fold diluted with PBS supplemented with 5% FBS. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, and then re-suspended in PBS supplemented with 5% FBS, followed by detection using a flow cytometer (Canto II; BD Biosciences). The data was analyzed using FlowJo (Tree Star, Inc.). As shown in Figure 5, chG019 did not bind to the 293T cells transfected with pcDNA3.1 as a negative control, but did bind to the 293T cells transfected with pcDNA3.1-hCDH6 or pcDNA3.1-cynoCDH6 in an antibody concentration-dependent manner. In Figure 5, the abscissa depicts antibody concentration, and the ordinate depicts the amount of the antibody bound, based on mean fluorescence intensity. It is evident from this result that chG019 specifically binds to human CDH6 and cynomolgus monkey CDH6 with almost equivalent binding activity.

Please amend paragraph [0271] beginning on p. 150 of the as-filed specification as follows:

5)-5-3-2 Two-step purification of H01L02, H02L02, H02L03 and H04L02

The antibody was purified from the culture supernatant obtained in Example 5)-5-3-1, by a two-step process, namely, by rProtein A affinity chromatography and ceramic hydroxyapatite. The culture supernatant was applied to a column that had been packed with MabSelectSuRe (manufactured by GE Healthcare Biosciences Corp.) equilibrated with PBS, and thereafter, the column was washed with PBS in an amount of two or more times the volume of the column. Subsequently, the antibody was eluted using a 2 M arginine hydrochloride solution

Atty. Dkt. No. 098065-0249

(pH 4.0). A fraction containing the antibody was dialyzed (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), so that the buffer was replaced with PBS. The antibody solution was 5-fold diluted with a buffer of 5 mM sodium phosphate/50 mM MES/pH 7.0, and then applied to a ceramic hydroxyapatite column (Bio-Rad Laboratories, Inc., Bio-Scale CHT Type-1 Hydroxyapatite Column) that had been equilibrated with a buffer of 5 mM NaPi/50 mM MES/30 mM NaCl/pH 7.0. Elution was carried out on a linear concentration gradient of sodium chloride, so that a fraction containing an antibody was collected. This fraction was dialyzed (Thermo Fisher Scientific Inc., Slide-A-Lyzer Dialysis Cassette), so that the buffer was replaced with HBSor (25 mM histidine/5% sorbitol, pH 6.0). The antibody was concentrated with Centrifugal UF Filter Device VIVASPIN®20 (molecular weight cutoff: UF10K, Sartorius Inc.), thereby adjusting the IgG concentration to 20 mg/ml. Finally, the antibody was filtrated through a Minisart-Plus filter (Sartorius Inc.) to obtain a purified sample.

Please amend paragraph [0279] beginning on p. 154 of the as-filed specification as follows:

6)-1-2 Binding activity against human, monkey, mouse or rat CDH6

Using LIPOFECTAMINE™ ~~Lipofectamine~~ 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), pcDNA3.1-hCDH6, pcDNA3.1-cynoCDH6, p3xFLAG-CMV-9-mCDH6, or p3xFLAG-CMV-9-rCDH6 produced in Example 1)-1 was transiently introduced into 293 α cells. The cells were cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂, and thereafter, a cell suspension was prepared. Untransfected 293 α cells were used as a negative control. The suspension of the 293 α cells produced as described above was centrifuged, and the supernatant was then removed. Thereafter, the cells were suspended by the addition of each of the 4 humanized hG019 antibodies (clone Nos: H01L02, H02L02, H02L03 and H04L02), which had been prepared in Example 5)-5-3, or human IgG1 control (Calbiochem). The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, and then suspended by the addition of anti-human IgG, Fc(gamma) PE goat F(ab') (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.) that had been 500-fold diluted with PBS supplemented with 5% FBS. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented

Atty. Dkt. No. 098065-0249

with 5% FBS, followed by detection using a flow cytometer (Canto II; BD Biosciences). The data was analyzed using FlowJo (Tree Star, Inc.). In Figures 6-1 and 6-2, the abscissa depicts antibody concentration, and the ordinate depicts the amount of the antibody bound based on mean fluorescence intensity. As shown in Figures 6-1 and 6-2, the human IgG1 control as a negative control binds to none of the CDH6-transfected cells. The 4 humanized hG019 antibodies (clone Nos: H01L02, H02L02, H02L03 and H04L02) bind to human CDH6 and cynomolgus monkey CDH6, but bind to neither mouse nor rat CDH6. None of the antibodies bind to the cells transfected with the empty vector pcDNA3.1 as a negative control. On the other hand, International Publication No. WO 2016/024195 discloses that the NOV0712 antibody exhibits binding activity against all of human CDH6, cynomolgus monkey CDH6, mouse CDH6, and rat CDH6. As a result, it was demonstrated that the 4 humanized hG019 antibodies obtained in the present description are anti-CDH6 antibodies that exhibit binding properties different from those of the NOV0712 antibody.

Please amend paragraph [0280] beginning on p. 155 of the as-filed specification as follows:

6)-2 Analysis of CDH6-binding sites of humanized hG019 and NOV0712

6)-2-1 Epitope analysis using domain deletion mutant

Using Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc.), each domain deletion mutant expression vector produced in Example 2)-2-1, or pcDNA3.1-hCDH6 for the expression of full-length human CDH6 was transiently introduced into cells. The cells were cultured overnight under conditions of 37°C and 5% CO₂, and thereafter, a cell suspension was prepared. The suspension of the transfected 293α cells was centrifuged, and the supernatant was then removed. Thereafter, the cells were suspended by the addition of each of the 4 humanized hG019 antibodies (clone Nos: H01L02, H02L02, H02L03 and H04L02), which had been prepared in Example 5)-5-3, or the anti-CDH6 antibody NOV0712, which had been prepared in Reference Example 1, or human IgG1 (Calbiochem) as a negative control. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, and then suspended by the addition of APC-anti-human IgG goat F(ab')₂ (Jackson

Atty. Dkt. No. 098065-0249

ImmunoResearch Laboratories, Inc.) that had been 500-fold diluted with PBS supplemented with 5% FBS. The cells were left standing at 4°C for 1 hour. The cells were washed twice with PBS supplemented with 5% FBS, followed by detection using a flow cytometer (Canto II; BD Biosciences). The data was analyzed using FlowJo (Tree Star, Inc.). The results are shown in Figures 7-1 to 7-6. In the histograms of Figures 7-1 to 7-6, the abscissa depicts APC fluorescence intensity indicating the amount of the antibody bound, and the ordinate depicts cell count. The shaded histogram shows that negative control untransfected 293 α cells were used, and the open solid line histogram shows that 293 α cells expressing full-length hCDH6 or each EC domain deletion mutant were used. Fluorescence intensity is enhanced when the antibody binds to full-length hCDH6 or each EC domain deletion mutant on cell surface. The human IgG1 control binds to none of the transfected cells. The 4 humanized hG019 antibodies (clone Nos: H01L02, H02L02, H02L03 and H04L02) bind to the full-length hCDH6, the EC1 deletion mutant, the EC2 deletion mutant, the EC4 deletion mutant, and the EC5 deletion mutant, but do not bind to the EC3 deletion mutant. Specifically, it was demonstrated that the 4 humanized hG019 antibodies specifically bind to hCDH6 with EC3 as an epitope. On the other hand, the anti-CDH6 antibody NOV0712 binds to the full-length hCDH6, the EC1 deletion mutant, the EC2 deletion mutant, the EC3 deletion mutant, and the EC4 deletion mutant, but does not bind to the EC5 deletion mutant. Specifically, it was demonstrated that the anti-CDH6 antibody NOV0712 specifically binds to hCDH6 with EC5 as an epitope. This is consistent with epitope information on NOV0712 described in International Publication No. WO 2016/024195. From this result, it was demonstrated that the 4 humanized hG019 antibodies obtained in the present description are anti-CDH6 antibodies that exhibit properties different from those of NOV0712.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

Amendments to the Claims

This listing of claims will replace all prior versions and listings of claims in the application:

Listing of Claims:

1. (Currently Amended) A human or humanized monoclonal ~~an~~ antibody that specifically binds ~~binding~~ to the amino acid sequence shown of ~~in~~ SEQ ID NO: 4 and possesses an ability to internalize ~~having internalization ability~~ that permits cellular uptake, or a functional fragment of the antibody that binds to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and possesses an ability to internalize that permits cellular uptake.

2. (Original) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which has competitive inhibitory activity, for binding to the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 4, against at least any one antibody selected from the group consisting of the following antibodies (1) to (5):

(1) an antibody having a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 53 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 56,

(2) an antibody having a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 69,

(3) an antibody having a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73,

(4) an antibody having a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 65 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73, and

(5) an antibody having a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 77.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

3. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which comprises CDRL1, CDRL2 and CDRL3 in any one combination selected from the group consisting of the following combinations (1) to (4):

(1) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 13, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 14,

(2) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 22, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 23, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 24,

(3) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 32, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 33, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 34, and

(4) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 42, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 44, and

CDRH1, CDRH2 and CDRH3 in any one combination selected from the group consisting of the following combinations (5) to (9):

(5) CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 17, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 18, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19,

(6) CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 27, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 28, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 29,

(7) CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 37, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 38, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 39,

(8) CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 47, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 48, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 49, and

Atty. Dkt. No. 098065-0249

(9) CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 17, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 60, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19.

4. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which comprises CDRL1, CDRL2 and CDRL3, and CDRH1, CDRH2 and CDRH3 in any combination selected from the group consisting of the following combinations (1) to (5):

(1) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 13, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 14, and CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 17, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 18, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19,

(2) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 22, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 23, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 24, and CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 27, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 28, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 29,

(3) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 32, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 33, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 34, and CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 37, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 38, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 39,

(4) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 42, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 44, and CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 47, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 48, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 49, and

Atty. Dkt. No. 098065-0249

(5) CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 13, and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 14, and CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 17, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 60, and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19.

5. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which is humanized.

6. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which has any one light chain variable region selected from the group consisting of the following variable regions (1) to (4):

(1) a light chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 63,

(2) a light chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 67,

(3) an amino acid sequence having a sequence identity of at least 95% or more to the sequence of a framework region other than at each CDR sequence in the amino acid sequences of (1) and (2), and

(4) an amino acid sequence comprising a deletion, substitution or addition of one or several amino acids in the sequence of a framework region other than at each CDR sequence in the amino acid sequences of (1) to (3), and

any one heavy chain variable region selected from the group consisting of the following variable regions (5) to (9):

(5) a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 71,

(6) a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 75,

(7) a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 79,

Atty. Dkt. No. 098065-0249

(8) an amino acid sequence having a sequence homology of at least 95% or more to the sequence of a framework region other than at each CDR sequence in the amino acid sequences of (5) to (7), and

(9) an amino acid sequence comprising a deletion, substitution or addition of one or several amino acids in the sequence of a framework region other than at each CDR sequence in the amino acid sequences of (5) to (8).

7. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which comprises a light chain variable region and a heavy chain variable region in any of the following combinations (1) to (4):

(1) a light chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 63 and a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 71,

(2) a light chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 63 and a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 75,

(3) a light chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 67 and a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 75, and

(4) a light chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 63 and a heavy chain variable region consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 79.

8. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, which has any of the following combinations (1) to (4):

(1) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 69,

Atty. Dkt. No. 098065-0249

(2) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73,

(3) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 65 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73, and

(4) a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 77.

9. (Original) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 8, which has a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 69.

10. (Original) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 8, which has a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73.

11. (Original) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 8, which has a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 65 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73.

12. (Original) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 8, which has a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 77.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

13. (Previously Presented) The functional fragment of the antibody according to claim 1, wherein the functional fragment is selected from the group consisting of Fab, F(ab')₂, Fab' and Fv.

14. (Withdrawn) A polynucleotide encoding the antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1.

15. (Withdrawn) The polynucleotide according to claim 14, which comprises polynucleotides in any one combination selected from the group consisting of the following combinations (1) to (5):

(1) a polynucleotide encoding a light chain variable region comprising CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 13 and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 14, and a polynucleotide encoding a heavy chain variable region comprising CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 17, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 18 and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19,

(2) a polynucleotide encoding a light chain variable region comprising CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 22, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 23 and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 24, and a polynucleotide encoding a heavy chain variable region comprising CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 27, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 28 and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 29,

(3) a polynucleotide encoding a light chain variable region comprising CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 32, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 33 and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 34, and a polynucleotide encoding a heavy chain variable region comprising CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 37, CDRH2 consisting of

Atty. Dkt. No. 098065-0249

the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 38 and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 39,

(4) a polynucleotide encoding a light chain variable region comprising CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 42, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 43 and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 44, and a polynucleotide encoding a heavy chain variable region comprising CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 47, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 48 and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 49, and

(5) a polynucleotide encoding a light chain variable region comprising CDRL1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 12, CDRL2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 13 and CDRL3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 14, and a polynucleotide encoding a heavy chain variable region comprising CDRH1 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 17, CDRH2 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 60 and CDRH3 consisting of the amino acid sequence shown in SEQ ID NO: 19.

16. (Withdrawn) The polynucleotide according to claim 14, which comprises a polynucleotide encoding a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a polynucleotide encoding a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 69.

17. (Withdrawn) The polynucleotide according to claim 14, which comprises a polynucleotide encoding a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a polynucleotide encoding a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73.

18. (Withdrawn) The polynucleotide according to claim 14, which comprises a polynucleotide encoding a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to

Atty. Dkt. No. 098065-0249

233 in SEQ ID NO: 65 and a polynucleotide encoding a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 73.

19. (Withdrawn) The polynucleotide according to claim 14, which comprises a polynucleotide encoding a light chain consisting of the amino acid sequence at positions 21 to 233 in SEQ ID NO: 61 and a polynucleotide encoding a heavy chain consisting of the amino acid sequence at positions 20 to 471 in SEQ ID NO: 77.

20. (Withdrawn) An expression vector comprising the polynucleotide according to claim 14.

21. (Withdrawn) Host cells transformed with the expression vector according to claim 20.

22. (Withdrawn) The host cells according to claim 21, wherein the host cells are eukaryotic cells.

23. (Withdrawn) A method for producing an antibody of interest or a functional fragment of the antibody, which comprises the step of culturing the host cells according to claim 21, and the step of collecting an antibody of interest or a functional fragment of the antibody from the culture obtained by the aforementioned step.

24. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, wherein the heavy chain or the light chain has undergone one or two or more modifications selected from the group consisting of N-linked glycosylation, O-linked glycosylation, N-terminal processing, C-terminal processing, deamidation, isomerization of aspartic acid, oxidation of methionine, addition of a methionine residue to the N-terminus, amidation of a proline residue, conversion of N-terminal glutamine or N-terminal glutamic acid to pyroglutamic acid, and a deletion of one or two amino acids from the carboxyl terminus.

25. (Original) The antibody according to claim 24, wherein one or two amino acids are deleted from the carboxyl terminus of a heavy chain thereof.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

26. (Original) The antibody according to claim 25, wherein one amino acid is deleted from each of the carboxyl termini of both of the heavy chains thereof.

27. (Previously Presented) The antibody according to claim 24, wherein a proline residue at the carboxyl terminus of a heavy chain thereof is further amidated.

28. (Previously Presented) The antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1, wherein sugar chain modification is regulated in order to enhance antibody-dependent cellular cytotoxic activity.

29-52. (Canceled)

53. (Withdrawn) A method for producing an antibody-drug conjugate, which comprises the step of reacting the antibody or the functional fragment of the antibody according to claim 1.

54. (Withdrawn) A method for producing an antibody-drug conjugate, which comprises the step of reacting the antibody or a functional fragment of the antibody obtained by the production method according to claim 23 with a drug-linker intermediate compound.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

REMARKS

Applicant respectfully requests reconsideration of the present application in view of the foregoing amendments and the reasons that follow.

Status of Claims

Claim 1 is are currently amended. The amendment does not add new matter, and the amendment is made without prejudice or disclaimer. After amending the claims as set forth above, claims 1-28 and 53-54 remain pending in this application, with claims 14-23 and 53-54 withdrawn.

Specification

The Specification was objected to for including trade names or marks used in commerce that are not capitalized and/or include a proper symbol (e.g., ®, ™, etc.). The Specification has been reviewed and amended as necessary to comply with the appropriate rules. In view of the amendments, Applicant respectfully requests that this objection be withdrawn.

Rejections under 35 U.S.C. § 102

Claims 1-2 and 24 were rejected under 35 U.S.C. § 102 as allegedly anticipated over (i) Dunne et al., *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 2012, 32(7): 1724-1731, and (ii) Shimazui et al., *Eur. Urol.*, 2000, 38:331-338. Claims 1, 2, 13, and 24 were rejected as anticipated over Cho et al., *Development*, 1998, 125(5):803-812. Finally, claims 1, 2, 5, 13, and 24 were rejected as anticipated over Bialucha (US 9,982,045). Applicant respectfully traverses these rejections in view of the amendments to the claims.

As presently amended, claim 1 now recites “A human or humanized monoclonal antibody that specifically binds to the amino acid sequence shown of SEQ ID NO: 4 and possesses an ability to internalize that permits cellular uptake, or a functional fragment of the

Atty. Dkt. No. 098065-0249

antibody that binds to the amino acid sequence of SEQ ID NO: 4 and possesses an ability to internalize that permits cellular uptake.”

“A claim is anticipated only if each and every element as set forth in the claim is found, either expressly or inherently described, in a single prior art reference.” *Verdegaal Bros. v. Union Oil Co. of California*, 814 F.2d 628, 631 (Fed. Cir. 1987) (emphasis added); MPEP § 2131. Dunne, Shimazui, and Cho fail to disclose a human or humanized monoclonal antibody, and they fail to describe any antibodies that specifically bind to the EC3 domain of the extracellular region of human CDH6 (i.e., SEQ ID NO: 4). For at least that reason these references do not anticipate the present claims.

Bialucha similarly fails to anticipate the present claims because it fails to disclose all of the elements of the pending claims either expressly or inherently. Rather, Bialucha identifies the EC5 domain (i.e., Bialucha’s SEQ ID NO: 534) of the extracellular region of CDH6 as a preferred epitope for binding (*see* para [0009], [0029], [0412]). Further, Bialucha fails to expressly indicate that any of the antibodies disclosed therein bind specifically to EC3 of the extracellular region of human CDH6 (i.e., SEQ ID NO: 4) and possess an ability to internalize, as recited in the present claims.

Bialucha also cannot be properly used to establish inherency. At best, the Office Action notes that Bialucha “teaches antibodies as part of an ADC which would be expected to internalize” (Office Action at p. 5; internal parenthetical omitted). But as the present Specification indicates, there are 5 extracellular regions of human CDH6, and there is no indication in the record that binding to any or all of the various extracellular domains will always necessarily result in internalization of an antibody. MPEP § 2112 instructs, “[t]he fact that a certain result or characteristic may occur or be present in the prior art is not sufficient to establish the inherency of that result or characteristic.” Rather, “the examiner must provide a basis in fact and/or technical reasoning to reasonably support the determination that the allegedly inherent characteristic necessarily flows from the teachings of the applied prior art.” *Id.* Thus, there is no legal or scientific basis for assuming that any of the antibodies disclosed in Bialucha necessarily

Atty. Dkt. No. 098065-0249

possess both (i) specific binding to SEQ ID NO: 4 and (ii) an ability to internalize, as recited in the claims.

For at least the foregoing reasons, Applicant requests that the rejections under 35 U.S.C. § 102 be reconsidered and withdrawn in view of the amendments to the claims.

Double Patenting

A. Claims 1-13 and 24-28 were rejected on the ground of alleged nonstatutory double patenting as unpatentable over claims 1-29 of US 11,077,202 (“the ’202 patent”). Applicant respectfully traverses this rejection.

MPEP § 804 instructs, “[t]he doctrine of double patenting seeks to prevent the unjustified extension of patent exclusivity beyond the term of a patent” and “[d]ouble patenting results when the right to exclude granted by a first patent is unjustly extended by the grant of a later issued patent or patents.” Because the ’202 patent claims antibody drug conjugates (ADCs) and the present application claims antibodies, *per se*, double patenting does not result here.

For example, the Federal Circuit has addressed double patenting allegations similar to this one in *Eli Lilly & Co. v. Teva Parenteral Meds. Inc.*, 689 F.3d 1368 (Fed. Cir. 2012), and the court held that when distinct compounds were claimed, no double patenting existed. In *Eli Lilly* the court compared a claimed intermediate (“the ’775 intermediate”) with a pharmaceutical compound called pemetrexed. In considering alleged double patenting based on claims directed to these compounds, the court found:

The ’775 Intermediate and pemetrexed are thus separate and independent chemical compounds; Lilly's original claim to the ’775 Intermediate offered no protection for pemetrexed, and its claims to pemetrexed do not incorporate or require use of the ’775 Intermediate ... we agree with the district court's conclusion that that disclosure does not render Lilly's claims to pemetrexed invalid for obviousness-type double patenting.

Eli Lilly, 689 F.3d at 1380. Indeed, the court reiterated, “the claims at issue recite two separate and distinct chemical compounds ... [t]hat alone suffices to undermine [the challenger’s ODP

Atty. Dkt. No. 098065-0249

argument], for the asserted claims ... do not recite a *use* of the *same compound*, but a *different compound altogether*.” *Id.* (emphasis original). The court also explained that “original claim to the ’775 Intermediate offered no protection for pemetrexed, and its claims to pemetrexed do not incorporate or require use of the ’775 Intermediate” and therefore the court reasoned that “[t]he particular concerns motivating our prior decisions [*i.e.*, unjustifiable extension of protection and potential harassment] are thus absent here.” *Id.*

Further, *Eli Lilly* is not isolated jurisprudence. The Federal Circuit has long held that double patenting does not exist when, as here, “the invention of the second-to-issue [patent] received no protection from the first-issued [patent] because no claim of the latter covers the [former’s] process.” *Gen. Foods Corp. v. Studiengesellschaft Kohle mbH*, 972 F.2d 1272, 1282 (Fed. Cir. 1992)

The same reasoning applies here. The ADC claimed in the ’202 patent is a “separate and distinct chemical compound” compared to the antibody claimed here, and the early granted claims to an ADC offer no protection for the currently claimed antibodies. Thus, the judicial underpinnings of double patenting are simply absent from the situation case, and for the foregoing reasons, Applicant respectfully requests that this rejection be reconsidered and withdrawn.

B. Claims 1-13 and 24-28 were also provisionally rejected on the ground of alleged nonstatutory double patenting as unpatentable over claims 1-65 of copending US 17/293,577 (“the ’577 application”).

This rejection over the ’577 application should be withdrawn if the other rejections of record are overcome by this response. The cited co-pending application—*i.e.*, the ’577 application—has a priority date and U.S. filing date that are later than the respective priority date and filing date of the present application. MPEP § 804(I)(B)(1) instructs that “[i]f a ‘provisional’ non-statutory double patenting rejection is the only rejection remaining in an application having the earliest effective U.S. filing date (including any benefit claimed under 35 U.S.C. 120, 121, 365(c), or 386(c)) compared to the reference application(s), the examiner should withdraw the

Atty. Dkt. No. 098065-0249

rejection in the application having the earliest effective U.S. filing date and permit that application to issue as a patent.” Thus, if the present claims are otherwise in condition for allowance, the double patenting rejection over the ’577 application should be withdrawn.

CONCLUSION

Applicant believes that the application is in condition for allowance. Favorable reconsideration is respectfully requested. The Examiner is invited to contact the undersigned by telephone if it is felt that a telephone interview would advance prosecution.

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required for this application to Deposit Account No. 19-0741. If any extensions of time are needed for timely acceptance of papers submitted herewith, applicant hereby petitions for such extensions under 37 CFR § 1.136 and authorizes payment of any such extension fees to Deposit Account No. 19-0741.

Respectfully submitted,

Date April 27, 2022_____

By /Benjamin Berkowitz/_____

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 295-4620
Facsimile: (202) 672-5399

Benjamin A. Berkowitz
Attorney for Applicant
Registration No. 59,349

Jason N. Mock
Attorney for Applicant
Registration No. 69,186

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	45581246
Application Number:	16613203
International Application Number:	
Confirmation Number:	6337
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Michael D. Kaminski/Audrey Titus
Filer Authorized By:	Michael D. Kaminski
Attorney Docket Number:	098065-0249
Receipt Date:	27-APR-2022
Filing Date:	13-NOV-2019
Time Stamp:	23:02:22
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment		no			
File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1		098065-0249_Amendment111_2022-04-27.pdf	209427	yes	25
			217511e97382975758a9ff3bd5692210098e68b4		

	Multipart Description/PDF files in .zip description		
	Document Description	Start	End
	Amendment/Request for Reconsideration-After Non-Final Rejection	1	1
	Specification	2	10
	Claims	11	20
	Applicant Arguments/Remarks Made in an Amendment	21	25
Warnings:			
Information:			
Total Files Size (in bytes):		209427	
<p>This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.</p> <p><u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.</p> <p><u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.</p> <p><u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.</p>			

PTO/SB/06 (09-11)

Approved for use through 1/31/2014. OMB 0651-0032

U.S. Patent and Trademark Office; U.S. DEPARTMENT OF COMMERCE

Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

PATENT APPLICATION FEE DETERMINATION RECORD Substitute for Form PTO-875				Application or Docket Number 16/613,203		Filing Date 11/13/2019		☐ To be Mailed					
ENTITY: ☒ LARGE ☐ SMALL ☐ MICRO													
APPLICATION AS FILED - PART I													
		(Column 1)	(Column 2)										
FOR		NUMBER FILED	NUMBER EXTRA		RATE (\$)		FEE (\$)						
☐ BASIC FEE (37 CFR 1.16(a), (b), or (c))		N/A	N/A		N/A								
☐ SEARCH FEE (37 CFR 1.16(k), (l), or (m))		N/A	N/A		N/A								
☐ EXAMINATION FEE (37 CFR 1.16(o), (p), or (q))		N/A	N/A		N/A								
TOTAL CLAIMS (37 CFR 1.16(j))		minus 20 = *		x \$100 =									
INDEPENDENT CLAIMS (37 CFR 1.16(h))		minus 3 = *		x \$460 =									
☐ APPLICATION SIZE FEE (37 CFR 1.16(s))		If the specification and drawings exceed 100 sheets of paper, the application size fee due is \$310 (\$155 for small entity) for each additional 50 sheets or fraction thereof. See 35 U.S.C. 41(a)(1)(G) and 37 CFR 1.16(s).											
☐ MULTIPLE DEPENDENT CLAIM PRESENT (37 CFR 1.16(j))													
* If the difference in column 1 is less than zero, enter "0" in column 2.					TOTAL								
APPLICATION AS AMENDED - PART II													
		(Column 1)	(Column 2)		(Column 3)								
04/27/2022		CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT	HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR		PRESENT EXTRA		RATE (\$)		ADDITIONAL FEE (\$)				
Total (37 CFR 1.16(i))		* 30	Minus	** 54	= 0		x \$100 =		0				
Independent (37 CFR 1.16(h))		* 1	Minus	*** 3	= 0		x \$480 =		0				
☐ Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))													
☐ FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))													
								TOTAL ADD'L FEE		0			
		(Column 1)	(Column 2)		(Column 3)								
		CLAIMS REMAINING AFTER AMENDMENT	HIGHEST NUMBER PREVIOUSLY PAID FOR		PRESENT EXTRA		RATE (\$)		ADDITIONAL FEE (\$)				
Total (37 CFR 1.16(i))		*	Minus	**	=		x \$0 =						
Independent (37 CFR 1.16(h))		*	Minus	***	=		x \$0 =						
☐ Application Size Fee (37 CFR 1.16(s))													
☐ FIRST PRESENTATION OF MULTIPLE DEPENDENT CLAIM (37 CFR 1.16(j))													
								TOTAL ADD'L FEE					
* If the entry in column 1 is less than the entry in column 2, write "0" in column 3.								LIE					
** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 20, enter "20".								/DENISE HOPKINS/					
*** If the "Highest Number Previously Paid For" IN THIS SPACE is less than 3, enter "3".													
The "Highest Number Previously Paid For" (Total or Independent) is the highest number found in the appropriate box in column 1.													

This collection of information is required by 37 CFR 1.16. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 12 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450. DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. **SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450.**

If you need assistance in completing the form, call 1-800-PTO-9199 and select option 2.



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450
www.uspto.gov

NOTICE OF ALLOWANCE AND FEE(S) DUE

22428 7590 05/11/2022
FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

EXAMINER

LANDSMAN, ROBERT S

ART UNIT

PAPER NUMBER

1647

DATE MAILED: 05/11/2022

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
16/613,203	11/13/2019	Atsuko SAITO	098065-0249	6337

TITLE OF INVENTION: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND METHOD OF PRODUCING AN ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	08/11/2022

THE APPLICATION IDENTIFIED ABOVE HAS BEEN EXAMINED AND IS ALLOWED FOR ISSUANCE AS A PATENT. PROSECUTION ON THE MERITS IS CLOSED. THIS NOTICE OF ALLOWANCE IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS. THIS APPLICATION IS SUBJECT TO WITHDRAWAL FROM ISSUE AT THE INITIATIVE OF THE OFFICE OR UPON PETITION BY THE APPLICANT. SEE 37 CFR 1.313 AND MPEP 1308.

THE ISSUE FEE AND PUBLICATION FEE (IF REQUIRED) MUST BE PAID WITHIN THREE MONTHS FROM THE MAILING DATE OF THIS NOTICE OR THIS APPLICATION SHALL BE REGARDED AS ABANDONED. THIS STATUTORY PERIOD CANNOT BE EXTENDED. SEE 35 U.S.C. 151. THE ISSUE FEE DUE INDICATED ABOVE DOES NOT REFLECT A CREDIT FOR ANY PREVIOUSLY PAID ISSUE FEE IN THIS APPLICATION. IF AN ISSUE FEE HAS PREVIOUSLY BEEN PAID IN THIS APPLICATION (AS SHOWN ABOVE), THE RETURN OF PART B OF THIS FORM WILL BE CONSIDERED A REQUEST TO REAPPLY THE PREVIOUSLY PAID ISSUE FEE TOWARD THE ISSUE FEE NOW DUE.

HOW TO REPLY TO THIS NOTICE:

I. Review the ENTITY STATUS shown above. If the ENTITY STATUS is shown as SMALL or MICRO, verify whether entitlement to that entity status still applies.

If the ENTITY STATUS is the same as shown above, pay the TOTAL FEE(S) DUE shown above.

If the ENTITY STATUS is changed from that shown above, on PART B - FEE(S) TRANSMITTAL, complete section number 5 titled "Change in Entity Status (from status indicated above)".

For purposes of this notice, small entity fees are 1/2 the amount of undiscounted fees, and micro entity fees are 1/2 the amount of small entity fees.

II. PART B - FEE(S) TRANSMITTAL, or its equivalent, must be completed and returned to the United States Patent and Trademark Office (USPTO) with your ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). If you are charging the fee(s) to your deposit account, section "4b" of Part B - Fee(s) Transmittal should be completed. If an equivalent of Part B is filed, a request to reapply a previously paid issue fee must be clearly made, and delays in processing may occur due to the difficulty in recognizing the paper as an equivalent of Part B.

III. All communications regarding this application must give the application number. Please direct all communications prior to issuance to Mail Stop ISSUE FEE unless advised to the contrary.

IMPORTANT REMINDER: Maintenance fees are due in utility patents issuing on applications filed on or after Dec. 12, 1980. It is patentee's responsibility to ensure timely payment of maintenance fees when due. More information is available at www.uspto.gov/PatentMaintenanceFees.

PART B - FEE(S) TRANSMITTAL

Complete and send this form, together with applicable fee(s), by mail or fax, or via EFS-Web.

By mail, send to: Mail Stop ISSUE FEE
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, Virginia 22313-1450

By fax, send to: (571)-273-2885

INSTRUCTIONS: This form should be used for transmitting the ISSUE FEE and PUBLICATION FEE (if required). Blocks 1 through 5 should be completed where appropriate. All further correspondence including the Patent, advance orders and notification of maintenance fees will be mailed to the current correspondence address as indicated unless corrected below or directed otherwise in Block 1, by (a) specifying a new correspondence address; and/or (b) indicating a separate "FEE ADDRESS" for maintenance fee notifications.

CURRENT CORRESPONDENCE ADDRESS (Note: Use Block 1 for any change of address)

22428 7590 05/11/2022
FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109

Note: A certificate of mailing can only be used for domestic mailings of the Fee(s) Transmittal. This certificate cannot be used for any other accompanying papers. Each additional paper, such as an assignment or formal drawing, must have its own certificate of mailing or transmission.

Certificate of Mailing or Transmission

I hereby certify that this Fee(s) Transmittal is being deposited with the United States Postal Service with sufficient postage for first class mail in an envelope addressed to the Mail Stop ISSUE FEE address above, or being transmitted to the USPTO via EFS-Web or by facsimile to (571) 273-2885, on the date below.

(Typed or printed name)
(Signature)
(Date)

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
16/613,203	11/13/2019	Atsuko SAITO	098065-0249	6337

TITLE OF INVENTION: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND METHOD OF PRODUCING AN ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

APPLN. TYPE	ENTITY STATUS	ISSUE FEE DUE	PUBLICATION FEE DUE	PREV. PAID ISSUE FEE	TOTAL FEE(S) DUE	DATE DUE
nonprovisional	UNDISCOUNTED	\$1200	\$0.00	\$0.00	\$1200	08/11/2022

EXAMINER	ART UNIT	CLASS-SUBCLASS
LANDSMAN, ROBERT S	1647	424-181100

1. Change of correspondence address or indication of "Fee Address" (37 CFR 1.363).

☐ Change of correspondence address (or Change of Correspondence Address form PTO/AIA/122 or PTO/SB/122) attached.

☐ "Fee Address" indication (or "Fee Address" Indication form PTO/AIA/47 or PTO/SB/47; Rev 03-02 or more recent) attached. **Use of a Customer Number is required.**

2. For printing on the patent front page, list

(1) The names of up to 3 registered patent attorneys or agents OR, alternatively,

(2) The name of a single firm (having as a member a registered attorney or agent) and the names of up to 2 registered patent attorneys or agents. If no name is listed, no name will be printed.

1 _____
2 _____
3 _____

3. ASSIGNEE NAME AND RESIDENCE DATA TO BE PRINTED ON THE PATENT (print or type)

PLEASE NOTE: Unless an assignee is identified below, no assignee data will appear on the patent. If an assignee is identified below, the document must have been previously recorded, or filed for recordation, as set forth in 37 CFR 3.11 and 37 CFR 3.81(a). Completion of this form is NOT a substitute for filing an assignment.

(A) NAME OF ASSIGNEE

(B) RESIDENCE: (CITY and STATE OR COUNTRY)

Please check the appropriate assignee category or categories (will not be printed on the patent) : ☐ Individual ☐ Corporation or other private group entity ☐ Government

4a. Fees submitted: ☐ Issue Fee ☐ Publication Fee (if required) ☐ Advance Order - # of Copies _____

4b. Method of Payment: (Please first reapply any previously paid fee shown above)

☐ Electronic Payment via EFS-Web ☐ Enclosed check ☐ Non-electronic payment by credit card (Attach form PTO-2038)

☐ The Director is hereby authorized to charge the required fee(s), any deficiency, or credit any overpayment to Deposit Account No. _____

5. Change in Entity Status (from status indicated above)

☐ Applicant certifying micro entity status. See 37 CFR 1.29

☐ Applicant asserting small entity status. See 37 CFR 1.27

☐ Applicant changing to regular undiscounted fee status.

NOTE: Absent a valid certification of Micro Entity Status (see forms PTO/SB/15A and 15B), issue fee payment in the micro entity amount will not be accepted at the risk of application abandonment.

NOTE: If the application was previously under micro entity status, checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to micro entity status.

NOTE: Checking this box will be taken to be a notification of loss of entitlement to small or micro entity status, as applicable.

NOTE: This form must be signed in accordance with 37 CFR 1.31 and 1.33. See 37 CFR 1.4 for signature requirements and certifications.

Authorized Signature _____ Date _____
Typed or printed name _____ Registration No. _____



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
16/613,203	11/13/2019	Atsuko SAITO	098065-0249	6337

22428 7590 05/11/2022
FOLEY & LARDNER LLP
 3000 K STREET N.W.
 SUITE 600
 WASHINGTON, DC 20007-5109

EXAMINER

LANDSMAN, ROBERT S

ART UNIT	PAPER NUMBER
----------	--------------

1647

DATE MAILED: 05/11/2022

Determination of Patent Term Adjustment under 35 U.S.C. 154 (b)
 (Applications filed on or after May 29, 2000)

The Office has discontinued providing a Patent Term Adjustment (PTA) calculation with the Notice of Allowance.

Section 1(h)(2) of the AIA Technical Corrections Act amended 35 U.S.C. 154(b)(3)(B)(i) to eliminate the requirement that the Office provide a patent term adjustment determination with the notice of allowance. See Revisions to Patent Term Adjustment, 78 Fed. Reg. 19416, 19417 (Apr. 1, 2013). Therefore, the Office is no longer providing an initial patent term adjustment determination with the notice of allowance. The Office will continue to provide a patent term adjustment determination with the Issue Notification Letter that is mailed to applicant approximately three weeks prior to the issue date of the patent, and will include the patent term adjustment on the patent. Any request for reconsideration of the patent term adjustment determination (or reinstatement of patent term adjustment) should follow the process outlined in 37 CFR 1.705.

Any questions regarding the Patent Term Extension or Adjustment determination should be directed to the Office of Patent Legal Administration at (571)-272-7702. Questions relating to issue and publication fee payments should be directed to the Customer Service Center of the Office of Patent Publication at 1-(888)-786-0101 or (571)-272-4200.

OMB Clearance and PRA Burden Statement for PTOL-85 Part B

The Paperwork Reduction Act (PRA) of 1995 requires Federal agencies to obtain Office of Management and Budget approval before requesting most types of information from the public. When OMB approves an agency request to collect information from the public, OMB (i) provides a valid OMB Control Number and expiration date for the agency to display on the instrument that will be used to collect the information and (ii) requires the agency to inform the public about the OMB Control Number's legal significance in accordance with 5 CFR 1320.5(b).

The information collected by PTOL-85 Part B is required by 37 CFR 1.311. The information is required to obtain or retain a benefit by the public which is to file (and by the USPTO to process) an application. Confidentiality is governed by 35 U.S.C. 122 and 37 CFR 1.14. This collection is estimated to take 30 minutes to complete, including gathering, preparing, and submitting the completed application form to the USPTO. Time will vary depending upon the individual case. Any comments on the amount of time you require to complete this form and/or suggestions for reducing this burden, should be sent to the Chief Information Officer, U.S. Patent and Trademark Office, U.S. Department of Commerce, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450. **DO NOT SEND FEES OR COMPLETED FORMS TO THIS ADDRESS. SEND TO: Commissioner for Patents, P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450.** Under the Paperwork Reduction Act of 1995, no persons are required to respond to a collection of information unless it displays a valid OMB control number.

Privacy Act Statement

The Privacy Act of 1974 (P.L. 93-579) requires that you be given certain information in connection with your submission of the attached form related to a patent application or patent. Accordingly, pursuant to the requirements of the Act, please be advised that: (1) the general authority for the collection of this information is 35 U.S.C. 2(b) (2); (2) furnishing of the information solicited is voluntary; and (3) the principal purpose for which the information is used by the U.S. Patent and Trademark Office is to process and/or examine your submission related to a patent application or patent. If you do not furnish the requested information, the U.S. Patent and Trademark Office may not be able to process and/or examine your submission, which may result in termination of proceedings or abandonment of the application or expiration of the patent.

The information provided by you in this form will be subject to the following routine uses:

1. The information on this form will be treated confidentially to the extent allowed under the Freedom of Information Act (5 U.S.C. 552) and the Privacy Act (5 U.S.C. 552a). Records from this system of records may be disclosed to the Department of Justice to determine whether disclosure of these records is required by the Freedom of Information Act.
2. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, in the course of presenting evidence to a court, magistrate, or administrative tribunal, including disclosures to opposing counsel in the course of settlement negotiations.
3. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Member of Congress submitting a request involving an individual, to whom the record pertains, when the individual has requested assistance from the Member with respect to the subject matter of the record.
4. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to a contractor of the Agency having need for the information in order to perform a contract. Recipients of information shall be required to comply with the requirements of the Privacy Act of 1974, as amended, pursuant to 5 U.S.C. 552a(m).
5. A record related to an International Application filed under the Patent Cooperation Treaty in this system of records may be disclosed, as a routine use, to the International Bureau of the World Intellectual Property Organization, pursuant to the Patent Cooperation Treaty.
6. A record in this system of records may be disclosed, as a routine use, to another federal agency for purposes of National Security review (35 U.S.C. 181) and for review pursuant to the Atomic Energy Act (42 U.S.C. 218(c)).
7. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the Administrator, General Services, or his/her designee, during an inspection of records conducted by GSA as part of that agency's responsibility to recommend improvements in records management practices and programs, under authority of 44 U.S.C. 2904 and 2906. Such disclosure shall be made in accordance with the GSA regulations governing inspection of records for this purpose, and any other relevant (i.e., GSA or Commerce) directive. Such disclosure shall not be used to make determinations about individuals.
8. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to the public after either publication of the application pursuant to 35 U.S.C. 122(b) or issuance of a patent pursuant to 35 U.S.C. 151. Further, a record may be disclosed, subject to the limitations of 37 CFR 1.14, as a routine use, to the public if the record was filed in an application which became abandoned or in which the proceedings were terminated and which application is referenced by either a published application, an application open to public inspection or an issued patent.
9. A record from this system of records may be disclosed, as a routine use, to a Federal, State, or local law enforcement agency, if the USPTO becomes aware of a violation or potential violation of law or regulation.

Notice of Allowability	Application No. 16/613,203	Applicant(s) SAITO et al.	
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647	AIA (FITF) Status Yes

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address--

All claims being allowable, PROSECUTION ON THE MERITS IS (OR REMAINS) CLOSED in this application. If not included herewith (or previously mailed), a Notice of Allowance (PTOL-85) or other appropriate communication will be mailed in due course. **THIS NOTICE OF ALLOWABILITY IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS.** This application is subject to withdrawal from issue at the initiative of the Office or upon petition by the applicant. See 37 CFR 1.313 and MPEP 1308.

1. ☒ This communication is responsive to the amendment dated 4/27/22.
☐ A declaration(s)/affidavit(s) under **37 CFR 1.130(b)** was/were filed on ____.
2. ☐ An election was made by the applicant in response to a restriction requirement set forth during the interview on ____; the restriction requirement and election have been incorporated into this action.
3. ☒ The allowed claim(s) is/are 1-13,24-28 and 53 . As a result of the allowed claim(s), you may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at a participating intellectual property office for the corresponding application. For more information, please see http://www.uspto.gov/patents/init_events/pph/index.jsp or send an inquiry to PPHfeedback@uspto.gov.
4. ☐ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).
Certified copies:
a) ☐ All b) ☐ Some* c) ☐ None of the:
1. ☐ Certified copies of the priority documents have been received.
2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. _____.
3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this national stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).
* Certified copies not received: ____.

Applicant has THREE MONTHS FROM THE "MAILING DATE" of this communication to file a reply complying with the requirements noted below. Failure to timely comply will result in ABANDONMENT of this application.
THIS THREE-MONTH PERIOD IS NOT EXTENDABLE.

5. ☐ CORRECTED DRAWINGS (as "replacement sheets") must be submitted.
☐ including changes required by the attached Examiner's Amendment / Comment or in the Office action of Paper No./Mail Date _____.
Identifying indicia such as the application number (see 37 CFR 1.84(c)) should be written on the drawings in the front (not the back) of each sheet. Replacement sheet(s) should be labeled as such in the header according to 37 CFR 1.121(d).
6. ☐ DEPOSIT OF and/or INFORMATION about the deposit of BIOLOGICAL MATERIAL must be submitted. Note the attached Examiner's comment regarding REQUIREMENT FOR THE DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL.

Attachment(s)

1. ☐ Notice of References Cited (PTO-892) 2. ☒ Information Disclosure Statements (PTO/SB/08), Paper No./Mail Date <u>2/28/22</u> . 3. ☐ Examiner's Comment Regarding Requirement for Deposit of Biological Material _____. 4. ☐ Interview Summary (PTO-413), Paper No./Mail Date. _____.	5. ☒ Examiner's Amendment/Comment 6. ☐ Examiner's Statement of Reasons for Allowance 7. ☐ Other _____.
---	--

	/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647
--	--

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 2

EXAMINER'S AMENDMENT

Notice of Pre-AIA or AIA Status

The present application, filed on or after March 16, 2013, is being examined under the first inventor to file provisions of the AIA.

An examiner's amendment to the record appears below. Should the changes and/or additions be unacceptable to applicant, an amendment may be filed as provided by 37 CFR 1.312. To ensure consideration of such an amendment, it MUST be submitted no later than the payment of the issue fee.

In the specification:

Amend the title to the following –

ANTI-CDH6 ANTIBODY AND METHOD OF PRODUCING AN ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG
CONJUGATE

In the claims:

Cancel claims 14-23 and 54

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 3

Advisory information

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to ROBERT S LANDSMAN whose telephone number is 571-272-0888. The examiner can normally be reached M-F 8 AM – 6 PM (eastern).

Examiner interviews are available via telephone, in-person, and video conferencing using a USPTO supplied web-based collaboration tool. To schedule an interview, applicant is encouraged to use the USPTO Automated Interview Request (AIR) at <http://www.uspto.gov/interviewpractice>.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Joanne Hama, can be reached at 571-272-2911. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 571-273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free).

/ROBERT S LANDSMAN/
Primary Examiner, Art Unit 1647

<i>Search Notes</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

CPC - Searched*		
Symbol	Date	Examiner
A61K47/6803, 6849; A61K31/4745; A61P35/00; C07K16/28; C07K2317/24, 40, 41, 565, 732, 76, 77	01/28/2022	RL

CPC Combination Sets - Searched*		
Symbol	Date	Examiner

US Classification - Searched*			
Class	Subclass	Date	Examiner

* See search history printout included with this form or the SEARCH NOTES box below to determine the scope of the search.

Search Notes		
Search Notes	Date	Examiner
various SEQ ID NOs - results in SCORE	01/24/2022	RL
inventor search in PALM	01/24/2022	RL
WEST - search strategy in case	01/28/2022	RL
STN - search strategy in case	01/28/2022	RL
GOOGLE - search strategy in case	01/28/2022	RL
inventor search in PALM	05/06/2022	RL

--	--

<i>Search Notes</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

Interference Search			
US Class/CPC Symbol	US Subclass/CPC Group	Date	Examiner
various SEQ ID NOs	results in SCORE	05/06/2022	RL
.clm. search in WEST	search strategy in case	05/06/2022	RL

--	--

<i>Issue Classification</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

CPC						
Symbol					Type	Version
A61K	/	47	/	6803	F	2017-08-01
A61K	/	47	/	6849	I	2017-08-01
A61P	/	35	/	00	I	2018-01-01
A61K	/	31	/	4745	I	2013-01-01
C07K	/	16	/	28	I	2013-01-01
C07K	/	2317	/	24	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	40	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	41	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	565	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	732	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	76	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	77	A	2013-01-01

CPC Combination Sets					
Symbol	Type	Set	Ranking	Version	
/		/			

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	19	
/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647	06 May 2022	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	none

<i>Issue Classification</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

INTERNATIONAL CLASSIFICATION			
CLAIMED			
A61K47/68	/	47	/ 68
C07K16/28	/	16	/ 28

NON-CLAIMED			
A61P35/00	/	35	/ 00
A61K31/4745	/	31	/ 4745

US ORIGINAL CLASSIFICATION	
CLASS	SUBCLASS

CROSS REFERENCES(S)						
CLASS	SUBCLASS (ONE SUBCLASS PER BLOCK)					

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	19	
/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647	06 May 2022	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	none

<i>Issue Classification</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

☒ Claims renumbered in the same order as presented by applicant ☐ CPA ☐ T.D. ☐ R.1.47															
CLAIMS															
Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original
	1		10		53										
	2		11												
	3		12												
	4		13												
	5		24												
	6		25												
	7		26												
	8		27												
	9		28												

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	19	
/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647	06 May 2022	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	none

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: February 28, 2022 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	November 13, 2019
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1647
				Examiner Name	Robert S. LANDSMAN
Sheet	1	of	1	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear
	D1.	2016/0046711-A1	02-18-2016	Bialucha et al.	= CO-2017001191-A2 and WO-2016/024195-A1

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	D2.	CO-2017001191-A2	04-28-2017	NOVARTIS AG	= US-2016/0046711-A1 and WO-2016/024195-A1	
	D3.	WO-2015/098099-A1	07-02-2015	DAIICHI SANKYO CO LTD		ABS

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS				
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.		
	D4.	Colombian Patent Office, "Office Action," issued in connection with Colombian Patent Application No. NC2019/0013020, dated November 29, 2021.		
	D5.	Colombian Patent Office, "Office Action," issued in connection with Colombian Patent Application No. NC2019/0013020, dated August 9, 2021.		
	D6.	Japanese Patent Office, "Notice of Reason(s) for Refusal," issued in connection with Japanese Patent Application No. 2021-002874, dated February 2, 2022.		
	D7.	Mexican Patent Office, "Office Action," issued in connection with Mexican Patent Application No. MX/a/2019/013597, dated September 17, 2021.		

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L/

Examiner Signature	/ROBERT S LANDSMAN/	Date Considered	05/06/2022
---------------------------	---------------------	------------------------	------------

Bibliographic Data

Application No: 16/613,203

Foreign Priority claimed: ☒ Yes ☐ No35 USC 119 (a-d) conditions met: ☒ Yes ☐ No ☐ Met After Allowance

Verified and Acknowledged: /ROBERT S LANDSMAN/

Examiner's Signature

Initials

Title:

ANTI-CDH6 ANTIBODY AND METHOD OF PRODUCING AN
ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE

FILING or 371(c) DATE	CLASS	GROUP ART UNIT	ATTORNEY DOCKET NO.
11/13/2019	424	1647	098065-0249
RULE			

APPLICANTS

DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, Tokyo, JAPAN

INVENTORS

Atsuko SAITO, Tokyo, JAPAN

Tsuyoshi HIRATA, Tokyo, JAPAN

Kensuke NAKAMURA, Tokyo, JAPAN

CONTINUING DATA

This application is a 371 of PCT/JP2018/018572 05/14/2018

FOREIGN APPLICATIONS

JAPAN JP2017-096749 05/15/2017

IF REQUIRED, FOREIGN LICENSE GRANTED**

02/24/2020

STATE OR COUNTRY

JAPAN

ADDRESS

FOLEY & LARDNER LLP

3000 K STREET N.W.

SUITE 600

WASHINGTON, DC 20007-5109

UNITED STATES

FILING FEE RECEIVED

\$2,520

WEST Search History for Application 16613203

Creation Date: 2022050611:32

Prior Art Searches

Query	DB	Hits	Op.	Plur.	Thes.	Date
(A61K47/6803 or A61K31/4745 or A61K47/6849 or A61P35/00 or C07K16/28 or C07K2317/24 or C07K2317/40 or C07K2317/41 or C07K2317/565 or C07K2317/732 or C07K2317/76 or C07K2317/77).cpc.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	286821	AND	YES		01-28-2022
"cadherin 6"	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	607	AND	YES		01-28-2022
cdh6	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	788	AND	YES		01-28-2022
(cdh6) or ("cadherin 6")	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	1183	AND	YES		01-28-2022
(cdh6 or "cadherin 6") and ((A61K47/6803 or A61K31/4745 or A61K47/6849 or A61P35/00 or C07K16/28 or C07K2317/24 or C07K2317/40 or C07K2317/41 or C07K2317/565 or C07K2317/732 or C07K2317/76 or C07K2317/77).cpc.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	462	AND	YES		01-28-2022
(cdh6 or "cadherin 6") with internalize\$	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	9	AND	YES		01-28-2022
		9	AND	YES		01-28-2022

(cdh6 or "cadherin 6" with internalize\$) with antibod\$	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI					
"cadherin 6".clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	32	AND	YES		01-28-2022
cdh6.clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	84	AND	YES		01-28-2022
(cdh6.clm.) or ("cadherin 6".clm.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	108	AND	YES		01-28-2022
(cdh6.clm. or "cadherin 6".clm.) and antibody.clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	54	AND	YES		01-28-2022
(cdh6.clm. or "cadherin 6".clm. and antibody.clm.) and internalize\$.clm.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	0	AND	YES		01-28-2022
(saito or hirata or nakamura).in.	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	883074	AND	YES		01-28-2022
((saito or hirata or nakamura).in.) and (cdh6.clm. or "cadherin 6".clm. and antibody.clm.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB,	4	AND	YES		01-28-2022

	JPAB, DWPI					
(cdh6 or "cadherin 6" with internalize\$ with antibod\$) not ((saito or hirata or nakamura).in.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	5	AND	YES		01-28-2022
(cdh6 or "cadherin 6" with internalize\$ with antibod\$ not (saito or hirata or nakamura).in.) or ((saito or hirata or nakamura).in. and cdh6.clm. or "cadherin 6".clm. and antibody.clm.)	PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB, DWPI	9	AND	YES		01-28-2022
(saito or hirata or nakamura).in.	PGPB, USPT	108715	AND	YES		05-06-2022
"cadherin 6"	PGPB, USPT	565	AND	YES		05-06-2022
cdh6	PGPB, USPT	750	AND	YES		05-06-2022
(cdh6) or ("cadherin 6")	PGPB, USPT	1119	AND	YES		05-06-2022
(cdh6 or "cadherin 6") .clm.	PGPB, USPT	119	AND	YES		05-06-2022
(cdh6 or "cadherin 6" .clm.) and ((saito or hirata or nakamura).in.)	PGPB, USPT	4	AND	YES		05-06-2022
(cdh6 or "cadherin 6" .clm. and (saito or hirata or nakamura).in.) and monoclonal.clm.	PGPB, USPT	0	AND	YES		05-06-2022
(cdh6 or "cadherin 6") with monoclonal	PGPB, USPT	17	AND	YES		05-06-2022
(cdh6 or "cadherin 6" with monoclonal) and internalize\$	PGPB, USPT	11	AND	YES		05-06-2022
pqstyqfktpepppgtpig\$	PGPB, USPT	4	AND	YES		05-06-2022
(pqstyqfktpepppgtpig\$) and (cdh6 or "cadherin 6" with monoclonal and internalize\$)	PGPB, USPT	4	AND	YES		05-06-2022

To: ipdocketing@foley.com,,
From: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Cc: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Subject: Private PAIR Correspondence Notification for Customer Number 22428

May 11, 2022 04:43:22 AM

Dear PAIR Customer:

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109
UNITED STATES

The following USPTO patent application(s) associated with your Customer Number, 22428 , have new outgoing correspondence. This correspondence is now available for viewing in Private PAIR.

The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

Disclaimer:

The list of documents shown below is provided as a courtesy and is not part of the official file wrapper. The content of the images shown in PAIR is the official record.

Application	Document	Mailroom Date	Attorney Docket No.
16613203	NOA	05/11/2022	098065-0249
	1449	05/11/2022	098065-0249

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://sportal.uspto.gov/secure/myportal/privatepair>.

If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov with 'e-Office Action' on the subject line or call 1-866-217-9197 during the following hours:

Monday - Friday 6:00 a.m. to 12:00 a.m.

Thank you for prompt attention to this notice,

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
COMMISSIONER FOR PATENTS
P.O.BOX 1450
ALEXANDRIA VA 22313-1451

PRESORTED
FIRST-CLASS MAIL
U.S. POSTAGE PAID
POSTEDIGITAL
NNNNN

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109



**Courtesy Reminder for
Application Serial No: 16/613,203**

Attorney Docket No: 098065-0249
Customer Number: 22428
Date of Electronic Notification: 05/11/2022

This is a courtesy reminder that new correspondence is available for this application. If you have not done so already, please review the correspondence. The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

An email notification regarding the correspondence was sent to the following email address(es) associated with your customer number:
ipdocketing@foley.com

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://ppair-my.uspto.gov/pair/PrivatePair>. If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov or call 1-866-217-9197.

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: May 19, 2022 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1647
				Examiner Name	LANDSMAN, ROBERT S
Sheet	1	of	1	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	E1	ALTSHULER, E.P. ET AL., "Generation of Recombinant Antibodies and Means for Increasing Their Affinity," Advances in Chemistry, vol. 50, pp.203-258.	✓
	E2	JARILIN, A.A., Fundamentals of Immunology: Textbook - Publishing House "Meditsina," 1999, 608c., p.171-173.	✓
	E3	Office Action issued in corresponding Mexican Patent Application No. MX/a/2019/013597 dated March 4, 2022.	✓
	E4	Office Action issued in corresponding Russian Patent Application No. 2019141268 dated February 22, 2022.	✓
	E5	SINGER, M. and BERG, P., Genes and Genomes: 2 volumes, vol 1, translation from English M.: Mir, 1998. - 373p., ill.; pp.63-64.	✓
	E6	UNIPROT: locus CADH9_MOUSE, access P70407, 25.11.2002, Accessed via the Internet at: https://www.uniprot.org/uniprot/P70407 .	

Examiner Signature		Date Considered	
--------------------	--	-----------------	--

Успехи биологической химии, т. 50, 2010, с. 203–258

ПОЛУЧЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ И СПОСОБЫ УВЕЛИЧЕНИЯ ИХ АФФИННОСТИ

© 2010 г. Е. П. АЛЬТШУЛЕР, Д. В. СЕРЕБРЯНАЯ,
А. Г. КАТРУХА

*Кафедра биохимии биологического факультета Московского
государственного университета им. М.В.Ломоносова, Москва.*

I. Введение. II. Антитела: строение, функции, аффинное созревание в организме, практическое применение. III. Рекомбинантные антитела: производные и фрагменты, методы получения, практическое значение. IV. Увеличение аффинности антител. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Открытие метода получения моноклональных антител с использованием гибридомной технологии Келлером и Милштейном в 1975 г. оказало огромное влияние на развитие фундаментальной науки и клинической практики. Благодаря уникальному свойству специфично и с высоким сродством взаимодействовать с антигенами, моноклональные антитела начали активно использовать для научных исследований и терапии различных заболеваний. На сегодняшний день, антитела составляют приблизительно одну треть от общего

Принятые сокращения: Ig – иммуноглобулины; IgG – иммуноглобулины класса G; LC – легкая цепь иммуноглобулинов (light chain); HC – тяжелая цепь иммуноглобулинов (heavy chain); V_H – переменный домен тяжелой цепи (variable domain of the heavy chain); V_L – переменный домен легкой цепи (variable domain of the light chain); Fv – переменный участок (variable fragment); FR – каркасные участки молекулы антитела (framework regions); CDR – участки молекулы антитела, распознающие антиген (complementarity determining regions); SDR – аминокислотные остатки CDR, определяющие специфичность взаимодействия с антигеном (specificity determining regions); C_H – константный домен тяжелой цепи (constant domain of the heavy chain); C_L – константный домен легкой цепи (constant domain of the light chain); Fab-фрагмент – антиген-связывающий фрагмент антитела (fragment, antigen-binding); Fc – кристаллизуемый фрагмент антитела (fragment, crystallizable); а.о. – аминокислотный остаток; м.м. – молекулярная масса.

Адрес для корреспонденции: DariaSerebryanaya@gmail.com

количества белков, используемых в терапии различных заболеваний в развитых странах [1].

В течение последних 15 лет развитие технологий получения рекомбинантной (искусственно созданной) ДНК и создание комбинаторных библиотек генов, а также появление разнообразных биоинформатических ресурсов и методов компьютерного моделирования трехмерных структур белковых молекул сделало возможным получение рекомбинантных антител. Рекомбинантные технологии позволяют путем искусственного внедрения в последовательность антител разнообразных модификаций изменять их биохимические и иммунохимические свойства [2], в том числе и изменять (увеличивать) аффинность антител. Несомненным достоинством рекомбинантных технологий является то, что с их помощью можно не только получать рекомбинантные аналоги уже существующих антител, но и создавать антитела, специфичные к различным антигенам, *de novo*.

В настоящее время опубликовано много обзорных статей, посвященных различным методам создания рекомбинантных антител [2–9]. Однако, как нам кажется, в этих публикациях не уделяется достаточно внимания проблеме и методологии искусственного повышения аффинности рекомбинантных антител. Данный обзор включает в себя две основные части. В первой подробно рассмотрены строение, способы получения и практическое применение рекомбинантных антител и их фрагментов. Во второй систематизированы основные подходы, используемые для получения высокоаффинных рекомбинантных антител, — от методов случайного и направленного мутагенеза до технологии рекомбинации генов антител. Особое внимание авторы уделили методам компьютерного моделирования, позволяющим предсказывать трехмерную структуру антител и идентифицировать аминокислоты, которые вносят наибольший вклад во взаимодействие молекул антитела и антигена и могут быть заменены другими а.о. для создания антител с увеличенным аффинитетом.

II. АНТИТЕЛА: СТРОЕНИЕ, ФУНКЦИИ, АФФИННОЕ СОЗРЕВАНИЕ В ОРГАНИЗМЕ, ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

Антитела (иммуноглобулины) — это семейство гликопротеинов, представленных в плазме крови и тканевых жидкостях позвоночных, способных распознавать и связывать чужеродные для организма вещества (антигены). Участок антигена, с которым взаимодействует антитело, называется эпитопом, а участок антитела, за счет которого

оно взаимодействует с антигеном, – паратопом [10]. В данной главе рассматриваются особенности строения антител на примере иммуноглобулинов класса G, их основные функции, процесс их аффинного созревания в организме, а также, некоторые аспекты применения антител в научных исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний.

СТРОЕНИЕ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

У большинства млекопитающих обнаружены 5 различных классов иммуноглобулинов (Ig): IgG, IgA, IgM, IgD и IgE. Антитела разных классов различаются по размеру, заряду белковой молекулы, аминокислотному составу и содержанию углеводного компонента. IgG в норме преобладают в сыворотке крови человека и составляют приблизительно 70–75% от общего количества сывороточных антител [10–12]. Молекула антитела класса IgG построена из четырех полипептидных цепей: двух одинаковых тяжелых цепей (heavy chain, HC) с молекулярной массой 50–77 кДа и двух идентичных легких (light chain, LC) с м.м. 25 кДа (рис. 1). В состав каждой LC входит два домена – один вариабельный (V_L , variable domain of the light chain) и один константный (C_L , constant domain of the light chain), а в состав каждой HC – один вариабельный (V_H , variable domain of the heavy chain) и три константных (C_H 1–3, constant domains of the heavy chain) домена. Каждый из доменов в основном представляет собой β -складчатую структуру, сформированную из 7 антипараллельных β -складок, образующих два β -листа. Структура каждого иммуноглобулинового домена стабилизирована за счет внутридоменной дисульфидной связи. Кроме того, дисульфидные связи соединяют легкие цепи с тяжелыми, а также тяжелые цепи между собой. Каждая пара вариабельных доменов V_H и V_L , расположенных в соседних тяжелой и легкой цепях, образует вариабельный фрагмент (Fv, variable fragment). Уровень вариабельности а.о. внутри вариабельных доменов распределен неравномерно. Он наиболее высок в коротких, так называемых «гипервариабельных» областях – CDR (complementarity determining regions), определяющих комплементарность антитела антигену. В вариабельных доменах тяжелой и легкой цепей выделяют по три CDR (V_L CDR1–3, V_H CDR1–3). В последовательности вариабельного домена эти области чередуются с четырьмя относительно инвариантными «каркасными» участками (FR – framework region, FR1–FR4), на долю которых приходится около 80% аминокислотной последовательности V-доменов. Роль таких участков заключается в поддержании относительно однотипной трехмерной структуры V-доменов, которая

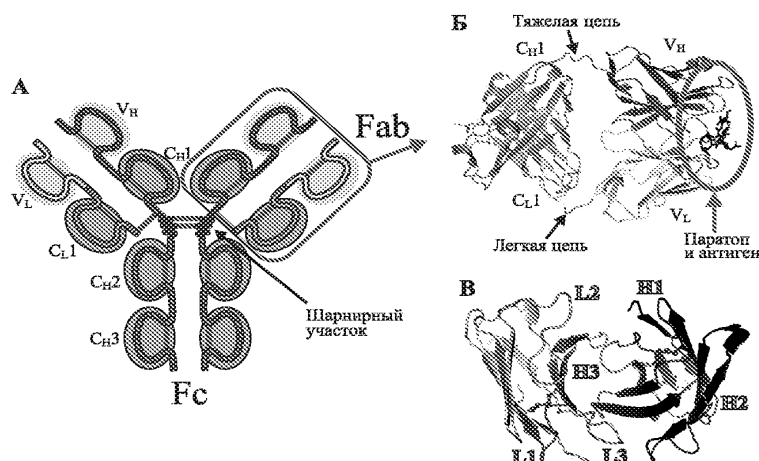


Рис. 1. Строение молекулы иммуноглобулина класса G.

А) Общая схема. Молекула IgG состоит из двух легких цепей (LC) и двух тяжелых цепей (HC). Каждая LC состоит из вариабельного (V_L) и константного домена (C_{L1}), а каждая HC состоит из одного вариабельного (V_H) и трех константных доменов (C_{H1-3}). В структуре Ig выделяют два фрагмента: антиген-связывающий Fab-фрагмент и Fc-фрагмент, выполняющий эффекторную функцию. Структура Ig стабилизирована благодаря наличию дисульфидных связей (отмечены красными линиями), соединяющих LC и HC, а также HC между собой. Также дисульфидные связи имеются внутри каждого из доменов.

Б) Взаимодействие антигена с Fab-фрагментом антитела (трехмерная структура Fab-фрагмента 1CFN из базы данных PDB).

В состав Fab-фрагмента входит LC и N-концевой участок HC, включающий домены V_H и C_{H1} . Каждый Fab-фрагмент содержит участок связывания антигена (паратоп), расположенный в области вариабельных доменов легкой и тяжелой цепей. CDR-петли отмечены на рисунке красным цветом.

В) Строение антиген-связывающего участка (трехмерная структура Fab-фрагмента 1CFN из базы данных PDB).

Антигенсвязывающий участок каждого Fab-фрагмента состоит из а.о., входящих в состав шести гипервариабельных петель (CDR-петель), расположенных на поверхности вариабельных доменов LC и HC. На рисунке гипервариабельные петли отмечены цветом (L1–3 – CDR-петли, входящие в состав LC в порядке их расположения в последовательности, H1–3 – CDR-петли, входящие в состав HC).

необходима для обеспечения аффинного взаимодействия гипервариабельных участков с антигеном [10, 12].

Вариабельные домены легкой и тяжелой цепи (V_H и V_L) вместе с ближайшими к ним константными доменами (C_H1 и C_L1) образуют Fab-фрагменты антител (fragment, antigen binding). Остальную часть, представленную С-концевыми константными доменами тяжелых цепей, обозначают как Fc-фрагмент (fragment, crystallizable). На границе Fab и Fc фрагментов располагается «шарнирная область», которая за счет своей гибкой структуры обуславливает подвижность фрагментов молекулы антитела относительно друг друга и содержит дисульфидные связи, соединяющие тяжелые цепи между собой [10, 12].

Как уже упоминалось выше, ключевую роль во взаимодействии антигена и антитела выполняют CDR. Эти гипервариабельные участки представляют собой петли, расположенные между β -складками, сильно отличающиеся по аминокислотной последовательности и протяженности у различных антител. CDR обеспечивают комплементарность поверхностей паратопа и эпитопа, что обуславливает антиген-узнающую активность апикальных регионов вариабельных доменов. Основой взаимодействия антитела и антигена является распознавание трехмерной структурой, формируемой из шести петель CDR, комплементарного ей эпитопа на поверхности антигена. В случае антител, специфичных к небольшим антигенам (таким, как низкомолекулярные соединения) во взаимодействии с антигеном участвуют только некоторые из CDR [13]. Как правило, V_H CDR (и особенно V_H CDR3) вносят больший вклад в образование контактов с антигеном, чем V_L CDR, и геометрический центр контакта антигена и антитела обычно расположен вблизи от V_H CDR3 [13]. А.о. CDR, непосредственно участвующие в контакте с антигеном, называют участками, определяющими специфичность (specificity determining regions, SDR). Анализируя трехмерную структуру комплекса антитела и антигена можно идентифицировать а.о., находящиеся в прямом контакте с антигеном. Считается, что FR также могут принимать участие в распознавании антигена, но в меньшей степени (доля поверхности таких участков от контактирующих поверхностей антигена и антитела может составлять до 15%) [13–15].

Для комплексов антитело-антиген характерна высокая комплементарность структур взаимодействующих поверхностей. Площадь поверхности взаимодействия антигена белковой природы и антитела варьирует от 1400 до 2300 Å² с приблизительно равным вкладом со стороны антитела (650–900 Å²) и антигена [16]. Во взаимодействие с антителом вовлечено, как правило, от 5 до 15 а.о. антигена белко-

вой природы и приблизительно столько же а.о. молекулы антитела [16–17]. Однако антигены меньшего размера, такие, как низкомолекулярные соединения, имеют меньшую площадь контакта при связывании с антителом. Форма контактирующей поверхности антигена с антителом в значительной степени зависит от размера антигена. С уменьшением размера антигена контактирующая поверхность антитела становится более вогнутой. Контактующая поверхность антител, связывающих белковые молекулы, как правило, плоская, тогда как поверхность связывания более мелких антигенов представляет собой бороздку (в случае пептидов) или одиночную полость (в случае низкомолекулярных веществ непептидной природы) [13, 18]. Пространственная структура антигенсвязывающего участка определяется протяженностью и аминокислотным составом CDR-петель. Для петель CDR3 характерна значительная гибкость, которая определяет возможность взаимной адаптации эпитопа и паратопа. Для антигенов небольшого размера, в том числе пептидов, конформационная гибкость антител может быть более выраженной, чем для антигенов белковой природы. К основным типам конформационной подвижности относят согласованные перемещения нескольких CDR-петель и изменения положения боковых групп отдельных а.о. CDR. Для антигенов также характерно изменение конформации при взаимодействии с антителами.

Взаимодействие между а.о. эпитопа и паратопа осуществляется преимущественно благодаря водородным связям, ионным взаимодействиям и, в меньшей степени, Ван-дер-Ваальсовым взаимодействиям [13, 19]. В нескольких работах показано, что в структурах многих комплексов антигенов белковой природы и антител в области паратопа присутствуют молекулы воды, входящие в общую структуру. Предполагается, что в таких комплексах молекулы воды необходимы для «заполнения» дефектов комплементарности между белковой молекулой и антителом [18, 20–21].

В основном, энергия связывания антитела и антигена обусловлена небольшим количеством взаимодействий между а.о. эпитопа и паратопа. Замена таких а.о. в природных вариантах антигена или антител на аланин часто приводит к резкому ослаблению связывания антитела и антигена (см. далее). Выбор именно аланина в качестве возможной замены можно объяснить тем, что это – наиболее мягкий способ устранения взаимодействий, обусловленных боковой группой аминокислоты, при этом не вносящий дополнительных взаимодействий. В результате экспериментов по картированию эпитопа и паратопа были выявлены так называемые «горячие

точки» – а.о., вклад которых во взаимодействие антигена и антитела наиболее велик. Такие а.о. часто располагаются в центральной части участка взаимодействия эпитопа и паратопа. Периферические а.о., контактирующие с водной средой, как правило, вносят значительно меньший вклад в энергию связывания антитела с антигеном [16]. Кроме а.о., непосредственно вовлеченных во взаимодействие с антигеном, важную роль в распознавании антигена играют а.о., выполняющие структурную функцию и обеспечивающие правильное взаимное расположение в пространстве контактирующих поверхностей. Эти остатки поддерживают необходимую для взаимодействия с антигеном конформацию CDR-петель [22].

ФУНКЦИИ ИММУНОГЛОБУЛИНОВ

Антитела синтезируются В-лимфоцитами в ответ на появление антигенов в организме позвоночных или человека. В работе иммунной системы антитела участвуют в нескольких процессах: 1) предотвращение попадания чужеродных (в том числе и патогенных) молекул в клетки и их разрушение за счет образования комплексов с антителами, 2) стимуляция уничтожения чужеродных объектов макрофагами и другими клетками путем взаимодействия антител с их поверхностными антигенами (опсонизация), 3) запуск механизмов разрушения чужеродных частиц за счет стимуляции иммунного ответа (активация системы комплемента).

Антитела всех изотипов выполняют две основные функции: 1) распознавание и связывание антигена, 2) эффекторные функции, к которым относят связывание с мембранными рецепторами клеток организма (например, фагоцитов) и взаимодействие с первым компонентом системы комплемента для инициации классического пути каскада комплемента. Для эффективного выполнения функции узнавания и связывания антитела должны иметь высокую специфичность, чтобы распознавать только конкретный антиген, и высокую аффинность, чтобы комплекс антитела и антигена был стабильным. В реализации первой функции принимают участие переменные домены антитела. Задачей константных доменов является поддержание необходимой структуры антигенсвязывающих переменных доменов, а также выполнение эффекторных функций, способствующих нейтрализации и устранению потенциальных патогенов. Для нейтрализации некоторых вирусов и токсинов достаточно только взаимодействия с антителом, тогда как для устранения патогенных микроорганизмов или собственных клеток, вышедших из-под контроля организма, требуется запуск других эффекторных механизмов, таких как фагоцитоз

и цитотоксические реакции. В этом случае Fab-фрагменты антител связываются с антигенами, расположенными на поверхности клеток, а Fc-фрагменты таких антител могут взаимодействовать с белками системы комплемента, служащими для уничтожения клеток путем перфорации мембраны, либо с Fc-клеточными рецепторами, локализованными на поверхности клеток иммунной системы, способных к фагоцитозу [23]. Таким образом, благодаря наличию в молекуле антитела и Fc фрагмента и Fab фрагментов, антитела способны и распознавать антиген, и активировать систему уничтожения чужеродных веществ и некоторых собственных клеток.

Для успешного выполнения функции узнавания и связывания каждого конкретного антигена антитела должны пройти процесс аффинного созревания.

АФФИННОЕ СОЗРЕВАНИЕ АНТИТЕЛ В ОРГАНИЗМЕ

Благодаря огромному разнообразию центров связывания антитела обеспечивают распознавание миллионов различных антигенов. Информация о различных вариантах последовательности антител не закодирована в геноме заранее, а создается в В-лимфоцитах путем рекомбинации ограниченного количества генных сегментов. В геномах человека и мыши имеются семейства генов иммуноглобулинов класса G, сгруппированные в три независимых генетических локуса: два, кодирующие легкие цепи IgG, и один, кодирующий тяжелую цепь IgG. Каждое из этих семейств включает множество генов, кодирующих переменные домены, и единичные гены, кодирующие константные домены. Эти группы генов находятся на значительном расстоянии друг от друга. На первом этапе, образование LC и HC происходит в результате рекомбинации генов, кодирующих один переменный и один константный участок IgG. Между V- и C-генами находятся последовательности D и J, кодирующие небольшие фрагменты полипептидной цепи, входящие в состав переменной области. В ходе созревания В-лимфоцитов происходит рекомбинация V, D и J генов, в результате которой участки последовательности, кодирующие переменные и константные домены, а также промоторы, находящиеся перед каждым геном, и энхансеры, находящиеся в интроне между J- и C-сегментами и в дистальной области за C-генами, сближаются. Таким образом, в результате рекомбинации образуется транскрипционная единица, содержащая интроны и экзоны. В результате сплайсинга из первичного РНК-транскрипта вырезаются интроны, а экзоны образуют молекулу мРНК, с которой впоследствии транслируется белок [24]. Таким образом создается

молекулярное разнообразие центра узнавания, локализованного на непрерывной поверхности, формируемой CDR-петлями. Полученные в результате этого процесса антитела называются первичными (germ-line antibodies) и обладают относительно низкой аффинностью, а также не очень высокой специфичностью по отношению к их антигенам [13, 25].

На следующем этапе созревания антител и аффинность, и специфичность первичных антител увеличивается. Это происходит в результате соматической гипермутации вариабельных участков антител. Соматическая гипермутация – это циклы генерации множества вариантов антител, возникающих за счет появления случайных точечных мутаций в генных сегментах, сопровождаемые отбором наиболее удачных клонов. Отбор клонов в иммунной системе при соматической гипермутации происходит следующим образом. Мембранная форма иммуноглобулинов, иммобилизованная на поверхности В-клеток, взаимодействует со своим антигеном. Полученный комплекс антитело–антиген подвергается интернализации, после чего антиген подвергается процессингу и производные от антигена пептиды взаимодействуют с главным комплексом гистосовместимости II (major histocompatibility complex II) и презентуются Т-клетками. Затем происходит презентация антигена Т-клетками, сопровождающаяся активацией В-клеток. Если аффинность антител, расположенных на поверхности В-клетки, недостаточно высока, то за время, необходимое для интернализации, антиген успевает диссоциировать от антитела и в этом случае активации данной В-клетки не происходит. Если же время жизни комплекса антитело–антиген значительно превышает время, необходимое для интернализации, то происходит активация В-лимфоцита. Однако при этом оказывается, что иммунная система не способна осуществлять дальнейший отбор наиболее аффинных среди нескольких вариантов высокоаффинных антител. Мутации происходят как в CDR-петлях, так и в FR-участках, причем неравномерно, со средней частотой 1 на 10^3 пар оснований за один цикл генерации. В результате, происходит увеличение разнообразия иммуноглобулинов, созданного рекомбинацией генных сегментов. Полученные антитела называют «зрелыми» (mature antibodies) [25–26].

Как показали исследования механизмов соматической гипермутации, при созревании антител мутации в вариабельных доменах возникают большей частью в определенных участках CDR и FR. Эти участки называют «горячими точками мутагенеза» («hot spots»), а участки, редко вовлекаемые в процесс мутагенеза, называют «холодными точками мутагенеза» («cold spots»). Обычно а.о., входящие в

состав «холодных точек мутагенеза», совпадают с а.о., играющими важную роль в формировании конформации переменного домена. Известно, что горячие точки в 50–60% случаев располагаются внутри консенсусной последовательности нуклеотидов RGYW (R = A или G, Y = C или T, W = A или T) и сериновых кодонов AGC и AGT или в соседних с ними нуклеотидах [27–28]. Среди других тринуклеотидов, а также динуклеотидов, существует иерархия подверженности мутагенезу, причем мутации в V-генах происходят в миллионы раз чаще, чем спонтанные мутации в других генах. В CDR- и FR-участках наблюдаются различия в составе кодонов, причем в CDR встречаются кодоны, в которых наиболее часто происходят мутации [25]. В первичной популяции антител различия в аминокислотной последовательности сосредоточены в основном в центре антигенсвязывающего сайта, а за счет соматической гипермутации различия также распространяются на периферическую часть антигенсвязывающего участка [29].

При вторичном иммунном ответе для антител класса IgG, специфичных к белковым антигенам, характерны значения константы диссоциации (K_D) в диапазоне 10^{-7} – 10^{-10} M^{-1} . Максимально возможная скорость образования комплекса антитела с антигеном определяется скоростью диффузии белковых молекул. Константа скорости ассоциации (k_a) в этом случае составляет порядка 10^6 $M^{-1}s^{-1}$. Константа скорости диссоциации комплекса (k_d) может достигать до 10^{-4} s^{-1} и ее величина определяется за счет отбора вариантов первичных антител *in vivo* [8, 30]. Т.к. согласно гипотезе о максимальном значении аффинности («affinity ceiling») [30–32], отбор антител с более высокой аффинностью происходит уже менее эффективно, а дальнейшее увеличение аффинности уже не приводит к увеличению эффективности отбора. Это связано с тем, что для антител с $K_D = 10^{-10}$ M^{-1} время полужизни комплекса антигена с В-клеточным рецептором составляет 30 мин. Это в 2–3 раза больше, чем время эндоцитоза комплекса антитела с В-клеточным рецептором (около 8.5 мин.). В результате, дальнейшее увеличение аффинности (времени полужизни комплекса) уже не способствует адаптивному увеличению пролиферации В-клеток [31, 33]. Поэтому, теоретически, искусственный мутагенез, схожий с соматической гипермутацией, и искусственный отбор наиболее аффинных вариантов антител могут приводить к созданию антител с более высокой аффинностью по сравнению с природными антителами.

Для первичных антител процесс ассоциации с антигеном сопровождается увеличением энтальпии (за счет многочисленных слабых

и сильных взаимодействий между антителом и антигеном), и в то же время уменьшением энтропии (потеря подвижности, которая имеет место в структуре свободного антитела). В случае диссоциации наблюдается обратная ситуация (энтальпия системы снижается, а энтропия возрастает). Относительное увеличение аффинности конечных вариантов антител происходит за счет устранения энтропийных затруднений путем уменьшения подвижности свободного состояния антитела [13]. Первичные антитела, как правило, обладают большей гибкостью и подвижностью антигенсвязывающих петель. Это позволяет им узнавать набор из сходных антигенов посредством формирования различных вариантов комплементарных поверхностей за счет гибкой структуры петель. Взаимодействие первичных антител с антигеном может быть описано моделью «индуцированного взаимодействия», когда строение эпитопа в процессе связывания влияет на формирование комплементарного паратопа. Однако в процессе созревания антител, сопровождающимся увеличением их аффинности и специфичности, гибкость антигенсвязывающих петель снижается и процесс взаимодействия антитела с антигеном становится все более идентичным модели «ключ-замок». При этом участок связывания антигена после его созревания теряет подвижность и остается в конформации, которая лучшим образом соответствует конкретному эпитопу. Таким образом благодаря уменьшению подвижности петель антигенсвязывающего участка происходит увеличение аффинности и специфичности антитела [34]. С другой стороны для некоторых антител увеличение конформационной подвижности позволяет увеличить пространственное соответствие паратопа эпитопу путем индуцированного взаимодействия. Этот эффект позволяет объяснить увеличение аффинности некоторых антител при внедрении глицина в последовательности CDR, который увеличивает конформационную подвижность без существенного изменения поверхности взаимодействия с антигеном [35–37].

У большинства белков основную часть сохраняющихся аминокислотных замен составляют консервативные мутации, т.е. замены на аминокислоты со сходными физико-химическими свойствами, что имеет меньше шансов нарушить конформацию белка. Однако это правило не всегда справедливо для вариабельных доменов антител, поскольку замены на а.о. с противоположными свойствами иногда приводят к увеличению аффинности антител. Как правило, это относится к мутациям в CDR-участках, но иногда и к FR-мутациям, поскольку FR-остатки играют важную роль в формировании и поддержании стабильности структуры белка, что также может

оказывать влияние на аффинность. В целом, для FR-участков более характерно возникновение консервативных мутаций, а для CDR — неконсервативных мутаций, сопровождающихся существенными изменениями физико-химических свойств. При этом для а.о., расположенных внутри молекулы, более характерны консервативные мутации, чем для а.о., доступных растворителю. Как правило, доступные растворителю а.о. CDR в ходе созревания антител подвергаются замене на гидрофильные, полярные и поляризуемые а.о. для увеличения их потенциала взаимодействия с антигеном. Хотя теоретически для каждой аминокислотной позиции существует 19 вариантов замены, круг наблюдаемых мутаций значительно сужен за счет энергетических препятствий, вырожденности генетического кода и того, что большинство аминокислотных замен являются следствием замены одного нуклеотида. Кроме того, транзиции (замены пуринового основания на пуриновое или пиримидинового на пиримидиновое) преобладают над трансверсиями (замены пуринового основания на пиримидиновое или пиримидинового на пуриновое). Как правило, транзиции происходят в два раза чаще, чем трансверсии, поэтому число возможных вариантов замен в каждой позиции понижается до 13–15 [5, 25, 38].

Аффинность зрелых антител определяется мутациями, привнесенными в последовательность первичных антител. Как правило, антитела, имеющие в составе паратопа большее количество остатков, способных к образованию водородных связей и ионных взаимодействий, демонстрируют большее сродство к антигену [25]. К увеличению аффинности могут также приводить мутации, способствующие образованию связей антитела и антигена через молекулы воды («водные мостики») [13]. При этом наблюдается усиление гидрофобных и Ван-дер-Ваальсовых взаимодействий на периферии за счет увеличения площади гидрофобной поверхности. Подобное усиление гидрофобных взаимодействий является следствием небольших скоординированных перестроек а.о. на периферии контактирующей поверхности, тогда как наиболее важный с энергетической точки зрения центр взаимодействия остается неизменным. Соматическая гипермутация приводит не только к увеличению аффинности путем замен в участке связывания антигена, но также к увеличению силы взаимодействия между V_L – V_H доменами, тем самым увеличивая стабильность и уменьшая пластичность молекулы антитела. В то же время, эти изменения приводят к улучшению связывания антитела с антигеном [37, 39–41]. Количество соматических мутаций, возникающих в процессе созревания антител, положительно коррелирует со степенью увеличения аффинности [13, 32, 42]. Можно сказать, что

замены, возникающие в ходе соматической гипермутации с одной стороны увеличивают химическую активность остатков CDR, а с другой – поддерживают их структуру.

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ И ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ АНТИТЕЛ

Антитела широко используются как в научных исследованиях, так и в практической медицине благодаря их способности с высокой аффинностью и специфичностью узнавать практически любой антиген.

Самый простой способ получения антител, специфичных к какому-либо антигену, это иммунизация – введение антигена в смеси с определенными добавками – адъювантами, усиливающими иммунный ответ, в организм животного (мышь, кролик, коза, овца, и др.). Из крови иммунизированного животного можно выделить поликлональные антитела – гетерогенную по строению, эпитопной специфичности и аффинности популяцию антител, специфичных к введенному антигену. Чтобы получить идентичные по своей структуре и специфичности антитела, необходимо выделить из организма животного продуцирующие антитела лимфоциты, и immortalizировать их, т.е. сделать способными к бесконечному количеству делений. immortalization осуществляется путем слияния лимфоцитов с опухолевыми клетками. Линия клеток, представляющих собой продукт слияния лимфоцита и опухолевой клетки, называется гибридомой. Гибридома способна секретировать антитела, абсолютно одинаковые по своим свойствам (строение, аффинитет, специфичность). Антитела, продуцируемые линией гибридомных клеток, называются моноклональными [43].

Антитела являются одним из наиболее распространенных инструментов современной биохимии, цитологии и клинической химии. С их помощью можно проводить качественное и количественное определение содержания различных веществ методами иммуноферментного анализа [44–45] и иммуноблоттинга [46], изучать внутриклеточную и внеклеточную локализацию белков, исследовать распределение и уровень экспрессии белков в различных клетках организма методами иммуногистохимии и иммуноцитохимии. Антитела также могут быть использованы для сортировки клеток методом проточной цитометрии, а также для очистки различных белков.

В медицине антитела широко используют как в диагностических целях, так и для терапии различных заболеваний. В диагностике различные иммунохимические методы используются для установления наличия или определения концентрации белков, являющихся маркерами заболеваний. Список таких белков огромен и продолжает расти. К ним относятся белки-маркеры сердечно-сосудистых заболеваний

(тропонины I и T [47–51], креатинкиназа [52], миоглобин [53], натрийуретический пептид В и его предшественник [54–56] и др.), сахарного диабета (гликированный гемоглобин [57], микроальбумин, инсулин, проинсулин, С-пептид [58] и др.), раковых заболеваний [59], патологий при беременности, почечной недостаточности (цистатин С [60]), аутоиммунных заболеваний (антитела к компонентам собственных клеток организма [61]), аллергических состояний (общее содержание антител, содержание антител к определенным аллергенам), расстройств эндокринной системы (гормоны, их предшественники, продукты их метаболизма и взаимодействующие с ними белки [62–63]), инфекционных заболеваний различной природы [64–67] и др.

Кроме этого, антитела используют для определения группы крови [68], диагностики беременности [69] и измерения содержания лекарств или токсинов в крови человека, а также в продуктах питания.

Терапевтическое применение полноразмерных антител, получаемых из сыворотки иммунных животных или с использованием гибридомных технологий, существенно осложняется тем, что константные домены антител животных являются сильно иммуногенными для человека, что приводит к образованию собственных антител, специфичных к антителам животного [6]. Поэтому для терапевтических целей, как правило, используют рекомбинантные антитела или их фрагменты, полученные из моноклональных, с существенно сниженной за счет генно-инженерных манипуляций иммуногенностью, либо полученные *de novo* с использованием различных дисплейных методов (см. раздел «Практическое применение рекомбинантных антител в клинической практике и научных исследованиях»).

III. РЕКОМБИНАНТНЫЕ АНТИТЕЛА: ПРОИЗВОДНЫЕ И ФРАГМЕНТЫ, МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ, ПРАКТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Рекомбинантными антителами называют антитела, получаемые с использованием подходов генной инженерии. Использование генно-инженерных методов позволяет экспрессировать легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, как индивидуальные белки, создавать целый набор разнообразных фрагментов антител, а также изменять такие свойства антител, как аффинность, число и специфичность паратопов, состав доменов, подвижность молекулы, пространственную ориентацию участков связывания с антигеном, молекулярный вес, изоэлектрическую точку и потенциальную иммуногенность.

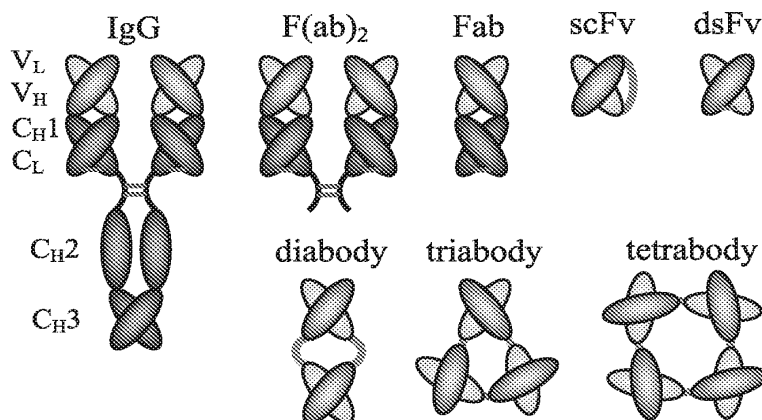


Рис. 2. Основные типы фрагментов и производных рекомбинантных производных антител.

Обозначения: V_L – переменный участок LC; V_H – переменный участок HC; C_L – константный участок легкой цепи; C_{H1} , C_{H2} , C_{H3} – константные участки тяжелой цепи; IgG – полноразмерный иммуноглобулин класса G. Светло-серыми линиями с окантовкой изображены дисульфидные связи между разными цепями, а темно-серыми – линкерные последовательности, вставляемые для стабилизации структуры рекомбинантных антител (по материалам статей [74–75]).

ТИПЫ РЕКОМБИНАНТНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ

В литературе описано получение нескольких различных типов рекомбинантных фрагментов антител (некоторые из них представлены на рис. 2). На сегодняшний день выделяют следующие типы рекомбинантных антител: Fv – переменный фрагмент антитела (*variable fragment*), scFv (single chain Fv) – переменный фрагмент антитела, у которого фрагменты легкой и тяжелой цепи связаны полипептидным линкером, (scFv)₂ – фрагмент, состоящий из двух молекул scFv, соединенных дисульфидной связью, dsFv – переменный фрагмент, стабилизированный дополнительной внутримолекулярной дисульфидной связью, Fab- и (Fab)₂ фрагменты (идентичные по своей структуре фрагментам, образующимся в результате протеолиза полноразмерных антител IgG типа под действием папаина и пепсина, соответственно [70]), V_H – переменный домен HC. Также следует упомянуть такие производные антител как «diabodies», «triabodies»,

«tetrabodies» – молекулы, состоящие из двух, трех или четырех одинаковых или различных фрагментов антител одинаковой или разной специфичности, соединенных между собой. Наименьшим фрагментом антитела, который может сохранять способность связывать антиген, является Fv фрагмент. Он состоит из переменных фрагментов легкой (V_L) и тяжелой цепей (V_H), каждый из которых стабилизирован внутримолекулярной дисульфидной связью. Однако между собой V_H и V_L контактируют только за счет ионных взаимодействий, что делает структуру этого фрагмента крайне нестабильной. Для повышения стабильности структуры Fv фрагментов используют либо введение межцепочечных дисульфидных связей (dsFv), либо – аминокислотной последовательности-линкера между переменными доменами HC и LC цепей (scFv), в результате чего антигенсвязывающая белковая молекула экспрессируется как одна полипептидная цепь [71–73].

Наиболее «простым» объектом для клонирования и экспрессии являются scFv фрагменты, однако часто они обладают более низкой стабильностью, иногда более низкой аффинностью и имеют более короткое время полужизни в кровотоке (при терапевтическом использовании) по сравнению с более крупными фрагментами [37, 74–78]. Комплексы, состоящие из двух («diabodies» или $(scFv)_2$), трех («triabodies») и четырех scFv- мономеров («tetrabodies») часто обладают еще большим сродством к антигену за счет увеличения количества антиген-связывающих участков. Это происходит в случае, когда scFv-момеры являются производными одинаковых антител, а антиген содержит большое количество идентичных эпитопов, или, в случае когда scFv-момеры являются производными разных антител к одному антигену, а все эпитопы антигена находятся в доступной для них близости. Фрагменты $(scFv)_2$, полученные в результате соединения дисульфидной связью C-концевых а.о. цистеина, при использовании их в качестве терапевтических агентов лучше транспортируются *in vivo* в ткани по сравнению с scFv –фрагментами. Это связано с большим временем их полужизни в кровотоке и, как следствие, большей стабильностью их структуры по сравнению с scFv. Рекombинантные производные антител, содержащие Fc-фрагмент, отличаются еще большим временем полужизни. Длительное нахождение таких производных антител в ткани обеспечивается взаимодействием с FcRB рецепторами (Fc Brambell receptor), расположенными на поверхности кроветворных клеток и клеток эндотелия. [79–80].

СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ
И ИХ ФРАГМЕНТОВ

Существует два принципиально разных подхода к получению рекомбинантных антител. Первый заключается в получении рекомбинантных аналогов моноклональных антител или их фрагментов, с использованием генетического материала из гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела. Второй подход связан с созданием множества вариантов последовательностей рекомбинантных антител (библиотек) с последующим отбором из них антител требуемой специфичности и аффинности, т.е. созданием антител необходимой специфичности *de novo*.

Создание рекомбинантных аналогов антител

Метод получения рекомбинантных антител или их фрагментов, идентичных антителам, полученным стандартным гибридным методом, включает в себя следующие основные стадии [81–84]: 1) выделение тотальной или матричной РНК из клеток гибридомы, секретирующей антитела, 2) проведение синтеза первичной цепи кДНК (обратная транскрипция), 3) амплификация кДНК тяжелых и легких цепей методом полимеразной цепной реакции [80], 4) получение молекулярно-генетических конструкций, содержащих полученные кДНК, 5) проведение экспрессии (или коэкспрессии) в подходящей экспрессионной системе [85], 6) выделение и очистка экспрессируемого белка [85]. Этот метод позволяет получать как полноразмерные антитела, так и их фрагменты, а также легкую и тяжелую цепи антител, как индивидуальные белки. Использование для получения антител генно-инженерных методов делает возможным манипуляции с нуклеотидной, и, как следствие, с аминокислотной последовательностью легкой и тяжелой цепей.

Создание рекомбинантных антител и их фрагментов de novo

Альтернативным подходом является *in vitro* метод получения рекомбинантных антител или их фрагментов с использованием отбора из библиотек их белковых фрагментов на основе способности связывать антиген [86]. Группа методов, используемых для решения такой задачи, носит название дисплейных. Важным достоинством этой группы методов является возможность работать одновременно с нуклеотидной и аминокислотной последовательностью каждого конкретного варианта антитела. Получение рекомбинантных фрагментов антител, с использованием такого подхода, включает три этапа: создание библиотек рекомбинантных ДНК антител, экспрессия и презентация

белковых фрагментов антител на поверхности клеток или фаговых частиц (в зависимости от того, какой дисплейный метод используют, см. далее) и отбор подходящих белковых фрагментов антител на основе их взаимодействия с антигеном. Если необходимо получить полноразмерное антитело, специфичное к соответствующему антигену, то сначала получают фрагмент антитела, а затем на его основе реконструируют полную нуклеотидную и аминокислотную последовательность антитела.

Принцип дисплея заключается в использовании объединенных в одном молекулярном комплексе нуклеотидной последовательности целевого белка и продукта его экспрессии. Такой метод позволяет отбирать необходимый генетический материал (ДНК или РНК) на основе способности продукта его экспрессии (иммуноглобулина или его фрагмента) к взаимодействию с данным антигеном. С использованием нескольких повторяющихся циклов отбора удастся получить антитела, взаимодействующие с антигеном с высоким сродством. Известны несколько «дисплейных» методов для получения антител — фаговый, рибосомный, мРНК и клеточный дисплей [9, 87–95]. Все эти подходы могут быть использованы не только для создания антител *de novo*, но и для улучшения параметров уже существующих антител (см. раздел «Увеличение аффинности антител»).

Как правило, для создания и тестирования библиотек антител за основу берут не полноразмерные антитела, а их фрагменты. Поскольку scFv фрагменты являются наименьшими стабильными единицами антитела, способными связывать антиген, их намного проще использовать для увеличения аффинности в любом виде дисплея, чем полноразмерные антитела или Fab-фрагменты. Существует несколько принципов создания библиотек рекомбинантных фрагментов антител [77]: 1) на основе генов антител, полученных из иммунизированных доноров (библиотека, обогащенная антителами к определенным антигенам), 2) на основе генов первичных антител (см. раздел «аффинное созревание антител в организме»), 3) на основе нуклеотидной последовательности антител, полученной из В-лимфоцитов [96], 4) на основе последовательностей наиболее стабильных переменных доменов антител с рандомизированными а.о. в CDR-петлях, синтезированных искусственно. [97].

Для отбора антител с нужными свойствами из огромного количества вариантов (как правило, 10^8 – 10^9), имеющих в библиотеке, используются технологии дисплея. Общей чертой всех этих методов является объединение нуклеотидной и аминокислотной последовательностей отбираемого фрагмента антитела в едином объекте,

а отличаются они типом такого объекта – от комплекса мРНК с синтезированным на ней белком-фрагментом антитела до клетки, несущей фрагмент антитела на своей поверхности. Наиболее распространенным и простым является фаговый дисплей, хотя в последнее время приобретают популярность недавно разработанные методы, такие как клеточный дисплей, рибосомный и мРНК-дисплей.

Клеточный дисплей

Особенностью клеточного дисплея является использование различных прокариотических или эукариотических клеточных систем как для экспрессии различных вариантов антител, так и для осуществления отбора по свойствам экспрессируемых антител. В этом случае создается библиотека гибридных ДНК, одновременно содержащих нуклеотидные последовательности фрагментов антител и трансмембранного домена одного из мембранных белков, а синтезируемые после трансформации (или трансфекции) клеток такой библиотекой антитела представляют собой гибридные белки, состоящие из экспонированного во внеклеточное пространство нативного фрагмента антитела и трансмембранного домена, с помощью которого фрагменты антител заякорены в мембране. Таким образом, клетка выполняет функции связующего звена между экспрессируемым вариантом антитела и кодирующими его генами. Для отбора клонов с наибольшей аффинностью используется вариант метода проточной цитометрии, названный сортировкой флуоресцентно-активированных клеток [90, 95] (fluorescence activated cell sorting, FACS). Этот метод заключается в том, что клетки, содержащие на поверхности фрагменты антител, подвергаются сортировке вместе с антигеном, меченым флуоресцентными красителями, испускающими сигнал при излучении. Различия в интенсивности флуоресценции, излучаемой клетками, помогают дифференцировать аффинные варианты от неаффинных и служат критерием для сортировки материала.

Клеточные дисплеи бывают как прокариотическими, так и эукариотическими. Для прокариотического дисплея характерна высокая эффективность трансформации и простота в использовании, однако область его применения ограничена, поскольку некоторые фрагменты антител, содержащие потенциальные сайты гликозилирования, будучи синтезированными в бактериальной системе, не являются функционально-активными. Для заякоривания синтезированных белковых молекул антител на поверхности бактериальных клеток было предложено использовать несколько трансмембранных белков. Эти трансмембранные белки используются для создания химерных белков, содержащих фрагмент антитела. Так, например, для заякори-

вания scFv-фрагментов антител часто используют белок внешней мембраны OmpA [90–91].

Эукариотический дисплей позволяет проводить экспрессию как различных фрагментов антител, так и полноразмерных вариантов антител, поскольку синтезированная в такой системе белковая молекула имеет необходимые для функционирования посттрансляционные модификации, специфичные для эукариот. Одним из наиболее распространенных видов такого дисплея является дрожжевой, поскольку из всех эукариотических клеток именно дрожжевые клетки наиболее просты для генно-инженерных манипуляций и культивирования. Для экспонирования рекомбинантных фрагментов антител на поверхности дрожжевых клеток предложено создавать гибридные белки, состоящие из антитела или его фрагмента и субъединицы агглютинина Aga2p, которая ковалентно соединена при помощи двух дисульфидных связей с агглютинином Aga1, заякоренным в клеточной стенке дрожжевой клетки [92–95]. Аналогичная стратегия была разработана также и для экспрессии антител в клетках млекопитающих [94].

Фаговый дисплей

При использовании метода фагового дисплея [87] в геном бактериофагов также встраивают ген гибридного белка, представляющего собой продукт объединения фрагмента антитела и поверхностного белка фаговой частицы. Фрагменты Ig оказываются экспонированными на поверхности вирусных частиц (рис. 3). Отбор фаговых частиц производится на основе сродства фрагментов антител к антигену. Как правило, для получения фагового дисплея используется фаг M13 и фрагменты антител экспрессируют в виде гибридных белков с белками оболочки фага pIII, pIV и pVIII [80]. Из отобранных фаговых частиц затем выделяют фаговую кДНК и определяют нуклеотидную последовательность фрагментов антител. На основе этой последовательности в дальнейшем создают полноразмерные рекомбинантные антитела [8–9, 87, 98–99].

Рибосомный дисплей

Другим дисплейным методом является метод рибосомного дисплея [80, 88]. Для рибосомного дисплея используется бесклеточная система синтеза полипептидной цепи с матрицы мРНК. В процессе синтеза белка образуется тройной комплекс белок–рибосома–мРНК (рис. 4). Далее, как и в случае большинства других дисплейных методов, этот комплекс выделяется из раствора на основе сродства синтезированных фрагментов антитела к целевому антигену. Метод позволяет одновременно отбирать наиболее аффинные фрагменты

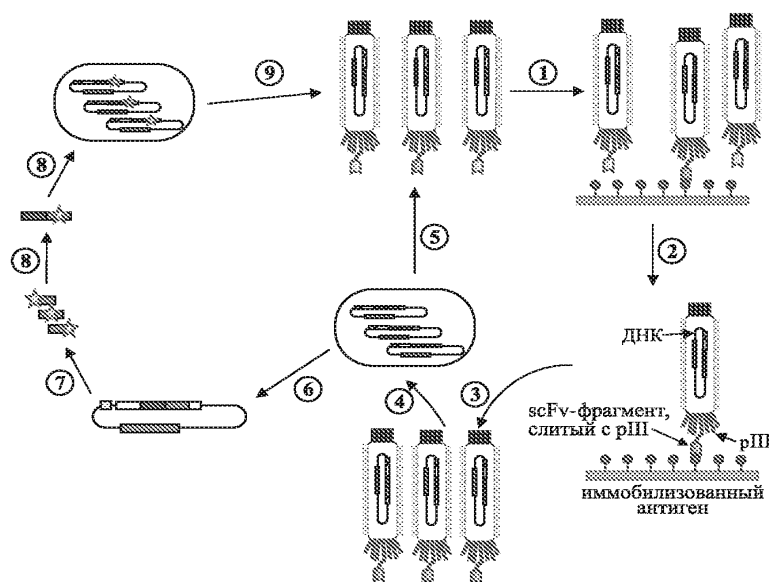


Рис. 3. Увеличение аффинности антител с использованием метода фагового дисплея.

Библиотека из 10^8 – 10^9 вариантов фрагментов антител (как правило, используются scFv-фрагменты антител), экспонированных на поверхности частиц фага M13, инкубируется с иммобилизованным антигеном (1). За несколько этапов промывания удаляют низкоаффинные фаговые частицы (2), затем элюируют оставшиеся связанными фаговые частицы (3). Отобранные после первого цикла частицы амплифицируют путем инфицирования клеток *E. coli* (4) для генерации библиотеки, обогащенной вариантами фрагментов антител, взаимодействующих с антигеном с высокой аффинностью. Данный цикл повторяется от двух до четырех раз (5) до тех пор, пока фракция высокоаффинных антител не станет доминирующей. Для увеличения аффинности отобранных антител их гены выделяют из фаговых частиц (6) и, используя метод мутагенеза, создают их новые варианты (7). Полученные гены клонируют в плазмиды (8), которыми трансформируют клетки *E. coli* (8), в результате чего получают новую библиотеку фрагментов антител, экспонированных на поверхности фаговых частиц (9), которая может быть использована для следующего цикла отбора (1) и дальнейшего увеличения аффинности.

Результатом использования фагового дисплея является отбор высокоаффинных вариантов антител, гены которых могут быть выделены из фаговых частиц (6) для последующего клонирования и экспрессии (по материалам статьи [117]).

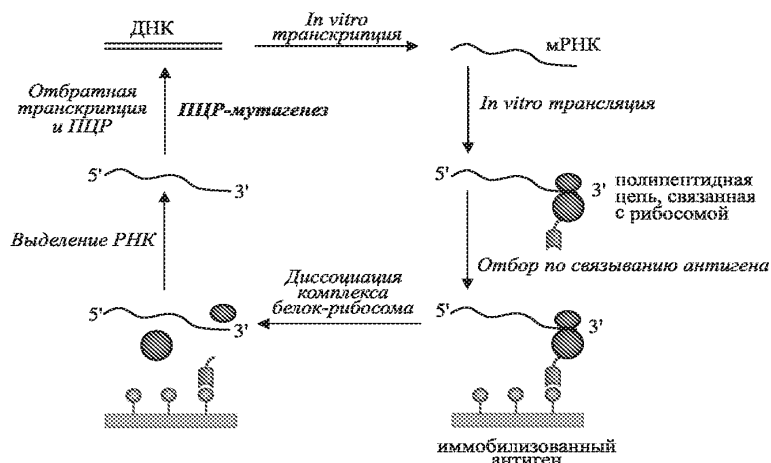


Рис. 4. Рибосомный дисплей.

Библиотека генов антител (например, scFv фрагментов) транскрибируется и транслируется *in vitro*. В полученной мРНК отсутствует стоп-кодон, что позволяет сохранить комплекс рибосома-белок, которые подвергаются в дальнейшем отбору на иммобилизованном антигене аналогично отбору при фазовом дисплее. Отобранные комплексы используют для получения мРНК, используемой в качестве матрицы для обратной транскрипции и для ПЦР. В нуклеотидную последовательность могут быть введены точечные замены, приводящие к созданию новых вариантов фрагментов антител, которые могут быть использованы в следующем цикле.

Молекулы ДНК, кодирующие отобранные за несколько циклов дисплея высоко-аффинные варианты антител, могут быть получены посредством обратной транскрипции молекул мРНК и ПЦР и использованы для последующего клонирования и экспрессии (по материалам статей [102, 213]).

антител вместе с их мРНК. Рибосома в данном случае выполняет функцию стабилизатора комплекса. Далее мРНК подвергают обратной транскрипции, получая «ДНК», которую амплифицируют методом ПЦР, а полученные ПЦР-продукты используют для создания плазмид для экспрессии рекомбинантных фрагментов антител. Описаны как прокариотический, так и эукариотический рибосомные дисплеи [80].

мРНК дисплей

Для получения рекомбинантных антител используют также метод мРНК дисплея («mRNA display», «*in vitro* virus», «RNA-peptide fusion») [89, 100]. Идея этого метода заключается в том, что синтезированная

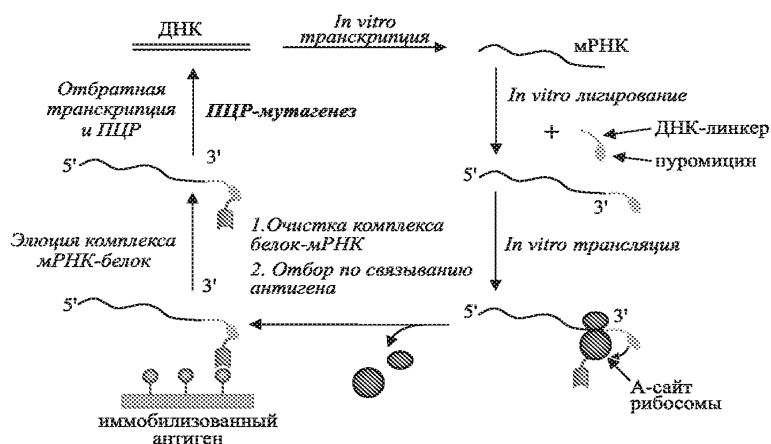


Рис. 5. Метод мРНК дисплея.

Библиотека генов антител (например, в форме scFv фрагментов) транскрибируется *in vitro*. Путем лигирования транскрибированной мРНК с пурамицином с помощью ДНК-линкера можно создавать комплексы мРНК-синтезированный белок. При этом, завершая *in vitro* трансляцию, рибосома останавливается на месте «соединения» РНК и ДНК, а пурамицин связывается с А-сайтом рибосомы, после чего синтезированный белок транслируется на пурамицин. Полученный ковалентный комплекс мРНК-белок может использоваться для отбора по аффинности аналогично отбору при фаговом дисплее, а затем, после элонгии, для обратной транскрипции и амплификации кДНК методом ПЦР. Разнообразие вариантов последовательности может создаваться на основе кДНК путем мутагенеза (по материалам статьи [102]).

in vitro полипептидная цепь остается взаимодействовать с кодирующей ее молекулой мРНК за счет пурамицинового линкера, связывающего две молекулы между собой. Поэтому на основе иммунохимических свойств синтезированного белка может быть отобрана и соответствующая мРНК (рис. 5). Далее поступают, как описано в разделе «Рибосомный дисплей».

Таким образом, как мы видим, существует множество способов отбора и получения наиболее аффинных вариантов антител из генных библиотек. В данный момент самым распространенным является метод фагового дисплея. Однако более поздние подходы, использующие *in vitro* системы трансляции белка и не требующие трансформации (мРНК и рибосомный дисплей), позволяют осуществлять скрининг библиотек большего размера, чем в случае фагового дисплея [75,

101–102]. Одним из ограничений дисплейных методов является неравномерность экспрессии различных мутантных форм антител. Возможны ситуации, когда наличие единственной аминокислотной замены полностью блокирует экспрессию мутантной формы антитела [103]. Кроме этого, при наличии библиотек, состоящих из большого числа вариантов, например, 10^{10} – 10^{13} , возникают сложности, связанные с невозможностью рассмотрения и анализа каждого варианта. Этот момент следует учитывать при создании и использовании подобных библиотек.

Методические приемы отбора наиболее аффинных вариантов антител с использованием антигена

Для получения высокоаффинных антител необходимо дифференцировать антитела с низкой и высокой аффинностью. Для этого можно использовать методы отбора по кинетическим или термодинамическим параметрам антител (рис. 6) [102, 104]. Для отбора по термодинамическим параметрам (в равновесном состоянии) библиотека отбираемых антител инкубируется с антигеном, имеющим более низкую концентрацию, чем желаемое значение K_D комплекса антиген-антитело. После достижения равновесия в системе будут преобладать иммунные комплексы, образованные антителами с более высоким аффинитетом, а антитела с низким аффинитетом окажутся в несвязанном виде. Отбор образовавшихся иммунных комплексов позволяет получить антитела с наивысшими значениями аффинности. Однако такой метод требует длительного времени инкубации (до недели!) для установления равновесия. Поэтому лишь очень небольшое количество антител с улучшенными свойствами может быть найдено. Способ отбора по кинетическим параметрам [94, 105–106] («off-rate selection»), заключается в инкубации библиотеки антител с небольшим количеством меченого (или сорбированного) антигена, концентрация которого близка к K_D комплекса анализируемых антител и антигена. На следующем этапе эта смесь инкубируется с большим избытком свободного антигена, причем длительность инкубации увеличивается на каждом последующем шаге отбора. Добавление избытка свободного антигена делает диссоциацию отбираемых антител от меченого (или сорбированного) антигена практически необратимой. Слабо связанные молекулы антител, имеющие наибольшую скорость диссоциации, образуют комплекс со свободным антигеном и затем удаляются с помощью отбора, а молекулы антител с наименьшей скоростью диссоциации остаются связанными с меченым или сорбированным антигеном и отбираются для дальнейших работ.

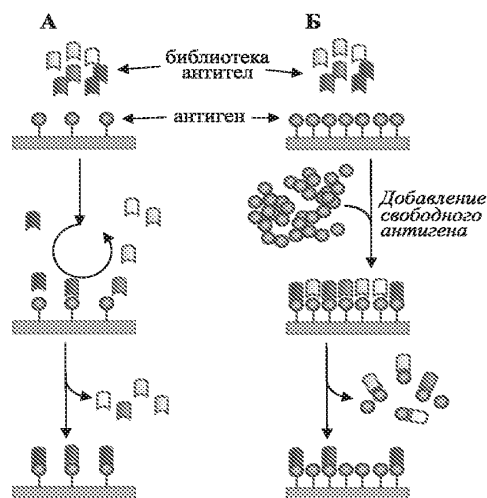


Рис. 6. Две стратегии отбора наиболее аффинных антител (см. объяснения в тексте).

А) Равновесный отбор. Отбираемые антитела инкубируются с недостатком антигена. После достижения равновесия связанными с антигеном остаются преимущественно, более аффинные антитела.

Б) Отбор по кинетическим параметрам. Отбираемые антитела инкубируются с достаточным количеством связанного антигена, после чего к смеси добавляется свободный антиген. В комплексе со связанным антигеном остаются только антитела, обладающие наименьшей скоростью диссоциации (и, поэтому, большей аффинностью).

Экспрессия рекомбинантных антител

В зависимости от поставленной задачи экспрессию рекомбинантных антител и их фрагментов можно проводить в различных системах: бактериальной (*E. coli*), дрожжевой (*Pichia pastoris*), бакуловирусной (клеточная линия sf9) и в клетках млекопитающих (например, клеточные линии CHO и HEK293) [107]. Для экспрессии негликозилированных фрагментов антител небольшого размера (V_L , V_H , scFv, dsFv), а также Fab-фрагментов как правило используют бактериальную и дрожжевую системы экспрессии. В случае получения полноразмерных антител, где необходимо, чтобы молекула антитела была гликозилирована, часто используют клетки млекопитающих и бакуловирусную систему экспрессии. В случае бактериальной и

дрожжевой экспрессионной систем часто удается достичь высоких выходов рекомбинантных фрагментов (20–1000 мг/л культуральной среды). Однако при экспрессии может возникать целый ряд проблем, затрудняющих получение функциональных фрагментов антител: 1) неправильное образование дисульфидных связей и, как следствие, большое количество функционально неактивного белка и наличие олигомеров синтезированных фрагментов, 2) потеря функциональной активности вследствие приобретения мутаций, 3) протеолиз синтезированного белка под действием внутриклеточных пептидаз. В случае эукариотической и бакуловирусной систем выходы несколько ниже (1–10 мг/л и 10–100 мг/л, соответственно), но при этом, как правило, практически весь синтезированный белок оказывается функционально активным.

Таким образом, использование методических подходов, рассмотренных выше, позволяет получить рекомбинантные антитела или их фрагменты, пригодные для реализации практически любых научно-исследовательских и прикладных задач.

ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ РЕКОМБИНАНТНЫХ АНТИТЕЛ

Благодаря ряду преимуществ, которыми обладают рекомбинантные антитела и их фрагменты, сфера их возможного применения значительно шире, чем у моноклональных антител, причем в первую очередь – из-за возможности их использования в качестве терапевтических агентов при лечении различных заболеваний.

Как уже отмечалось выше, важным преимуществом антител, полученных с использованием генно-инженерных технологий, является возможность модифицировать их последовательность и вносить изменения, необходимые для реализации каждой конкретной задачи. Методы генной инженерии позволяют преодолевать такие свойства моноклональных антител, затрудняющие применение в клинической практике, как, например, повышенная иммуногенность. Для снижения иммуногенности моноклональных антител, участки, вызывающие иммунный ответ (как правило, это константные домены), заменяют на соответствующие последовательности антител человека. Такие антитела называют «химерными» и они сохраняют антигенную специфичность благодаря уникальным переменным доменам. Для дальнейшего понижения иммуногенности получают *гуманизированные* (почти полностью «замещенные») антитела, в которых от антител мыши остаются только участки переменных доменов, непосредственно взаимодействующие с антигеном, а все остальные части молекулы замещаются на последовательность человеческих иммуноглобулинов [14].

Таким образом, описанные выше модификации антител существенно расширили их применение в клинической практике. Область применения терапевтических антител включает лечение рака, аутоиммунных, респираторных, сердечно-сосудистых, инфекционных и многих других заболеваний. Терапевтические антитела также используют для снижения вероятности отторжения трансплантатов. Применение рекомбинантных фрагментов антител успешно развивается в настоящее время [108–109]. Определенным затруднением при использовании терапевтических антител может быть изменчивость молекул-мишеней, таких как вирусные и бактериальные белки, а также возможность развития у больного иммунной реакции даже на практически полностью гуманизированные антитела.

Для усовершенствования рекомбинантных антител с целью применения в научно-исследовательской деятельности, можно изменять такие свойства антител, как аффинность и специфичность, а также вводить в последовательность антител дополнительные а.о. для последующего конъюгирования с другими молекулами, в том числе и метками, и добавлять к последовательности антител короткие аминокислотные последовательности («таги»), которые позволяют существенно упростить процедуру очистки антител [80, 110]. Кроме этого, генно-инженерные технологии позволяют создавать антитела к тем антигенам, которые не обладают иммуногенностью или токсичны для животных, и которые поэтому сложно получить, используя гибридную технологию.

Одним из наиболее перспективных направлений развития технологии получения рекомбинантных антител является получение антител, обладающих более высокой аффинностью, чем исходные природные антитела. В следующем разделе будут подробно рассмотрены современные подходы, разработанные для искусственного увеличения аффинности антител.

IV. УВЕЛИЧЕНИЕ АФФИННОСТИ АНТИТЕЛ

Как уже отмечалось, увеличение аффинности является естественным процессом, связанным с созреванием антител в организме позвоночных. Исследование механизмов этого процесса позволило обозначить основные принципы искусственного изменения последовательности антител с целью получения более высокоаффинных вариантов.

Естественные способы увеличения аффинности антител, такие, как рекомбинация генных сегментов и соматическая гипермутация, имеют свои ограничения. Рекомбинация генных сегментов ограни-

чена существующим в организме набором генных сегментов, которые используются для создания гена антитела, а соматическая гипермутация происходит большей частью в районе «горячих точек» мутагенеза, и в этом процессе преобладают однонуклеотидные замены. В результате, часть последовательности антител остается практически неизменной, и некоторые типы мутаций, требующие замены более чем одного нуклеотида в кодоне, становятся маловероятными [33]. В случае же искусственного мутагенеза становится возможным увеличение количества вариантов антител по сравнению с естественными природными вариантами, например, путем замен тех а.о., которые редко подвергаются мутагенезу *in vivo* [111]. При проведении искусственного мутагенеза можно осуществлять редкие в естественных условиях аминокислотные замены, обусловленные изменением более чем на один нуклеотид в кодоне. Благодаря применению эффективных методов отбора могут быть получены рекомбинантные антитела, аффинность которых выходит за пределы значений аффинности («affinity ceiling») естественных антител, и константа диссоциации которых может достигать значений 10^{-10} М и ниже.

Несмотря на наличие множества разнообразных программных продуктов, предназначенных для моделирования взаимодействия антитело-антиген, в настоящее время очень сложно (практически невозможно) точно предсказать какая именно одна или несколько мутаций приведут к увеличению аффинности антитела. Поэтому часто возникает необходимость получения и тестирования множества разнообразных мутантов. Для этого может быть использован метод «*in vitro* эволюции» [7, 101–102], основой которого, также как и при естественном увеличении аффинности, является принцип последовательного создания разнообразия и осуществления отбора наиболее высокоаффинных вариантов антител. Согласно этому принципу, наиболее высокоаффинные антитела отбирают, а кодирующие их гены амплифицируют, а затем подвергают мутагенезу и отбору. После этого цикл повторяется (рис. 7). Таким образом, для увеличения аффинности антитела его фенотип должен быть каким-то образом физически совмещен с генотипом. Для отбора наиболее аффинных мутантных форм антител используются те же методы дисплея, что и при получении рекомбинантных антител *de novo*.

Системы для увеличения аффинности антител разделяют на «полностью *in vitro* подходы», которые предполагают проведение *in vitro* всех этапов «молекулярной эволюции» (создание генетического разнообразия, экспрессию всех возможных вариантов, отбора наилучших вариантов), и «частично *in vitro*» подходы, для которых часть вышеперечисленных этапов происходит внутри клеток, а часть

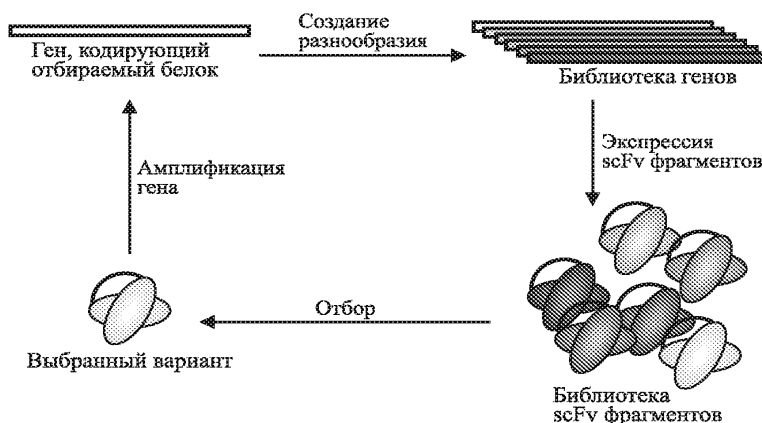


Рис. 7. Схема увеличения аффинности антител методом «*in vitro* эволюции» на примере создания scFv фрагментов (по материалам статьи [101]).

осуществляется *in vitro* [101–102]. К «полностью *in vitro*» подходам относят такие методические подходы, как рибосомный дисплей [80, 88] и мРНК-дисплей [89, 100]. К «частично *in vitro*» подходам относят фаговый [87] и клеточный [90–95] дисплей, для которых необходим этап трансформации библиотек генов антител (встроенных в плазмиду или репликон фага) в клетки бактерий, дрожжей или млекопитающих с целью проведения экспрессии. В случае клеточного дисплея экспрессируемые антитела транспортируются на поверхность клетки, а в случае фагового дисплея бактериальные клетки используют для продукции частиц бактериофагов [103].

За последние 20 лет было разработано большое количество методических приемов, позволяющих создать генетическое разнообразие *in vitro*, которые можно условно разделить на методы случайного и направленного мутагенеза. К первой группе можно отнести разнообразные методы мутагенеза, которые используют, когда нет четкого представления о тех а.о., которые стоит менять, а также методы ДНК-рекомбинации. Ко второй группе можно отнести сайт-направленный мутагенез, а также методы, позволяющие предсказывать структуру антитела и его комплекса с антигеном, – компьютерные методы анализа структуры белков (*in silico*) и кристаллографический анализ (рис. 8).

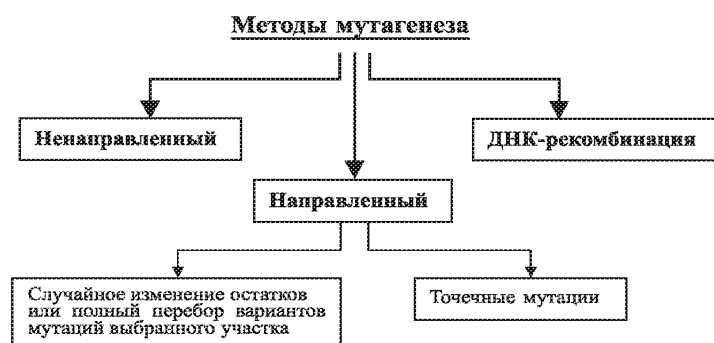


Рис. 8. Классификация методов мутагенеза, используемых для увеличения аффинности антител.

Все методы мутагенеза можно разделить на три группы – направленный и ненаправленный (случайный) мутагенез, а также методы рекомбинации. Ненаправленный мутагенез – это случайное изменение любых аминокислотных остатков последовательности антитела. Особенностью направленного мутагенеза является ограничение количества изменяемых аминокислотных позиций. За счет направленной рандомизации генерируются случайные замены в пределах выбранных аминокислотных позиций. Другим вариантом направленного мутагенеза является полный перебор аминокислотных замен в пределах выбранных участков. И, наконец, точечный мутагенез используется для введения замен выбранных аминокислот.

Использование ДНК рекомбинации позволяет дополнительно увеличить разнообразие библиотек, полученное направленным и ненаправленным мутагенезом, а также совмещать несколько «полезных» мутаций в одной и той же последовательности.

МЕТОДЫ СЛУЧАЙНОГО МУТАГЕНЕЗА

Главное достоинство случайного мутагенеза заключается в том, что для его реализации не нужно иметь данных о структуре антитела и взаимодействующих а.о. Существенным же его недостатком является появление значительной доли функционально неактивных мутантных форм, что приводит к необходимости создавать библиотеки большого размера и затрудняет отбор функционально-активных мутантов. Также в экспериментальных библиотеках, полученных путем случайного мутагенеза, практически не могут быть представлены все возможные варианты аминокислотных замен, поскольку многие из них требуют изменения более чем одного нуклеотида в кодоне,

например, замена 10 из 18 аминокислот, не заряженных отрицательно, на отрицательно заряженную аминокислоту требует изменения двух нуклеотидов в кодоне [112].

Разнообразие вариантов нуклеотидной последовательности антител, полученных с помощью случайного ненаправленного мутагенеза, может быть дополнительно расширено за счет комбинирования нескольких уже полученных вариантов последовательности с использованием методов *in vitro* ДНК рекомбинации (DNA-shuffling) (см. ниже). [99, 113–115].

Модификация аминокислотной последовательности антитела, используемая для увеличения аффинности, может также приводить к таким нежелательным побочным эффектам, как изменение специфичности антитела (кросс-реактивность), стабильности, эффективности экспрессии и сворачивания, токсичности по отношению к клеткам-продуцентам, подверженности олигомеризации. Для терапевтических антител дополнительными побочными эффектами могут быть уменьшение времени полужизни, увеличение иммуногенности, изменение распределения антитела по тканям и склонность к образованию амилоидных структур. Вышеперечисленные факты могут быть следствием не только «благоприобретенных» мутаций, специально введенных исследователем, но также нежелательных мутаций, происходящих из-за неточностей ПЦР реакции или привнесенных с праймерами. Поэтому необходимо дополнительно тестировать отобранные антитела с увеличенной аффинностью на предмет сохранности других важных биохимических свойств [116–117].

Ненаправленный мутагенез

Ненаправленный (случайный) мутагенез – это случайное изменение любых а.о. во всей последовательности антитела. Его главным достоинством является возможность применения в тех случаях, когда нет предварительных данных о структуре комплекса взаимодействующих молекул. Однако для успешной реализации этого подхода необходимо иметь возможность контролировать частоту мутагенеза, поскольку большинство происходящих аминокислотных замен не являются благоприятными и при высокой частоте мутагенеза могут приводить к получению большого количества функционально неактивных вариантов антител. Для увеличения аффинности scFv фрагментов антител оптимальным считается включение двух мутаций на 1000 пар оснований, поскольку при этом наблюдается наибольшее число точечных (33%) и двойных (22%) мутаций на ген, при минимальном количестве генов, не содержащих мутаций (22%) [118].

Для проведения случайного ненаправленного мутагенеза используют несколько подходов. Один из них, так называемый *error-prone PCR*, заключается в возникновении аминокислотных замен за счет неточности работы ДНК-полимераз при нестандартных условиях проведения ПЦР [92, 119–120]. Важным преимуществом этого подхода является возможность контролировать частоту мутагенеза и ограничивать область возникновения мутаций размером амплифицируемого участка. Существует несколько параметров реакции ПЦР, изменение которых может привести к увеличению количества ошибочно встроенных нуклеотидов. К ним относятся необходимая концентрация бивалентных катионов и соотношение дезоксинуклеозидтрифосфатов в реакционной смеси ПЦР, а также количество циклов ПЦР. Повышение концентрации ионов Mn^{2+} и Mg^{2+} в ПЦР-смеси приводит к увеличению количества мутаций при амплификации. Причем добавление Mn^{2+} в конечной концентрации 0.5 мМ приводит к пятикратному увеличению количества мутаций, и при этом не оказывает влияния на эффективность ПЦР, тогда как при добавлении Mg^{2+} наблюдается не только увеличение количества ошибок, но и падение эффективности амплификации фрагментов в ходе ПЦР-реакции. Еще одним фактором, приводящим к увеличению количества ошибочно вставленных нуклеотидов, является соотношение дезоксинуклеозидтрифосфатов в реакционной смеси. Повышенное содержание одного из них, а также включение в реакционную смесь их аналогов, таких как 8-*oxo*-dGTP и dPTP, может приводить к увеличению числа неправильно вставленных нуклеотидов [121]. Вероятность появления ошибочных нуклеотидов при низкой скорости мутагенеза также пропорциональна количеству циклов ПЦР [99, 118]. Другим подходом, используемым для появления случайных мутаций, является использование «мутаторных» (*mutator strain*) штаммов *E. coli*, обеспечивающих накопление мутаций за счет выключенных механизмов коррекции синтезированной ДНК [122–123]. Одним из таких штаммов является штамм *mutD5*, имеющий дефектную ϵ -субъединицу ДНК полимеразы III, которая в норме имеет 3'-5'-экзонуклеазную активность и обеспечивает удаление неправильно вставленных нуклеотидов. Скорость мутагенеза в клетках бактерий «мутаторных» штаммов зависит от условий роста бактерий: в обычной среде, содержащей минимум питательных веществ, скорость мутагенеза приблизительно в 50 раз выше чем в штамме дикого типа, а в обогащенных средах она может возрастать в 10^3 – 10^5 раз. Среди возникающих мутаций преобладают транзиции, хотя встречаются и трансверсии и сдвиги рамки считывания.

Скорость мутагенеза конкретных нуклеотидов сильно зависит от нуклеотидного окружения. Мутагенез последовательности антигенов по многим параметрам сходен с процессом соматической гипермутации. Во-первых, частота мутагенеза сходна с частотой мутагенеза при соматической гипермутации (3–5 мутаций на 10^4 пар оснований), во вторых, соотношение типов мутаций сходно с соотношением, наблюдаемым при соматической гипермутации, в третьих, мутации распределены неравномерно по последовательности и в большем количестве встречаются вблизи определенных консенсусных последовательностей («hotspots»), таких как AGY-мотив [122]. Преимуществом данного подхода по сравнению с подходами, основанными на методе ПЦР, является возможность более удобного контроля скорости мутагенеза, а также отсутствие необходимости проведения большого количества генно-инженерных операций. Недостатками этого метода является необходимость проведения нескольких раундов мутагенеза, а также постоянного контроля экспрессии антител, поскольку появление мутаций может происходить в любом месте последовательности вектора и приводить к прекращению экспрессии антител [124].

Увеличение аффинности антитела методом рекомбинации

Для увеличения количества вариантов, полученных методом случайного мутагенеза, и для получения комбинаций из нескольких мутаций часто применяется комбинирование участков ДНК, кодирующих гены антител. В зависимости от типа комбинируемых участков выделяют комбинирование переменных доменов легкой и тяжелой цепей (chain shuffling), петель CDR (CDR shuffling), а также комбинирование случайных гомологичных участков последовательностей нескольких мутантных вариантов антител (DNA shuffling) [125].

Существует несколько методических подходов для осуществления рекомбинации антител. Один из них основан на фрагментации и частичной деградациии пула молекул ДНК, кодирующих аминокислотную последовательность нескольких вариантов антител, под действием эндонуклеазы ДНКазы I с последующим использованием ПЦР для получения гибридных молекул ДНК («sexual PCR», DNA shuffling). Данная процедура состоит из трех этапов. Первый этап — получение набора случайных фрагментов исходных двух и более родительских последовательностей, которые затем подвергают ПЦР в отсутствие праймеров. На этой стадии происходит рекомбинация за счет отжига частично комплементарных фрагментов, выступающих в качестве праймеров. Последний этап заключается в проведении ПЦР

с использованием праймеров, ограничивающих исходный ген, для получения из пула фрагментов ДНК достаточного количества полно-размерных молекул [111, 114, 126]. Другим методическим приемом является использование ПЦР с перекрывающимися праймерами (overlap extension PCR) [127], который можно использовать как для перебора различных сочетаний из легкой и тяжелой цепей, так и разных участков CDR [125]. Еще одним способом, основанным на использовании ПЦР, является процесс «ступенчатой» амплификации (StEP, staggered extension process), при которой комплементарный синтез ДНК («элонгация») периодически прерывается денатурацией двуцепочечной ДНК, после чего происходит образование ДНК дуплексов («отжиг») между недосинтезированным фрагментом ДНК и новой молекулой матрицы, а затем элонгация цепи продолжается. В результате образуются цепи ДНК, составленные из участков, комплементарных разным матричным молекулам ДНК [128]. Еще одним методом, используемым для рекомбинации, является обработка пула молекул ДНК, кодирующих гены антител, одинаковым набором эндонуклеаз рестрикции с последующим лигированием образованных фрагментов ДНК. При этом порядок фрагментов ДНК в образующихся молекулярно-генетических конструкциях сохраняется благодаря уникальности рестриктивных сайтов, но новообразованные конструкции представляют собой продукт объединения фрагментов, образованных из нескольких молекул ДНК. Следует отметить, что ДНК-рекомбинацию можно использовать также для комбинирования нескольких мутантных вариантов, полученных методами направленного мутагенеза (см. ниже).

Хотя случайные подходы для создания генетического разнообразия активно использовали в прошлые годы и используют сейчас, в настоящее время технология увеличения аффинности интенсивно развивается в направлении создания генетического разнообразия с помощью методов направленного мутагенеза.

НАПРАВЛЕННЫЙ МУТАГЕНЕЗ

Подходы для выбора будущих мишеней мутагенеза

Для применения точечного мутагенеза необходимо иметь информацию о том, какие а.о. подвергать мутагенезу. Для выбора сайтов мутагенеза используют несколько различных подходов. Так, например, с этой целью могут быть использованы данные о положении горячих точек мутагенеза в последовательности антитела. Особенно ценной для выбора участков для направленного мутагенеза может быть информация о трехмерной структуре комплекса антитело-антиген.

Данные о трехмерной структуре антител и их комплексов с антигеном могут быть получены как с использованием экспериментальных методов (рентгеноструктурный анализ или ядерный магнитный резонанс), так и с помощью *in silico* моделирования (*in silico* – «в компьютере») в случае отсутствия рентгеноструктурных данных [129]. Анализ трехмерной структуры обладает рядом преимуществ по отношению к анализу последовательности антитела, так как позволяет предположить изменение каких а.о. может привести к увеличению аффинности антител, исходя из вклада отдельных аминокислот в поддержание стабильности структуры антитела и во взаимодействие с антигеном. Использование анализа последовательностей антител, анализа трехмерных структур и комплексов антител с антигеном с последующим направленным мутагенезом (рациональный дизайн), имеет ряд преимуществ по сравнению со случайным мутагенезом. Во-первых, такой подход позволяет значительно сократить число а.о., подвергаемых мутагенезу до нескольких аминокислотных позиций, значительно увеличивая при этом вероятность нахождения благоприятных мутаций. Кроме этого, процесс направленного мутагенеза может быть разбит на несколько параллельных тестирований небольших библиотек. Небольшой размер этих библиотек по сравнению с размером библиотек, получаемых при случайном мутагенезе, приводит к значительному сокращению количества тестируемых вариантов антител и позволяет уменьшить риск возникновения ложноотрицательного результата, то есть риск не обнаружить улучшенный вариант из-за недостаточной полноты библиотеки или из-за невозможности провести эффективное скринирование всех существующих вариантов с использованием технологии дисплея [130].

Существуют два фактора, ограничивающие возможности методов рационального дизайна. Первый фактор – это невозможность абсолютно точно предсказать воздействие даже единичных аминокислотных замен на аффинитет мутанта с использованием существующих на данный момент алгоритмов расчета. Однако в некоторых случаях точность предсказаний методом *in silico* моделирования воздействий от возможных перестроек оказывается достаточно высокой, и уже существуют примеры дизайна новых более аффинных антител на основе предсказанных изменений в уже существующих антителах [131–132].

Второй ограничивающий фактор – это необходимость проверки астрономического количества возможных мутаций [133]. Для перебора всех возможных а.о. в каждой позиции (насыщающий мута-

генез) последовательности вариабельных доменов LC и HC (около 230 остатков) требуется тестирование 10^{300} вариантов антител, что невозможно осуществить технически.

In silico подходы

Как показывает практика, результаты, полученные с использованием экспериментальных подходов более надежны, но все они более трудоемки, чем анализ *in silico*. Предварительное упрощение картины за счет анализа последствий мутаций, предсказанных с использованием *in silico* подходов, может значительно облегчить получение конечного результата с использованием экспериментальных методов. Хотя компьютерные подходы сегодня еще не являются полноценной заменой экспериментальных данных, они в некоторых случаях позволяют сузить круг вариантов для экспериментального поиска «благоприятных» мутаций [134]. Таким образом, главной задачей *in silico* анализа применительно к проблеме увеличения аффинности антител является изучение влияния аминокислотных замен на структуру самого антитела, а также на структуру и прочность иммунного комплекса для выявления тех замен, которые потенциально приводят к увеличению аффинности взаимодействия антитела и антигена.

Предсказание «вредных» мутаций по последовательности. В ситуации, когда отсутствуют данные о трехмерной структуре антитела и о а.о., вовлеченных во взаимодействие с антигеном, используя анализ аминокислотной последовательности антитела с использованием *in silico* подходов можно значительно сузить круг остатков, подвергаемых мутагенезу для увеличения аффинности антител, исключив те остатки, мутагенез которых может с высокой вероятностью привести к нарушению структуры антитела. К таким остаткам можно отнести FR-остатки, консервативные CDR-остатки, а также аминокислотные остатки, боковые цепи которых расположены внутри домена. Методы компьютерного моделирования используют различные приемы для предсказания эффекта мутаций в последовательности антител и могут использовать разные входные данные для анализа – от последовательности а.о. до координат атомов в трехмерной структуре. Они также позволяют комбинировать доступную информацию с тем, чтобы улучшить точность предсказаний (методы, используемые в программах SNPs3d [135], SIFT [136], PolyPhen [137–140], SNAP [141]). Ряд программ позволяет оценивать энергетический эффект аминокислотных замен на стабильность антител и их комплексов с антигенами (программы FOLD-X [142], CHARMM [143–145], SNPeffect [146], LS-SNP [147], I-Mutant 2.0 [148] и PoPMuSiC [149]).

Таким образом, использование *in silico* подходов для антител с неизвестной пространственной структурой позволяет уменьшить размер скринируемых библиотек за счет исключения из списка генерируемых мутаций потенциально вредных.

Идентификация «горячих точек» мутагенеза. Для увеличения аффинности антител с неизвестной трехмерной структурой также используется метод мутагенеза по «горячим точкам», идея которого состоит в использовании *in vitro* того принципа, который используется для естественного увеличения аффинности антител в ходе соматической гипермутации. Как и в случае поиска «вредных мутаций», поиск «горячих точек» мутагенеза проходит посредством анализа последовательности антител.

Процесс локализации а.о., соответствующих «горячим точкам» мутагенеза, то есть участкам нуклеотидных последовательностей, которые наиболее часто изменяются в ходе соматической гипермутации, состоит из трех этапов: 1) поиск участков V-генов, соответствующих переменным доменам данного антитела, 2) поиск консенсусных последовательностей, характерных для горячих точек мутагенеза в последовательностях V-генов, 3) определение остатков в аминокислотной последовательности, соответствующих «горячим точкам» мутагенеза для данного антитела. Для этого в базе данных IGMT [150] проводится поиск последовательностей V-генов, наиболее близких по последовательности переменным доменам данного антитела. Затем, в найденных последовательностях V-генов нужно локализовать все участки, совпадающие с консенсусными последовательностями RGWY (A/G G C/T A/T) и AGC и AGT [27–28]. При мутагенезе а.о. из CDR-H3 следует избегать «горячих точек», в состав которых входят нуклеотиды, добавленные при рекомбинации генных сегментов (V(D)J-рекомбинация) в процессе генерации генов антител.

Выделяют два типа нуклеотидных последовательностей «горячих точек»: первичные (germline hot spots), которые содержатся в первичных антителах и генных сегментах, из которых эти антитела получены, и вторичные (non-germline hot spots), которые отсутствуют в первичных антителах и являются, по-видимому, результатом соматической гипермутации [27–28, 33, 151–153]. Результаты исследований по мутагенезу последовательностей этих двух типов «горячих точек» показали, что изменение именно первичных «горячих точек» эффективно для увеличения аффинности антител [33]. При осуществлении мутагенеза необходимо рандомизировать все кодоны, входящие частично или полностью в выбранные «горячие точки» [27].

In silico моделирование трехмерной структуры комплекса антитело-антиген и *in silico* мутагенез. По сравнению с анализом первичной последовательности антител построение трехмерной структуры антитела и его комплекса с антигеном представляет собой более сложную задачу. Для увеличения аффинности антитела с использованием методов *in silico* исследователи, как правило, стараются предсказать мутации, которые позволят увеличить а) количество а.о. антитела, взаимодействующих с антигеном, б) силу взаимодействий между антигеном и антителом. Как правило, подобные изменения приводят к увеличению аффинности за счет ослабления диссоциации (k_{off}). Для увеличения же скорости ассоциации существует подход, основанный на изменении зарядов на поверхности молекулы антитела за счет внедрения заряженных остатков вблизи взаимодействующих поверхностей. Считается, что появление таких остатков в структуре антитела приводит к облегчению правильной ориентации молекулы антигена по отношению к антителу, но не приводит к образованию новых связей между антигеном и антителом [154–155].

Важным условием для увеличения достоверности *in silico* предсказания конкретных аминокислотных замен, приводящих к увеличению аффинности антитела, является наличие трехмерной структуры комплекса антитело-антиген с высоким разрешением. Однако из-за того, что для подавляющего большинства антител кристаллическая структура комплекса неизвестна, вместо нее часто используют трехмерные модели. Процесс моделирования комплекса антитело-антиген состоит из трех этапов: 1) моделирование трехмерных структур антитела и антигена по отдельности и оптимизация моделей, 2) докинг, то есть «совмещение» моделей антитела и антигена с образованием виртуального комплекса, и, наконец, 3) анализ энергии образования комплекса антитело-антиген для всех возможных мутантных форм с последующим отбором мутантных форм с минимальным значением этой энергии.

Для моделирования трехмерной структуры белков используют два основных приема: гомологическое моделирование и *de novo* моделирование. Моделирование на основании гомологии, использует доступные данные в базе данных трехмерных структур PDB (Protein Data Bank) в качестве основы для моделирования белков с неизвестной структурой. Сначала осуществляется поиск белков, обладающих наибольшим сходством последовательностей с изучаемым белком, а затем происходит построение модели на основе гомологии, которое заключается, главным образом, в «натягивании» последовательности

моделируемого белка на «остов» шаблона, составленного на основе найденных гомологичных структур [156–157]. Согласно исследованиям, проводимым в рамках CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction), моделирование структуры белков по гомологии можно проводить только в случае, если структуры гомологичных белков идентичны более чем на 30% [157]. В случае белков, для которых отсутствуют гомологичные им по всей последовательности белки с известной структурой, разработан аналогичный гомологичному моделированию метод, использующий гомологию отдельных структурных элементов с известной третичной структурой (protein threading) [158–159]. Существует множество автоматических инструментов для гомологического моделирования трехмерной структуры разных белков, таких как MODELLER [160], SWISS-MODEL [161], I-TASSER [162], 3D-JIGSAW [163], ESyPred3D [164], Phyre [165], CPHmodels [166] и др. Эти инструменты могут быть быстро и легко использованы для моделирования различных белков, но они не позволяют учесть особенности антител, поэтому использование этих программ с небольшой вероятностью может привести к получению качественной модели.

Идея второго подхода заключается в моделировании процесса и результата сворачивания белка (программы Rosetta [167] и TASSER [168]). Этот подход может быть реализован путем генерации и последующей оценки множества вариантов сворачивания в зависимости от значения потенциальной энергии. Поиск считается законченным, если найдена конформация, обладающая значительно более низкой энергией по сравнению со всеми остальными возможными конформациями. Для того, чтобы воспроизвести природный механизм формирования структуры белковой молекулы, исследователи пытаются выделить в последовательности структурные элементы, которые сворачиваются первыми и остаются неизменными в ходе дальнейшего сворачивания. Процедура *de novo* моделирования является чрезвычайно сложной и требует огромных компьютерных ресурсов, поэтому данные алгоритмы чаще используются совместно с гомологическим моделированием для оптимизации полученных моделей, например, для моделирования структуры петель.

Моделирование структуры антител имеет свои особенности. Последовательность каркасных участков настолько консервативна, что задача большей частью сводится к моделированию шести CDR-петель [169]. Однако для построения модели комплекса антитела с антигеном методом докинга необходимо получить очень точную модель паратопа, что сильно усложняет задачу [129].

Для нахождения соответствия между а.о. последовательностей разных антител и для правильного гомологического моделирования CDR петель необходимо иметь систему обозначения аминокислотных позиций в последовательностях переменных доменов антител. Также надо определить принципы выделения фрагментов антитела, участвующих во взаимодействии с антигеном. Для этих целей предлагается использовать такие критерии, как профиль вариабельности аминокислот [170], топология а.о. [171–173], оптимизированная модель трехмерной структуры петель, взаимодействующих с антигеном («AbM loops») [174], последовательности V-генов κ и λ LC, а также последовательности HC и доменов T-клеточных рецепторов [150, 175], и роль а.о. во взаимодействии с антигеном [176].

Таким образом, как мы видим, на данный момент не существует универсальной нумерации аминокислотных остатков и не определены «универсальные границы» антигенсвязывающих участков. Авторы не пытаются переопределить границы CDR, а выделяют альтернативные наборы а.о., перекрывающихся с CDR, которые могут быть использованы исследователями для разных целей [169].

Для построения трехмерных структур CDR-петель методом гомологического моделирования в качестве шаблонов используются структуры петель антител, относящихся к разным структурным группам («каноническим классам»), определенным в работах Хотиа [171–173]. Для этого из баз данных структур выбираются петли антител, относящиеся к тому же классу, что и петли моделируемого антитела и совпадающие с последовательностью петель моделируемого антитела по максимальному количеству аминокислотных позиций. Петли V_H CDR3 слишком вариабельны, поэтому не могут быть четко разделены на канонические классы, однако среди них тоже выделяют группы. Для моделирования CDR-петель, которые не могут быть отнесены к определенной структурной группе используется метод *ab initio* моделирования петель, а также метод конформационного поиска [174, 177]. Иногда в качестве шаблона для построения структуры петли используют структуру петли той же длины, имеющую похожее расстояние между точками прикрепления к каркасным участкам [169]. При моделировании каркасных участков переменного домена необходимо проверять найденные в базах данных гомологичные структуры для использования в качестве шаблонов на наличие участков с низким разрешением и заменять такие участки консенсусными конформациями других известных структур [178].

Для моделирования переменных фрагментов антител существует несколько специальных программ: WAM (Web Antibody Modelling) [179–180], PIGS (Prediction of Immunoglobulin Structure) [181] и

RosettaAntibody [182]. Каждая из них использует для построения модели антитела комбинированные методы анализа структур, поэтому использование этих программ более эффективно, чем автоматическое моделирование с использованием универсальных программ для моделирования белков. Принцип метода, используемого в программах, специализированных для моделирования антител, заключается в создании модели на основе шаблона каркасных участков переменного домена путем пересадки шаблонов петель или моделирования структуры петель *de novo*. Серверы PIGS и WAM не проводят оптимизации с высоким разрешением для полученной модели и не рассматривают термодинамические параметры при моделировании [182], тогда как первоначальная модель, полученная в программе RosettaAntibody, на следующем этапе подвергается оптимизации сначала на уровне низкого, а затем – высокого разрешения.

Программа моделирования антител RosettaAntibody представляет собой наиболее развитый инструмент для моделирования антител. Она сочетает разные принципы моделирования CDR-петель, такие, как использование канонических классов, гомологичных петель антител, имеющихся в базах данных структур, конформационный поиск [174, 177] и *de novo* моделирование петли H3 при отсутствии ее структуры в базе данных. Кроме того, программа RosettaAntibody проводит многоступенчатую оптимизацию полученной структуры и взаимной ориентации V_L и V_H доменов с учетом влияния на взаимное расположение каркасных участков петли H3, смоделированной *de novo*, и других петель. Для антител, имеющих высокое сходство с найденным шаблоном, точность предсказаний структуры с использованием программы RosettaAntibody в дальнейшем позволяет использовать полученные структуры для построения моделей комплекса антиген-антитело [129].

Моделирование мутантных форм антител на основе имеющейся трехмерной структуры исходного антитела (*in silico* мутагенез) является более простой задачей по сравнению с моделированием антитела с неизвестной структурой, поскольку замены в CDR-петлях влияют только на локальное окружение, оставляя неизменной общую структуру домена [178].

Несмотря на многообразие программных продуктов, разработанных для моделирования белков, часто оказывается так, что определенная *in silico* максимально энергетически выгодная структура белковой молекулы не всегда совпадает с ее оригинальной структурой [129, 178]. Это связано со сложностью корректной оценки всех внутримолекулярных взаимодействий, а также со сложностью

оценки взаимодействия молекулы с растворителем [129]. В связи с этим, наиболее перспективным считается подход, заключающийся в генерации нескольких наиболее правдоподобных моделей (десяти в случае RosettaAntibody) и последующей проверки правильности модели путем виртуальной «стыковки» модели антитела и антигена (метод докинга антитела и антигена). Учет конформационной подвижности антитела и антигена при моделировании структуры комплекса позволяет компенсировать неточности моделирования конформации петель, взаимодействующих с антигеном.

Белок-белковый докинг можно определить как предсказание структуры комплекса двух белков (например, антитела с антигеном), если известны их структуры. В различных программах, предназначенных для докинга, используется либо приближение, согласно которому взаимодействующие белки представляют собой «жесткие» тела с фиксированной конформацией («rigid body» approximation), либо когда они рассматриваются как подвижные структуры [183]. К программам, которые осуществляют «жесткий» докинг, относятся Zdock/Rdock [183], ClusPro [184], 3D-dock [185] и RosettaDock [129, 186]. Эти программы не учитывают изменение конформации белкового остова при взаимодействии белков, однако рассматривают движения боковых цепей аминокислот. Для осуществления докинга с учетом внутримолекулярной подвижности белков («гибкий докинг», flexible docking) существует две модели [186]: 1) модель выбора конформации, согласно которой в свободном состоянии белок представлен набором конформеров с низкой энергией, один из которых способен к связыванию с другим белком и 2) модель индуцированного взаимодействия, согласно которой взаимодействие двух белков приводит к изменению структуры обоих участников взаимодействия. Кроме этого, существуют программы, использующие гибридную модель, согласно которой сначала происходит выбор конформации, завершающийся образованием первичного комплекса, а затем следует индуцированное взаимодействие белков. К программам, осуществляющим «гибкий» докинг, относятся Autodock [187], Dock [188], FlexX [189], Glide [190], Gold [191], HADDOCK [186, 192], ICM [193], Situs [194]. Полный список существующих программ для докинга значительно более обширен и постоянно обновляется. Из всех программ, используемых для докинга, наиболее распространенной на сегодняшний день можно считать программу Autodock [195]. Несмотря на достижения в области *in silico* предсказаний, моделирование гибкости белковых молекул и тех изменений, которые происходят в молекулах при образовании комплекса, остается одной из главных проблем, ограничивающих *in silico* подходы для моделирования белковых комплексов [115].

Для оценки и ранжирования различных конформаций, полученных методом докинга, а также для сравнения аффинности различных мутантных вариантов антител используют оценивающие функции (scoring functions), задача которых заключается в том, чтобы отличить варианты антител, способные образовывать комплекс, от вариантов, которые комплекс формировать не смогут. Также такие функции должны предсказать наиболее вероятную структуру комплекса из всех структур, созданных с использованием программ [195].

Рациональный дизайн на основе результатов моделирования. После анализа последовательности антитела и/или трехмерной структуры комплекса антиген-антитело (либо ее модели) необходимо на основе полученных результатов выбрать а.о., которые следует подвергать мутагенезу на практике. Существует несколько критериев рационального отбора а.о. для последующего направленного мутагенеза.

В качестве мишеней направленного мутагенеза желательно выбирать а.о., входящие в состав CDR-петель, а также, возможно, некоторые FR остатки, которые могут участвовать в непосредственном связывании антигена или могут влиять на взаимодействие антигена с контактирующими остатками [13, 196]. Как правило, мутагенез FR остатков, участвующих в поддержании структуры иммуноглобулинового домена, может приводить к драматическим последствиям [38], а правильное предсказание эффекта изменения а.о., удаленных от центра связывания антигена, на аффинитет антитела маловероятно. При мутагенезе, сопровождающем аффинное созревание, мутации в FR, приводящие к увеличению аффинности за счет потери стабильности, не сохраняются [25]. Примеры увеличения аффинности антител, происходящие в результате мутаций в удаленных от сайта связывания аминокислотах, описаны в литературе [92], однако последствия таких мутаций не могут быть предсказаны *in silico*.

Среди а.о. CDR желательно оставить неизменными те, которые могут играть структурную функцию (образовывать часть «внутреннего ядра» домена, солевые мостики внутри, водородные связи, и т.п.). Эти а.о., как правило, являются консервативными и почти любые замены по этим аминокислотным остаткам приводят к снижению аффинности (deleterious sequence features) [76, 143]. Считается, что в первую очередь в качестве кандидатов на мутагенез надо рассматривать остатки CDR, доступные растворителю и способные к взаимодействию с ним [25, 197]. Такие мутации практически не изменяют общую структуру домена, могут быть вовлечены во взаимодействие с антигеном и эффект увеличения аффинности за счет мутаций этих остатков может быть наиболее точно предсказан.

Выбор «горячих точек» (аминокислотных позиций, которые чаще всего модифицируются при соматической гипермутации) для будущего мутагенеза позволяет увеличить вероятность получения антител с большей аффинностью при создании антител *de novo*, так как имитирует естественный процесс созревания антител. Однако этот подход может быть менее эффективным для увеличения аффинности рекомбинантных антител, полученных из моноклональных антител (уже прошедших через соматическую гипермутацию и обладающих высокой аффинностью), поскольку в процессе созревания их гипервариабельные позиции уже были оптимизированы.

Одним из способов ограничения количества вариантов генов антител, подвергаемых дальнейшему отбору, является уменьшение числа перебираемых типов аминокислот в каждой позиции. Для этого возможным подходом является исключение тех типов аминокислот, которые редко встречаются в CDR и/или редко появляются в ходе естественного созревания антител в В-клетках [25, 198–200]. С другой стороны, введение замен, не встречающихся в природных антителах может позволить достичь тех значений аффинности, которые не были достигнуты за счет ограничений соматической гипермутации. Кроме того, количество вариантов а.о. в каждой позиции может быть ограничено набором аминокислот, представляющих основные физико-химические группы аминокислот [200]. Однако, часто к увеличению аффинности приводят не те мутации, которые кардинально меняют свойства аминокислоты в данной позиции, а «консервативные» замены, которые лишь немного модифицируют характер взаимодействий. Еще один возможный вариант ограничения перебираемых в каждой позиции аминокислот основан на том, что большинство замен между а.о. с сильно различающимися свойствами часто приводит к получению неактивного белка. Поэтому мутагенез следует ограничить заменами на близкие по свойствам а.о. (см. раздел «экономный мутагенез») [17, 201]. Однако такой подход не учитывает те случаи, когда неконсервативные замены приводят к увеличению аффинности.

Для увеличения количества скринируемых позиций используется один из следующих подходов: «последовательный», при котором сначала проводят оптимизацию одного CDR, а затем переходят к другому, используя для каждого нового этапа «*in vitro* эволюции» наиболее оптимизированные на предыдущем этапе антитела и «параллельный», при котором происходит независимая оптимизация разных участков антитела с последующим совмещением «благоприобретенных» мутаций.

Мутагенез а.о. на периферии антигенсвязывающего участка в случае увеличения аффинности моноклональных антител, полученных *in vivo*, может иметь преимущество перед изменением а.о., расположенных в центре, поскольку основные энергетические «горячие точки», расположенные в центре антигенсвязывающего участка, как правило, уже оптимизированы в процессе созревания, и зачастую их изменение может привести только к уменьшению энергии связывания. Периферические а.о. более перспективны для мутагенеза [13, 39, 121, 202], поскольку их изменение позволяет приспособить к связыванию антигена те а.о., которые не были вовлечены в связывание антигена и с меньшим риском может нарушить уже имеющиеся связи. Увеличение аффинности антител за счет периферических остатков может происходить путем увеличения гидрофобной поверхности взаимодействия с антигеном, скрытой от растворителя, сближения и увеличения комплементарности взаимодействующих поверхностей антитела и антигена, усиления электростатических взаимодействий, а также изменения подвижности остатков антигенсвязывающего участка [99, 121, 201, 203–204]. Увеличение аффинности может происходить как за счет увеличения подвижности молекулы антитела, благодаря возможности увеличения комплементарности поверхностей эпитопа и паратопа, так и за счет ее снижения путем фиксации связанной конформации антитела, оптимально связывающей антиген.

При дизайне антитела с увеличенной аффинностью, для его использования в диагностических системах имеет смысл максимально ограничить подвижность молекулы, чтобы минимизировать возможность неспецифических взаимодействий полученного антитела с другими сходными по структуре молекулами. Использование *in silico* мутагенеза, то есть создание моделей мутантных антител с последующей оценкой энергии связывания антигена позволяет предсказывать, какие конкретные точечные замены могут привести к увеличению аффинности антитела. Это – наиболее рациональный из всех описанных подходов, требующий использования трехмерной структуры высокого разрешения. Число известных кристаллических структур комплексов антител и антигенов невелико, однако постоянно растет. Развитие методов предсказания трехмерной структуры наряду с увеличением точности методов моделирования мутированных форм позволит повысить успешность применения метода *in silico* мутагенеза [134, 142–143, 145, 205].

Таким образом, после построения трехмерной структуры комплекса антиген-антитело и определения тех а.о., которые вносят вклад в образование этого комплекса, на следующем этапе проводят направ-

ленный мутагенез этих а.о. и получают некоторое количество вариантов мутантных форм антител, которые затем подвергают отбору.

Методы направленного мутагенеза

Основная идея направленного мутагенеза заключается в том, что для увеличения аффинности, как правило, необходимо подвергать мутагенезу только те а.о., которые расположены в области антиген-связывающего участка и могут быть вовлечены во взаимодействие с антигеном. Выделяют несколько подвидов направленного мутагенеза в зависимости от того, какие остатки изменяют и каким образом (рис. 8). Направленный мутагенез в чем-то аналогичен происходящей *in vivo* соматической гипермутации, т. к. проводится мутагенез ограниченного количества а.о. – остатков, входящих в состав CDR, или небольшого числа остатков, отобранных с использованием *in silico* подходов [101–102, 152, 206]. В рамках направленного мутагенеза может проводиться замена единичных а.о. на другие, определенные заранее (точечный мутагенез), рандомизация в пределах выбранных а.о., или полный перебор всех аминокислотных позиций в пределах выбранных участков. Точечный мутагенез применим для антител с известной трехмерной структурой, когда заранее определено, какую аминокислотную замену следует осуществить, чтобы добиться нужного эффекта.

Точечный мутагенез. Точечный (или сайт-специфический) мутагенез используют для замены одной аминокислоты в определенной позиции последовательности на другую, определенную заранее, аминокислоту. При этом аминокислотные замены проводят методом ПЦР с использованием праймеров, содержащих необходимые мутации. Для перебора вариантов различных типов а.о. в одной и той же позиции последовательности, используют «вырожденные» по данной позиции праймеры, то есть набор праймеров, отличающихся только аминокислотой, вводимой в данной позиции за счет мутации. Такие праймеры имеют идентичную нуклеотидную последовательность за исключением рандомизированного триплета нуклеотидов, соответствующего выбранной для мутагенеза аминокислоте.

Направленная рандомизация и мутагенез с полным перебором вариантов. К этой группе можно отнести некоторые методические подходы, которые включают в себя как случайное изменение выбранных а.о. (рандомизация), так и перебор всех возможных вариантов аминокислотных замен в пределах выбранных а.о. (насыщающий мутагенез).

Оптимизация остатков CDR. Так как одновременная оптимизация всех остатков CDR невозможна из-за ограничений размера тестируемых библиотек, для решения этой проблемы используют три подхода: последовательную («CDR walking») модификацию остатков CDR [106], параллельную модификацию остатков CDR и рандомизацию некоторых CDR-петель. Первый подход предполагает последовательную оптимизацию а.о. в различных участках CDR. Исходным материалом для оптимизации остатков в каждом новом цикле служит последовательность фрагмента антитела с увеличенной аффинностью, полученная за счет оптимизации предыдущих вариантов CDR. Альтернативой этому подходу является стратегия параллельной оптимизации, при которой разные фрагменты CDR подвергают независимой оптимизации, а затем лучшие из отобранных вариантов комбинируют в один ген. Данная стратегия основана на экспериментальных данных, согласно которым при комбинировании невзаимодействующих мутаций наблюдается аддитивный эффект [207], и это часто приводит к положительным результатам [105, 208–209]. Преимуществом такой стратегии является быстрота получения конечного продукта. Однако также имеются данные об отсутствии эффекта аддитивности в случае комбинирования некоторых мутаций [106]. Иногда насыщающий мутагенез только одной или двух главных CDR петель (как правило, V_L -CDR3 или V_H -CDR3, а иногда V_H -CDR2) приводит к повышению аффинности, по-видимому, из-за того, что эти петли вносят основной энергетический вклад во взаимодействие с антигеном [210–212].

Сканирующий мутагенез. Сканирующий мутагенез (look-through mutagenesis), был разработан как схема полной оптимизации всех шести CDR петель для улучшенного связывания антигена. В рамках этого подхода из 20 аминокислот, входящих в состав белков выбирают 9 (аланин, серин, гистидин, лейцин, пролин, тирозин, аспарат, глутамин, лизин), представляющие основные группы аминокислот, выделенные на основе физико-химических свойств их боковых цепей. Для каждой аминокислотной позиции, входящей в состав CDR создается серия мутантных форм, в которых а.о. дикого типа заменяется на одну из девяти выбранных аминокислот. После этого CDR участки, кодирующие единичные аминокислотные замены, скрещиваются друг с другом за счет ДНК-рекомбинации с образованием scFv фрагментов, содержащих комбинации одноаминокислотных замен в различных CDR. После отбора полученных клонов на основе их способности связывать антиген, гены клонов с улучшенными свойствами секвенируют и определяют благоприятные мутации, которые затем комбинируют для выявления синергичных мутаций [200].

«Экономный» мутагенез. «Экономный» мутагенез (*parsimonious mutagenesis*) – это метод, позволяющий получать варианты антител с увеличенной аффинностью путем одновременного и полного мутагенеза CDR остатков в библиотеках небольшого размера. Уменьшение размера библиотеки достигается за счет уменьшения избыточности кодирующей последовательности (выбирается по одному кодону для каждого а.о.) и ограничения количества перебираемых в каждой позиции а.о.. Хотя теоретически для каждой аминокислотной позиции, выбранной для мутагенеза, существуют 19 вариантов замены, метод «экономного мутагенеза» ограничивается лишь теми вариантами, которые химически и/или стерически наиболее похожи на а.о. дикого типа. Этот подход также базируется на том принципе, что лишь небольшая доля аминокислот вносит наиболее существенный вклад в связывание антигена, тогда как остальные аминокислоты, входящие в состав антигенсвязывающего участка, могут быть подвергнуты мутагенезу для формирования дополнительных контактов с антигеном [17, 201].

* * *

С помощью перечисленных выше методов (случайный мутагенез, методы *in silico* и рационального дизайна, направленный мутагенез) возможно создание библиотек генетических вариантов исследуемых антител. Дальнейший отбор высокоаффинных вариантов проводят, используя разнообразные методы дисплея, которые были рассмотрены в главе «Получение рекомбинантных антител *de novo*». Следует отметить, что в некоторых случаях получение антител с аффинностью, превышающей аффинность их природных аналогов, трудно осуществимо. Это связано с тем, что в ходе естественного созревания антител в организме и их отбора уже была выбрана оптимальная комбинация аминокислотных остатков антитела, взаимодействующая с антигеном с максимальной аффинностью. Дальнейшее увеличение аффинности такого антитела с использованием комбинаторных методов уже не приведет к получению более высокоаффинного производного.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Антитела являются широко используемым инструментом для научных исследований, диагностики и терапии различных заболеваний. Во многих случаях использование в практической деятельности рекомбинантных антител и их фрагментов имеет ряд преимуществ по сравнению с применением полноразмерных антител, получен-

ных гибридным методом. Благодаря использованию генно-инженерных подходов, позволяющих изменять аминокислотную последовательность антител, можно улучшать такие характеристики антител, как специфичность, аффинность, стабильность, фармакокинетические параметры, эффекторные функции, способность антител проникать в различные ткани, и иммуногенность. Модифицируя вышеперечисленные свойства антител можно создавать новое поколение перспективных антител с улучшенными свойствами для решения научно-исследовательских задач и практической медицины. Дальнейшие перспективы увеличения аффинности антител связаны, прежде всего, с получением антител к тем антигенам, которые потенциально могут представлять терапевтический интерес, а также созданием ультравысокоаффинных антител, чей аффинитет может достигать 10^{-12} М и 10^{-15} М [92, 96, 106, 121, 210, 213]. В будущем, создание антител с такой высокой аффинностью позволит расширить сферу применения антител в научных исследованиях, диагностике и в качестве высокоспецифичных и высокоэффективных терапевтических агентов.

Авторы выражают благодарность и искреннюю признательность за внимательное прочтение обзора и ценные комментарии к.х.н. А.Г.Ламану (ФИБХ имени академиков М.М.Шемакина и Ю.А.Овчинникова РАН, Пушкино, Московская область), д.б.н., профессору Н.Б.Гусеву и к.б.н. А.В.Харитонову (Кафедра биохимии, Биологический факультет МГУ, Москва).

ЛИТЕРАТУРА

1. Hagemeyer, C.E., von Zur Muhlen, C., von Elverfeldt, D., and Peter, K. (2009) *Thromb. Haemost.*, **101**, 1012–1019.
2. Hudson, P.J. and Souriau, C. (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.*, **1**, 845–855.
3. Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., and MacKenzie, R. (2005) *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 501–519.
4. Buchner, J. and Rudolph, R. (1991) *Biotechnology*. (N. Y.), **9**, 157–162.
5. Cowell, L.G. and Kepler, T.B. (2000) *J. Immunol.*, **164**, 1971–1976.
6. Donzeau, M. and Knappik, A. (2007) *Methods Mol. Biol.*, **378**, 14–31.
7. Honegger, A. Troubleshooting antibody fragments. URL: <http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Introduction/VirtualSeminars/AE2003/source/slide01.htm>.
8. Maynard, J. and Georgiou, G. (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 339–376.
9. Winter, G., Griffiths, A.D., Hawkins, R.E., and Hoogenboom, H.R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 433–455.
10. Schroeder, H.W., Jr. and Cavacini, L. (2010) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, S41–52.
11. Volkov, V., Kayushina, R., Lapuk, V., Shtykova, E., Varlamova, E., Malfois, M., and Svergun, D. (2003) *Cryotomography Reports*, **48**, 98–105.
12. Padlan, E.A. (1994) *Mol. Immunol.*, **31**, 169–217.
13. Sundberg, E.J. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **524**, 23–36.

14. Kashmiri, S.V., De Pascalis, R., Gonzales, N.R., and Schlom, J. (2005) *Methods*, **36**, 25–34.
15. Padlan, E.A., Abergel, C., and Tipper, J.P. (1995) *FASEB J.*, **9**, 133–139.
16. Duquesnoy, R.J. Structural and functional definitions of epitopes reacting with mouse monoclonal antibodies. URL: HLAMatchmaker Website: <http://www.hlamatchmaker.net>.
17. Balint, R.F. and Larrick, J.W. (1993) *Gene*, **137**, 109–118.
18. Muller, Y.A., Chen, Y., Christinger, H.W., Li, B., Cunningham, B.C., Lowman, H.B., and de Vos, A.M. (1998) *Structure*, **6**, 1153–1167.
19. Saul, F.A. and Alzari, P.M. (1996) *Methods Mol. Biol.*, **66**, 11–23.
20. Nakanishi, T., Hori, M., Tsumoto, K., Yokota, A., Kondo, H., and Kumagai, I. (2007) Photon factory activity report, **25B**, 217.
21. Yokota, A., Tsumoto, K., Shiroishi, M., Kondo, H., and Kumagai, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5410–5418.
22. Chi, S.W., Maeng, C.Y., Kim, S.J., Oh, M.S., Ryu, C.J., Han, K.H., Hong, H.J., and Ryu, S.E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9230–9235.
23. Raghavan, M. and Bjorkman, P.J. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 181–220.
24. Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F.W. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, **24**, 541–570.
25. David, M.P., Asprey, J.J., Ibana, J.S., Concepcion, G.P., and Padlan, E.A. (2007) *Mol. Immunol.*, **44**, 1342–1351.
26. Berek, C. and Milstein, C. (1987) *Immunol. Rev.*, **96**, 23–41.
27. Chowdhury, P.S. (2003) *Methods Mol. Biol.*, **207**, 179–196.
28. Ho, M. and Pastan, I. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **525**, 293–308, xiv.
29. Tomlinson, I.M., Walter, G., Jones, P.T., Dear, P.H., Sonnhammer, E.L., and Winter, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **256**, 813–817.
30. Foote, J. and Eisen, H.N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1254–1256.
31. Batista, F.D. and Neuberger, M.S. (1998) *Immunity*, **8**, 751–759.
32. Cauerhff, A., Goldbaum, F.A., and Braden, B.C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3539–3544.
33. Ho, M., Kreitman, R.J., Onda, M., and Pastan, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 607–617.
34. Thorpe, I.F. and Brooks, C.L., 3rd (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8821–8826.
35. Davies, D.R. and Padlan, E.A. (1992) *Curr. Biol.*, **2**, 254–256.
36. Braden, B.C. and Poljak, R.J. (1995) *FASEB J.*, **9**, 9–16.
37. Acierno, J.P., Braden, B.C., Klinke, S., Goldbaum, F.A., and Cauerhff, A. (2007) *J. Mol. Biol.*, **374**, 130–146.
38. Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, A., Pugliese, L., Cambillau, C., and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 701–716.
39. Li, Y., Li, H., Yang, F., Smith-Gill, S.J., and Mariuzza, R.A. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 482–488.
40. Sundberg, E.J., Urrutia, M., Braden, B.C., Isern, J., Tsuchiya, D., Fields, B.A., Malchiodi, E.L., Tormo, J., Schwarz, F.P., and Mariuzza, R.A. (2000) *Biochemistry*, **39**, 15375–15387.
41. Masuda, K., Sakamoto, K., Kojima, M., Aburatani, T., Ueda, T., and Ueda, H. (2006) *FEBS J.*, **273**, 2184–2194.
42. Wedemayer, G.J., Patten, P.A., Wang, L.H., Schultz, P.G., and Stevens, R.C. (1997) *Science*, **276**, 1665–1669.
43. Barta, A.H. and Hirshaut, Y. (1987) *Methods of hybridoma formation*: Humana Press.
44. Engvall, E. and Perlmann, P. (1971) *Immunochemistry*, **8**, 871–874.

45. Van Weeman, B. and Schuur, A. (1971) *FEBS Lett.*, **15**, 232–235.
46. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350–4354.
47. Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M.E., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L.M., and Gusev, N.B. (1997) *Clin. Chem.*, **43**, 1379–1385.
48. Katrukha, A., Bereznikova, A., Filatov, V., and Esakova, T. (1999) *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 1091–1095.
49. Katrukha, A., Bereznikova, A., and Pettersson, K. (1999) *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, **230**, 124–127.
50. Koshkina, E.V., Krasnosel'skii, M., Fedorovskii, N.M., Goriacheva, E.V., Polupan, A.A., Arefev, A.A., and Katrukha, A.G. (2009) *Anesteziol. Reanimatol.*, 42–46.
51. Adams, J.E., 3rd, Bodor, G.S., Davila-Roman, V.G., Delmez, J.A., Apple, F.S., Ladenson, J.H., and Jaffe, A.S. (1993) *Circulation*, **88**, 101–106.
52. Feng, Y.J., Chen, C., Fallon, J.T., Lai, T., Chen, L., Knibbs, D.R., Waters, D.D., and Wu, A.H. (1998) *Am. J. Clin. Pathol.*, **110**, 70–77.
53. Vaidya, H.C. (1994) *J. Clin. Immunology*, **17**, 35–39.
54. Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Filatov, V.L., Esakova, T.V., Kolosova, O.V., Pettersson, K., Lovgren, T., Bulargina, T.V., Trifonov, I.R., Gratsiansky, N.A., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L.M., and Gusev, N.B. (1998) *Clin. Chem.*, **44**, 2433–2440.
55. Filatov, V.L., Katrukha, A.G., Bereznikova, A.V., Esakova, T.V., Bulargina, T.V., Kolosova, O.V., Severin, E.S., and Gusev, N.B. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 1179–1187.
56. Semenov, A.G., Postnikov, A.B., Tamm, N.N., Seferian, K.R., Karpova, N.S., Bloshchitsyna, M.N., Koshkina, E.V., Krasnoselsky, M.I., Serebryanaya, D.V., and Katrukha, A.G. (2009) *Clin. Chem.*, **55**, 489–498.
57. Krishnamurti, U. and Steffes, M.W. (2001) *Clin. Chem.*, **47**, 1157–1165.
58. Clark, P.M. (1999) *Ann. Clin. Biochem.*, **36** (Pt 5), 541–564.
59. Ludwig, J.A. and Weinstein, J.N. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 845–856.
60. Arthur, J.M., Janecz, M.G., Varghese, S.A., Almeida, J.S., and Powell, T.B. (2008) *Contrib. Nephrol.*, **160**, 53–64.
61. Nakamura, R.M. and Binder, W.L. (1988) *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **112**, 869–877.
62. Ekins, R. (1992) *Clin. Chem.*, **38**, 1289–1293.
63. Shivaraj, G., Prakash, B.D., Sonal, V., Shruthi, K., Vinayak, H., and Avinash, M. (2009) *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **13**, 341–349.
64. Cummings, M.C., Lukehart, S.A., Marra, C., Smith, B.L., Shaffer, J., Demeo, L.R., Castro, C., and McCormack, W.M. (1996) *Sex. Transm. Dis.*, **23**, 366–369.
65. Stamm, W.E., Cole, B., Fennell, C., Bonin, P., Armstrong, A.S., Herrmann, J.E., and Holmes, K.K. (1984) *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 399–403.
66. Black, C.M. (1997) *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 160–184.
67. Safford, J.W., Abbott, G.G., Craine, M.C., and MacDonald, R.G. (1991) *J. Clin. Pathol.*, **44**, 238–242.
68. Malomgre, W. and Neumeister, B. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1443–1451.
69. Cole, L.A. (2009) *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **9**, 721–747.
70. Andrew, S.M. and Titus, J.A. (2001) *Curr. Protoc. Immunol.*, Unit 2.8. DOI: 10.1002/0471142735.im0208s21, Online Posting Date: 2001.
71. Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M.L., Meier, D., and Dubel, S. (2007) *BMC Biotechnol.*, **7**, 14.

72. Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., and Pluckthun, A. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 435–444.
73. Whitlow, M., Bell, B.A., Feng, S.L., Filpula, D., Hardman, K.D., Hubert, S.L., Roffence, M.L., Wood, J.F., Schott, M.E., Milenic, D.E., and et al. (1993) *Protein Eng.*, **6**, 989–995.
74. Jain, M., Kamal, N., and Batra, S.K. (2007) *Trends Biotechnol.*, **25**, 307–316.
75. Wark, K.L. and Hudson, P.J. (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 657–670.
76. Chowdhury, P.S. and Vasmatzis, G. (2003) *Methods Mol. Biol.*, **207**, 237–254.
77. Conrad, U. and Scheller, J. (2005) *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **8**, 117–126.
78. Borrebaeck, C.A., Malmberg, A.C., Furebring, C., Michaelsson, A., Ward, S., Danielsson, L., and Ohlin, M. (1992) *Biotechnology*. (N. Y). **10**, 697–698.
79. Telleman, P. and Junghans, R.P. (2000) *Immunology*, **100**, 245–251.
80. Lo, B.K.C., ed. *Antibody engineering. Methods and protocols*. 2004, Humana Pressp.
81. Benhar, I. and Pastan, I. (1994) *Protein Eng.*, **7**, 1509–1515.
82. Tachibana, H., Cheng, X.J., Watanabe, K., Takekoshi, M., Maeda, F., Aotsuka, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T., and Ihara, S. (1999) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 383–387.
83. Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X.J., Maeda, F., Aotsuka, S., and Ihara, S. (1999) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 35–40.
84. Wlad, H., Ballagi, A., Bouakaz, L., Gu, Z., and Janson, J.C. (2001) *Protein Expr. Purif.*, **22**, 325–329.
85. Saviranta, P., Haavisto, T., Rappu, P., Karp, M., and Lovgren, T. (1998) *Bioconjug. Chem.*, **9**, 725–735.
86. Presta, L.G. (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 731–736; quiz 737.
87. Smith, G.P. (1985) *Science*, **228**, 1315–1317.
88. Hanes, J. and Pluckthun, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937–4942.
89. Liu, R., Barrick, J., Szostak, J.W., and Roberts, R.W. (2000) *Methods Enzymol.*, **1**, 268–293.
90. Daugherty, P.S., Chen, G., Olsen, M.J., Iverson, B.L., and Georgiou, G. (1998) *Protein Eng.*, **11**, 825–832.
91. Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P.S., Nayak, A.R., Iverson, B.L., and Curtiss, R., 3rd (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 29–34.
92. Boder, E.T., Midelfort, K.S., and Wittrup, K.D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10701–10705.
93. Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (1998) *Biotechnol. Prog.*, **14**, 55–62.
94. Boder, E.T. and Wittrup, K.D. (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 553–557.
95. Siegel, R.W. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **504**, 351–383.
96. Vaughan, T.J., Williams, A.J., Pritchard, K., Osbourn, J.K., Pope, A.R., Earnshaw, J.C., McCafferty, J., Hoddts, R.A., Wilton, J., and Johnson, K.S. (1996) *Nat. Biotechnol.*, **14**, 309–314.
97. Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellenhofer, G., Hoess, A., Wolle, J., Pluckthun, A., and Virnekas, B. (2000) *J. Mol. Biol.*, **296**, 57–86.
98. Luginbuhl, B., Kanyo, Z., Jones, R.M., Fletterick, R.J., Prusiner, S.B., Cohen, F.E., Williamson, R.A., Burton, D.R., and Pluckthun, A. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**, 75–97.
99. Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H.R., and Pluckthun, A. (1997) *J. Immunol. Methods*, **201**, 35–55.

100. Tabuchi, I., Soramoto, S., Nemoto, N., and Husimi, Y. (2001) *FEBS Lett.*, **508**, 309–312.
101. Matsuura, T. and Yomo, T. (2006) *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 449–456.
102. Pluckthun, A., Schaffitzel, C., Hanes, J., and Jermutus, L. (2000) *Adv. Protein Chem.*, **55**, 367–403.
103. Ulrich, H.D., Patten, P.A., Yang, P.L., Romesberg, F.E., and Schultz, P.G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11907–11911.
104. Levin, A.M. and Weiss, G.A. (2006) *Mol. Biosyst.*, **2**, 49–57.
105. Hawkins, R.E., Russell, S.J., and Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.*, **226**, 889–896.
106. Yang, W.P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A.T., Burton, D.R., and Barbas, C.F., 3rd (1995) *J. Mol. Biol.*, **254**, 392–403.
107. Verma, R., Boleti, E., and George, A.J. (1998) *J. Immunol. Methods*, **216**, 165–181.
108. Dimitrov, D.S. and Marks, J.D. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **525**, 1–27, xiii.
109. Dubel, S. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 723–729.
110. Groner, B., Hartmann, C., and Wels, W. (2004) *Curr. Mol. Med.*, **4**, 539–547.
111. Stemmer, W.P.C. (1995) *Nat. Biotechnol.*, **13**, 549–553.
112. Lippow, S.M., Wittrup, K.D., and Tidor, B. (2007) *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1171–1176.
113. Crameri, A., Raillard, S.A., Bermudez, E., and Stemmer, W.P. (1998) *Nature*, **391**, 288–291.
114. Stemmer, W.P. (1994) *Nature*, **370**, 389–391.
115. Chodorge, M., Fourage, L., Ravot, G., Jermutus, L., and Minter, R. (2008) *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**, 343–351.
116. Cline, J., Braman, J.C., and Hogrefe, H.H. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3546–3551.
117. Hoogenboom, H.R. and Chames, P. (2000) *Immunol. Today*, **21**, 371–378.
118. Martineau, P. (2002) *Methods Mol. Biol.*, **178**, 287–294.
119. Schlapschy, M., Gruber, H., Gresch, O., Schafer, C., Renner, C., Pfreundschuh, M., and Skerra, A. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 847–860.
120. Fujii, I. (2004) *Methods Mol. Biol.*, **248**, 345–359.
121. Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbuhl, B., Amstutz, P., Cambillau, C., and Pluckthun, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18870–18877.
122. Low, N.M., Holliger, P.H., and Winter, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **260**, 359–368.
123. Greener, A., Callahan, M., and Jerseth, B. (1996) *Methods Mol. Biol.*, **57**, 375–385.
124. Irving, R.A., Kortt, A.A., and Hudson, P.J. (1996) *Immunotechnology*, **2**, 127–143.
125. Lantto, J., Jirholt, P., Barrios, Y., and Ohlin, M. (2002) *Methods Mol. Biol.*, **178**, 303–316.
126. Букбулатова С.М., Мингазетдинова С.Р., Чемерис А.В., Вахитов В.А. (2009) *Успехи современной биологии*, **129**, 323–335.
127. Pogulis, R.J., Vallejo, A.N., and Pease, L.R. (1996) *Methods Mol. Biol.*, **57**, 167–176.
128. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J.A., and Arnold, F.H. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 258–261.
129. Sivasubramanian, A., Sircar, A., Chaudhury, S., and Gray, J.J. (2009) *Proteins*, **74**, 497–514.
130. Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., and Casal, J.I. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9029–9034.

131. *Essen, L.O. and Skerra, A.* (1994) *J. Mol. Biol.*, **238**, 226–244.
132. *Schiweck, W. and Skerra, A.* (1995) *Proteins*, **23**, 561–565.
133. *Marvin, J.S. and Zhu, Z.* (2005) *Drug Design Reviews – Online*, **2**, 419–425.
134. *Teng, S., Michonova-Alexova, E., and Alexov, E.* (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 123–133.
135. *Yue, P., Li, Z., and Moul, J.* (2005) *J. Mol. Biol.*, **353**, 459–473.
136. *Ng, P.C. and Henikoff, S.* (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3812–3814.
137. *Раменский В. и Сюняев И.* (2009) *Молекулярная биология*, **43**, 286–294.
138. *Sunyaev, S., Ramensky, V., and Bork, P.* (2000) *Trends Genet.*, **16**, 198–200.
139. *Sunyaev, S., Ramensky, V., Koch, I., Lathe, W., 3rd, Kondrashov, A.S., and Bork, P.* (2001) *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 591–597.
140. *Ramensky, V., Bork, P., and Sunyaev, S.* (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3894–3900.
141. *Bromberg, Y. and Rost, B.* (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3823–3835.
142. *Schymkowitz, J.W., Rousseau, F., Martins, I.C., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., and Serrano, L.* (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10147–10152.
143. *Teng, S., Madej, T., Panchenko, A., and Alexov, E.* (2009) *Biophys. J.*, **96**, 2178–2188.
144. *Brooks, B.R., Bruccoleri, R.E., Olafson, B.D., States, D.J., Swaminathan, S., and Karplus, M.* (1983) *Journal of Computational Chemistry*, **4**, 187–217.
145. *Boas, F.E. and Harbury, P.B.* (2008) *J. Mol. Biol.*, **380**, 415–424.
146. *Reumers, J., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., Serrano, L., and Rousseau, F.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, D527–532.
147. *Karchin, R., Diekhans, M., Kelly, L., Thomas, D.J., Pieper, U., Eswar, N., Haussler, D., and Sali, A.* (2005) *Bioinformatics*, **21**, 2814–2820.
148. *Capriotti, E., Fariselli, P., and Casadio, R.* (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, W306–310.
149. *Dehouck, Y., Grosfils, A., Folch, B., Gilis, D., Bogaerts, P., and Rooman, M.* (2009) *Bioinformatics*, **25**, 2537–2543.
150. *Lefranc, M.P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Fouquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., and Lefranc, G.* (2003) *Dev. Comp. Immunol.*, **27**, 55–77.
151. *Chowdhury, P.S.* (2002) *Methods Mol. Biol.*, **178**, 269–285.
152. *Yau, K.Y., Dubuc, G., Li, S., Hiram, T., Mackenzie, C.R., Jermutus, L., Hall, J.C., and Tanha, J.* (2005) *J. Immunol. Methods*, **297**, 213–224.
153. *Chowdhury, P.S. and Pastan, I.* (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 568–572.
154. *Marvin, J.S. and Lowman, H.B.* (2003) *Biochemistry*, **42**, 7077–7083.
155. *Selzer, T., Albeck, S., and Schreiber, G.* (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 537–541.
156. *Чызынов А.* (2007) URL: <http://biomolecula.ru/content/189>.
157. *Чызынов А.* (2008) URL: <http://biomolecula.ru/content/264>.
158. *Guo, J.T., Ellrott, K., and Xu, Y.* (2008) *Methods Mol. Biol.*, **413**, 3–42.
159. *Xu, J., Jiao, F., and Yu, L.* (2008) *Methods Mol. Biol.*, **413**, 91–121.
160. *Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M.A., Madhusudhan, M.S., Eramian, D., Shen, M.Y., Pieper, U., and Sali, A.* (2007) *Current Protocols in Protein Science*, Published online 2007 in Wiley Inter-science, unit 2.9.1–2.9.31, DOI: 10.1002/0471140864.ps0209s50.

161. Schwede, T., Kopp, J., Gnex, N., and Peitsch, M.C. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3381–3385.
162. Zhang, Y. (2008) *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.
163. Bates, P.A., Kelley, L.A., MacCallum, R.M., and Sternberg, M.J. (2001) *Proteins*, **Suppl. 5**, 39–46.
164. Lambert, C., Leonard, N., De Bolle, X., and Depiereux, E. (2002) *Bioinformatics*, **18**, 1250–1256.
165. Kelley, L.A. and Sternberg, M.J. (2009) *Nat. Protoc.*, **4**, 363–371.
166. Lund, O., Frimand, K., Gorodkin, J., Bohr, H., Bohr, J., Hansen, J., and Brunak, S. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 1241–1248.
167. Qian, B., Raman, S., Das, R., Bradley, P., McCoy, A.J., Read, R.J., and Baker, D. (2007) *Nature*, **450**, 259–264.
168. Zhang, Y. and Skolnick, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7594–7599.
169. Martin, A.C.R. and Allen, J., *Bioinformatics Tools for Antibody Engineering*, in *Handbook of Therapeutic Antibodies*. 2007.
170. Wu, T.T. and Kabat, E.A. (1970) *J. Exp. Med.*, **132**, 211–250.
171. Al-Lazikani, B., Lesk, A.M., and Chothia, C. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**, 927–948.
172. Chothia, C. and Lesk, A.M. (1987) *J. Mol. Biol.*, **196**, 901–917.
173. Chothia, C., Lesk, A.M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S.J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E.A., Davies, D., and Tulip, W.R. (1989) *Nature*, **342**, 877–883.
174. Martin, A.C., Cheetham, J.C., and Rees, A.R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9268–9272.
175. Honegger, A. and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 657–670.
176. MacCallum, R.M., Martin, A.C., and Thornton, J.M. (1996) *J. Mol. Biol.*, **262**, 732–745.
177. Brucoleri, R.E. (2000) *Methods Mol. Biol.*, **143**, 247–264.
178. Martin, A.C., Cheetham, J.C., and Rees, A.R. (1991) *Methods Enzymol.*, **203**, 121–153.
179. Whitelegg, N.R. and Rees, A.R. (2000) *Protein Eng.*, **13**, 819–824.
180. Whitelegg, N. and Rees, A.R. (2004) *Methods Mol. Biol.*, **248**, 51–91.
181. Marcatili, P., Rosi, A., and Tramontano, A. (2008) *Bioinformatics*, **24**, 1953–1954.
182. Sircar, A., Kim, E.T., and Gray, J.J. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, W474–479.
183. Wiehe, K., Peterson, M.W., Pierce, B., Mintseris, J., and Weng, Z. (2008) *Methods Mol. Biol.*, **413**, 283–314.
184. Comeau, S.R., Gatchell, D.W., Vajda, S., and Camacho, C.J. (2004) *Bioinformatics*, **20**, 45–50.
185. Sternberg, M.J., Gabb, H.A., Jackson, R.M., and Moont, G. (2000) *Methods Mol. Biol.*, **143**, 399–415.
186. Chaudhury, S. and Gray, J.J. (2008) *J. Mol. Biol.*, **381**, 1068–1087.
187. Goodsell, D.S., Morris, G.M., and Olson, A.J. (1996) *J. Mol. Recognit.*, **9**, 1–5.
188. Ewing, T.J., Makino, S., Skallman, A.G., and Kuntz, I.D. (2001) *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **15**, 411–428.
189. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., and Klebe, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **261**, 470–489.
190. Halgren, T.A., Murphy, R.B., Friesner, R.A., Beard, H.S., Frye, L.L., Pollard, W.T., and Banks, J.L. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 1750–1759.
191. Verdonk, M.L., Cole, J.C., Hartshorn, M.J., Murray, C.W., and Taylor, R.D. (2003) *Proteins*, **52**, 609–623.
192. Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A.M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731–1737.

193. Totrov, M. and Abagyan, R. (1997) *Proteins*, **Suppl. 1**, 215–220.
194. Wriggers, W. and Birmanns, S. (2001) *J. Struct. Biol.*, **133**, 193–202.
195. Sousa, S.F., Fernandes, P.A., and Ramos, M.J. (2006) *Proteins*, **65**, 15–26.
196. Skerra, A. (2000) *J. Mol. Recognit.*, **13**, 167–187.
197. Sidhu, S.S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F.A., Eigenbrot, C., and Fuh, G. (2004) *J. Mol. Biol.*, **338**, 299–310.
198. Bostrom, J., Lee, C.V., Haber, L., and Fuh, G. (2009) *Methods Mol. Biol.*, **525**, 353–376, xiii.
199. Lee, C.V., Liang, W.C., Dennis, M.S., Eigenbrot, C., Sidhu, S.S., and Fuh, G. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 1073–1093.
200. Rajpal, A., Beyaz, N., Haber, L., Cappuccilli, G., Yee, H., Bhatt, R.R., Takeuchi, T., Lerner, R.A., and Crea, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8466–8471.
201. Schier, R., Balint, R.F., McCall, A., Apell, G., Larrick, J.W., and Marks, J.D. (1996) *Gene*, **169**, 147–155.
202. Brorson, K., Thompson, C., Wei, G., Krasnokautsky, M., and Stein, K.E. (1999) *J. Immunol.*, **163**, 6694–6701.
203. Jackson, T., Morris, B.A., Martin, A.C., Lewis, D.F., and Sanders, P.G. (1992) *Protein Eng.*, **5**, 343–350.
204. Clark, L.A., Boriack-Sjodin, P.A., Eldredge, J., Fitch, C., Friedman, B., Hanf, K.J., Jarpe, M., Liparoto, S.F., Li, Y., Lugovskoy, A., Miller, S., Rushe, M., Sherman, W., Simon, K., and Van Vlijmen, H. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 949–960.
205. Liu, Y. and Kuhlman, B. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, W235–238.
206. Yuan, L., Kurek, I., English, J., and Keenan, R. (2005) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 373–392.
207. Wells, J.A. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8509–8517.
208. Riechmann, L. and Weill, M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 8848–8855.
209. Foote, J. and Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.*, **224**, 487–499.
210. Schier, R., McCall, A., Adams, G.P., Marshall, K.W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R.S., Weiner, L.M., Marks, C., and Marks, J.D. (1996) *J. Mol. Biol.*, **263**, 551–567.
211. Chen, C., Roberts, V.A., and Rittenberg, M.B. (1992) *J. Exp. Med.*, **176**, 855–866.
212. Gustchina, E., Louis, J.M., Frisch, C., Ylera, F., Lechner, A., Bewley, C.A., and Clore, G.M. (2009) *Virology*, **393**, 112–119.
213. Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., and Pluckthun, A. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1287–1292.

ISSN 0006-2979, Biochemistry (Moscow), 2010, Vol. 75, No. 13, pp. 1584–1605. © Pleiades Publishing, Ltd., 2010.

Original Russian Text © E. P. Altshuler, D. V. Serebryanaya, A. G. Katrukha, 2010, published in *Uspekhi Biologicheskoi Khimii*, 2010, Vol. 50, pp. 203–258.

REVIEW

Generation of Recombinant Antibodies and Means for Increasing Their Affinity

E. P. Altshuler, D. V. Serebryanaya*, and A. G. Katrukha

*Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,
119999 Moscow, Russia; E-mail: Daria.Serebryanaya@gmail.com*

Received April 21, 2010

Revision received June 24, 2010

Abstract—Highly specific interaction with foreign molecules is a unique feature of antibodies. Since 1975, when Keller and Milstein proposed the method of hybridoma technology and prepared mouse monoclonal antibodies, many antibodies specific to various antigens have been obtained. Recent development of methods for preparation of recombinant DNA libraries and *in silico* bioinformatics approaches for protein structure analysis makes possible antibody preparation using gene engineering approaches. The development of gene engineering methods allowed creating recombinant antibodies and improving characteristics of existing antibodies; this significantly extends the applicability of antibodies. By modifying biochemical and immunochemical properties of antibodies by changing their amino acid sequences it is possible to create antibodies with properties optimal for certain tasks. For example, application of recombinant technologies resulted in antibody preparation of high affinity significantly exceeding the initial affinity of natural antibodies. In this review we summarize information about the structure, modes of preparation, and application of recombinant antibodies and their fragments and also consider the main approaches used to increase antibody affinity.

DOI: 10.1134/S0006297910130067

Key words: recombinant antibody fragment, affinity, maturation, modeling, *in vitro* evolution, display

The development of the method of monoclonal antibody preparation by means of the hybridoma technology proposed by Keller and Milstein in 1975 significantly influenced both fundamental science and clinical practice. Owing to a unique feature of specific and high affinity interaction with antigens, monoclonal antibodies are actively used in scientific studies and in therapy of various diseases. Antibodies now represent one third of the total number of proteins used for therapy of various diseases in developed countries [1].

During the last 15 years the development of recombinant DNA technologies and creation of combinatorial

gene libraries and also appearance of various bioinformatics resources and methods of computer-aided modeling of three-dimensional structures of protein molecules have made it possible to prepare and improve recombinant antibodies. Using recombinant technologies it is possible to insert various modifications into antibody sequences, influence their biochemical and immunochemical properties [2], and increase antibody affinity. A clear advantage of recombinant technologies also is the possibility of preparation of recombinant analogs of existing antibodies and also *de novo* creation of antibodies specific to various antigens.

Many reviews highlighting various methods of recombinant antibody preparation have been published [2–9]. However, from our viewpoint little attention has been given to the problem and methodology of artificially increasing the affinity of recombinant antibodies. This review includes two main parts. In the first one we consider in detail the structure, preparation, and practical application of recombinant antibodies and their fragments. In the second part we systematize the main approaches used for preparation of high affinity recombi-

Abbreviations: C_H, constant domain of heavy chain; C_L, constant domain of light chain; CDR, complementarity determining regions; Fab, antigen-binding fragment; Fc, crystallizable fragment; FR, framework regions; Fv, variable fragment; HC, immunoglobulin heavy chain; Ig, immunoglobulins; IgG, immunoglobulin G; LC, immunoglobulin light chain; SDR, specificity determining regions; V_H, variable domain of heavy chain; V_L, variable domain of light chain.

* To whom correspondence should be addressed.

nant antibodies: from the methods of random or site-directed mutagenesis to recombinant DNA technologies for antibody production. Special attention is given to computer-aided modeling that predicts three-dimensional structure of antibodies and identifies amino acid residues that make the major contribution to antibody–antigen interaction and which can be replaced by other residues to create antibodies with increased affinity.

ANTIBODIES: STRUCTURE, FUNCTIONS, AFFINITY MATURATION *in vivo*, AND PRACTICAL APPLICATION

Antibodies (immunoglobulins) are a family of glycoproteins existing in blood plasma and tissue fluids of vertebrates; they can recognize and bind foreign substances (antigens). The antigen site that specifically interacts with an antibody is known as an epitope, and the antibody site interacting with an antigen is known as a paratope [10]. In this chapter, using immunoglobulins G, we consider structure of antibodies, their main functions, the process of their affinity maturation *in vivo*, and also some aspects of application of antibodies in scientific studies, diagnostics, and therapy of various diseases.

Structure of Immunoglobulins

In most mammals five different classes of immunoglobulins (Ig) have been found: IgG, IgA, IgM, IgD, and IgE. Antibodies of various classes differ in size, charge, amino acid composition, and content of the carbohydrate component. Normally, IgG predominate in human serum and they usually represent about 70–75% of the total amount of serum antibodies [10–12]. The IgG antibody molecule is composed of four polypeptide chains: two identical heavy chains (HC) with molecular mass of 50–77 kDa and two identical light chains (LC) with molecular mass of 25 kDa (Fig. 1; see color insert). Each LC contains two domains: one variable domain (V_L , variable domain of the *light* chain) and one constant domain (C_L1 , constant domain of the *light* chain); each HC contains one variable domain (V_H , variable domain of the *heavy* chain) and three constant domains (C_H1 –3, constant domains of the *heavy* chain). Each domain is mainly a β -sheet structure formed by seven antiparallel β -strands forming two β -sheets. The structure of each Ig domain is stabilized by an intradomain disulfide bond. In addition, disulfide bonds are also formed between light and heavy chains as well as between heavy chains. Each pair of variable domains V_H and V_L located within neighboring heavy and light chains form one variable fragment (Fv). Amino acid variability differs inside variable domains. The highest level of variability is in the so-called

hypervariable regions known as complementarity determining regions (CDR), which determine complementarity of antigen–antibody interaction. Variable domains of heavy and light chains contain three CDR (V_L CDR1–3, V_H CDR1–3). In the amino acid sequence of the variable domain these regions alternate with four relatively invariant regions known as the framework regions (FR1–FR4), which represent about 80% of the amino acid sequence of V-domains. The role of these regions is the maintenance of similar three-dimensional structure of the V-domain, which is required for specific interaction of the hypervariable regions with antigen [10, 12].

The variable domains of light and heavy chains (V_H and V_L) together with the nearest constant domains (C_H1 and C_L1) form antibody Fab-fragments (fragment, antigen binding). The remaining part represented by the C-terminal heavy chain constant domains is defined as the Fc-fragment (fragment, crystallizable). Fab and Fc fragments are linked by the hinge region, which provides relative flexibility of fragments of the antibody molecules and contains disulfide bonds linking heavy chains to each other [10, 12].

As mentioned above, CDR play a key role in the antibody–antigen interaction. These hypervariable regions are loops located between β -sheets, which significantly vary in amino acid sequence and length in various antibodies. CDR provide complementarity of paratope and epitope surfaces, and this determines antigen recognizing capacity of apical regions of the variable domains. Epitope recognition on the complementary antigen surface by the three-dimensional structure formed by six loops of CDR is a basis for antibody–antigen interaction. In the case of antibodies specific to small antigens (such as low molecular weight compounds) only some CDR are involved into interaction with the antigen [13]. Usually V_H CDR (especially V_H CDR3) rather than V_L CDR make major contribution into contact formation with the antigen and the geometrical center of the antibody–antigen contact is usually located near V_H CDR3 [13]. CDR residues directly involved in contact with the antigen are called specificity determining regions (SDR). Analyzing three-dimensional structure of the antibody–antigen complex, it is possible to identify amino acid residues directly involved in contact with the antigen. Certain evidence exists that FR may also be involved into antigen recognition, but their role is rather modest: the proportion of such sites may reach 15% of surface contact sites participating in antibody–antigen contacts [13–15].

Antibody–antigen complexes are characterized by high complementarity in their interacting surfaces. The interaction surface of protein antigen and antibody varies from 1400 to 2300 Å² with approximately equal contribution of antibody (650–900 Å²) and antigen [16]. Usually from 5 to 15 residues of protein antigens and approximately the same number of antibody residues are involved in the antibody–antigen interaction [16, 17]. However,

smaller antigens (e.g. low molecular weight antigens) have smaller contact area during antibody binding. The shape of the antibody–antigen contacting surface significantly depends on the antigen size. The antibody contact surface becomes more concave as the antigen becomes smaller. Usually the antibody contact surface involved in binding of protein molecules is planar, whereas the surface binding smaller antigens represents a groove (in the case of peptides) or a single cavity (in the case of low molecular weight nonpeptide substances) [13, 18]. The spatial structure of the antigen binding site is determined by the length and amino acid composition of CDR loops. The CDR3 loops are characterized by significant flexibility, which makes possible mutual epitope–paratope adaptation. In the case of small antigens (including peptides) the conformation flexibility may be more pronounced compared with protein antigens. The main types of conformation flexibility include concerted translocations of several CDR loops and changes in side group location in some CDR residues. Antigens are also characterized by conformational changes during their interactions with antibodies.

The interaction between epitope and paratope amino acid residues mainly occurs due to hydrogen bonds, electrostatic interactions, and to a lesser extent van der Waals interactions [13, 19]. Some studies revealed that the structures of many complexes formed by protein antigens and antibodies contain water molecules in the paratope regions within common structure. It is suggested that in such complexes water molecules are required for filling complementarity gaps between the protein antigen molecule and the antibody [18, 20, 21].

The antibody antigen binding energy is mainly determined by a small number of interactions between epitope and paratope amino acid residues. Substitution of such amino acid residues in the natural antigen or antibody variants for alanine is often accompanied by decreased binding of antibody and antigen (see below). Selection of alanine as the candidate for possible substitution is determined by the fact that this is the mildest mode of elimination of interactions determined by the amino acid side group without appearance of additional interactions. Experiments of epitope and paratope mapping revealed so-called hotspots: the amino acids that make the major contribution to the antibody–antigen interaction. Such residues are usually located in the central part of the epitope–paratope interaction site. Peripheral residues contacting with the aqueous medium make significantly smaller contribution to the antibody–antigen binding energy [16]. In addition to amino acid residues directly involved into interaction with the antigen, there are other residues that play an important role in antigen recognition; they play a structural role and determine correct spatial positioning of the contact surfaces. These residues maintain certain conformation of CDR loops required for interaction with antigen [22].

Immunoglobulin Functions

B-Lymphocytes synthesize antibodies in response to the appearance of antigens in humans and other vertebrate organisms. Antibodies are involved in several processes occurring in the immune system: 1) prevention of penetration of foreign (including pathogenic) molecules into cells and their degradation due to complex formation with antibodies; 2) stimulation of elimination of foreign objects by macrophages and other cells by means of antibody interaction with their surface antigens (opsonization); 3) triggering of mechanisms of foreign particle degradation by stimulating the immune response (activation of the complement system).

Antibodies of all isotypes have two main functions: 1) recognition and binding of antigens; 2) effector functions that include binding to cell membrane receptors (e.g. phagocytes) and interaction with the first component of the complement system for initiation of the classical pathway of the complement cascade. Effective recognition and binding of antigens by antibodies requires high antibody specificity needed for recognition of the particular antigen and high antibody affinity for formation of stable antibody–antigen complex. Variable domains of antibodies are involved in the first function. Constant domains maintain structural organization of variable domains; they also play effector functions promoting neutralization and elimination of potential pathogens. Neutralization of some viruses and toxins requires only interaction with the antibody, whereas elimination of pathogenic microorganisms or endogenous cells not controlled by the organism needs triggering of other effector mechanisms such as phagocytosis and cytotoxic reactions. In this case antibody Fab-fragments bind to surface cell antigens, whereas Fc-fragments of such antibodies may interact with complement system proteins, which kill cells by membrane perforation or with Fc-cell receptors localized on the surface of immune system cells capable of phagocytosis [23]. Thus, the presence of the Fc-fragment and Fab-fragments in the antibody molecule accounts for its capacity to recognize particular antigen and to activate the system of elimination of foreign substances and some endogenous cells.

To recognize and bind each particular antigen, antibodies should pass through the affinity maturation process.

Affinity Maturation of Antibodies *in vivo*

Antibodies recognize millions of different antigens due to huge diversity of their binding sites. Information about different variants and antibody sequence is not originally coded in the genome; it is created in B-lymphocytes by recombination of a limited number of gene segments. In human and mouse genomes there are families of IgG genes grouped into three independent genetic loci: two of

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1587

them code IgG light chains and one locus codes IgG heavy chain. Each of these families includes many genes coding variable domains and single genes coding constant domains. These groups of genes are located at significant distance from each other. In the first stage LC and HC are formed due to recombination of genes coding for one variable and one constant IgG region. The nucleotide sequences D and J located between V- and C-genes code small fragments of the polypeptide chain that are included into the variable region. B-Lymphocyte maturation is accompanied by recombination of V, D, and J genes; this leads to approaching of nucleotide sequences coding variable and constant domains and also promoters preceding each gene and enhancers located in the intron between the J- and C-segments and in the distal region after the C-genes. Thus, recombination results in formation of a transcription unit containing introns and exons. Splicing of primary RNA transcript leads to intron removal, and the exons form an mRNA molecule that will be then translated into the corresponding protein [24]. Such scenario creates molecular diversity of the recognition site located on the continuous surface formed by CDR loops. The resulting antibodies known as germline antibodies demonstrate rather low affinity and specificity to their antigens [13, 25].

During the next stage of antibody maturation the affinity and specificity of germline antibodies increase due to somatic hypermutation of the antibody variable regions. The somatic hypermutation is the machinery generating numerous antibody variants due to appearance of random point mutations in gene segments accompanied by selection of the most suitable clones. During somatic hypermutation clone selection in the immune system occurs as follows. The membrane form of immunoglobulins immobilized on the B-cell surface interacts with its antigen. The resulting antibody–antigen complex undergoes internalization followed by subsequent antigen processing, and resulting antigen-derived peptides interact with major histocompatibility complex II and are presented by T-cells. Subsequent antigen presentation by T-cells is accompanied by activation of B-cells. If affinity of antibodies exposed on the B-cell surface is not high enough the antigen dissociates from the antibody within the time interval required for internalization, and activation of this particular B-cell does not occur. If the lifetime of the antibody–antigen complex significantly exceeds the time interval required for internalization, B-lymphocyte activation occurs. In this case the immune system is unable to perform subsequent selection among several variants of high affinity antibodies. Mutations occur unevenly in both CDR-loops and FR with an average frequency of 1 per 10^3 base pairs during one cycle. This increases immunoglobulin diversity originated from recombination of gene segments. The resulting antibodies are known as mature antibodies [25, 26].

Studies of mechanisms of somatic hypermutation have shown that during antibody maturation variable

domain mutations mainly appear in certain CDR and FR sites. These sites are called hotspots, whereas the sites rarely involved into the mutagenesis process are called as coldspots. Usually, coldspot amino acid residues coincide with the residues crucial for formation of variable domain conformation. It is known that in 50–60% of cases hotspots are located inside the consensus nucleotide sequence RGYW (R = A or G, Y = C or T, W = A or T) and serine codons AGC and AGT or neighboring nucleotides [27, 28]. Among other trinucleotides and also dinucleotides there is a hierarchy of mutations, and mutations in V-genes occur at a frequency that is a million times greater than spontaneous mutation in other genes. In CDR and FR there are differences in codon composition, and CDR contain codons in which mutations occur most frequently [25]. In the primary antibody population differences in antibody sequence are mainly located in the center of the antigen binding site, and the differences also cover the peripheral part of the antigen binding site due to somatic hypermutation [29].

During secondary immune response IgG antibodies specific to protein antigens are characterized by dissociation constant (K_D) values ranging from 10^{-7} – 10^{-10} M $^{-1}$. The maximally possible rate of antibody antigen complex formation is determined by the rate of diffusion of protein molecules. In this case the association rate constant (k_a) is about 10^6 M $^{-1}$ ·sec $^{-1}$. The dissociation rate constant (k_d) may reach up to 10^{-4} sec $^{-1}$, and its value is determined by *in vivo* selection of primary antibody variants [8, 30]. According to the hypothesis of affinity ceiling [30–32] selection of antibodies with higher affinity occurs less effectively and subsequent increase in affinity does not increase selection efficiency. This may be attributed to the fact that for antibodies with K_D values of 10^{-10} M $^{-1}$ the half-lifetime of the antigen complex with the B-cell receptor is 30 min. This value is 2–3-fold higher than the time required for endocytosis of the antibody complex with the B-cell receptor (about 8.5 min). Thus, subsequent increase in affinity (half-lifetime for the complex) does not promote adaptive increase in B-cell proliferation [31, 33]. Consequently, in theory artificial mutagenesis similar to somatic hypermutation and artificial selection of antibody variants of the highest affinity can result in production of antibodies with higher affinity compared to natural antibodies.

In the case of primary antibodies their association with antigens is accompanied by an increase in enthalpy (due to numerous weak and strong antibody–antigen interactions) with simultaneous decrease in entropy (loss of mobility in the structure of the free antibody). In the case of dissociation the opposite situation occurs (enthalpy of the system decreases and entropy increases). Relative increase in affinity of the final antibody variants occurs due to removal of entropy problems by decreasing mobility of a free antibody [13]. Primary antibodies are usually characterized by higher flexibility and mobility of their antigen-

binding loops. This helps them to recognize a set of similar antigens by forming different variants of complementary surfaces due to the flexible loop structure. Interaction of primary antibodies with antigens can be described by the induced fit model, when the epitope structure influences formation of a complementary paratope during the binding process. However, maturation of antibodies accompanied by increase in their affinity and specificity results in decrease in flexibility of the antigen-binding loops, and the process of antibody antigen interaction becomes increasingly similar to the lock and key model. After affinity maturation, the antigen binding site loses its mobility and remains fixed in the conformation, the best complementarity to a certain epitope. Thus, increase in antibody affinity and specificity occurs due to reduction of loop mobility in the antigen-binding site [34]. On the other hand, for some antibodies increase in conformational mobility allows increase in spatial complementarity of paratopes to the epitopes by the induced fit interaction. This effect accounts for the increase in affinity of some antibodies after introducing glycine into the CDR sequence; glycine increases conformational mobility without any significant change in the antigen interaction surface [35–37].

In most proteins conservative mutations, i.e. substitutions for amino acids with similar physicochemical properties, represent the major part of preserved amino acid substitutions; this leaves fewer chances to change the protein conformation. However, this is not always true for variable domains of antibodies because substitutions for amino acids with opposite properties sometimes result in an increase in antibody affinity. Such mutations usually occur in the CDR but sometimes in FR as well; since FR residues play an important role in formation and maintenance of stability of protein structure, their mutations may also influence antibody affinity. In general, appearance of conservative mutations is more typical for FR whereas appearance of non-conservative mutations accompanied by significant changes in physicochemical properties is more typical for CDR. In the case of amino acid residues located inside the protein molecule conservative mutations are more typical than for residues susceptible to the solvent. During antibody maturation the CDR residues susceptible to the solvent are usually substituted for hydrophobic, polar, and polarized residues, which increase interaction with the antigen. Although theoretically for each amino acid position 19 substitution variants exist, in fact the number of observed mutations is significantly lower due to energetic barriers, genetic code degeneration, and also most amino acid substitutions occur due to single nucleotide substitution. In addition, transitions (i.e. substitutions of purine base for purine or pyrimidine base) dominate over transversions (i.e. substitutions of purine base for pyrimidine or vice versa). Transitions usually occur two times more frequently than transversions, and so the number of possible variants for amino acid substitution at each position decreases to 13–15 [5, 25, 38].

Affinity of mature antibodies is determined by mutations introduced into the primary antibody sequence. Antibodies containing in the paratope many residues capable of forming hydrogen bonds and ionic interactions demonstrate high affinity to the antigen [25]. Mutations promoting antigen–antibody bond formation involving water bridges also increase antibody affinity [13]. This is also accompanied by an increase in peripheral hydrophobic and van der Waals interactions due to the increase in hydrophobic surface area. Such increase in hydrophobic interactions is a consequence of small coordinated rearrangements of amino acid residues on the periphery of the contacting surface, whereas the most energetically important interaction site remains unaltered. Somatic hypermutation not only results in an increase in affinity by amino acid substitutions at the antigen binding site, but it also increases interaction between V_L - V_H domains, thus increasing stability and decreasing plasticity of the antibody molecule. At the same time these changes improve antibody binding with antigen [37, 39–41]. The number of somatic mutations that appear during antibody maturation positively correlates with the increase in affinity of antibodies [13, 32, 42]. Thus, it appears that amino acid substitutions that appear during somatic hypermutation not only increase chemical reactivity of CDR residues but also maintain their structure.

Preparation and Practical Use of Antibodies

Antibodies are widely used in both scientific studies and also in practical medicine due to their ability to recognize any antigen with high affinity and specificity.

The easiest method for preparation of antibodies specific to a particular antigen is immunization, i.e. *in vivo* administration of the antigen in a mixture with certain additives, adjuvants that increase the immune response of the animal (mouse, rabbit, goat, sheep, etc.). Blood of the immunized animal can be used for isolation of polyclonal antibodies, a heterogeneous (by structure, epitope specificity, and affinity) population of antibodies specific to the administered antigen. Preparation of antibodies characterized by identical structure and specificity requires isolation of antibody-producing lymphocytes and their subsequent immortalization (i.e. formation of cells with countless replicative capacity). The immortalization is performed by fusion of the lymphocytes with tumor cells. The cell line representing a product of lymphocyte fusion with the tumor cells is known as a hybridoma. Hybridomas can secrete antibodies that are absolutely the same in their properties (structure, affinity, specificity). Antibodies produced by the hybridoma cell line are known as monoclonal antibodies [43].

Antibodies are one of the most widely used instruments in modern biochemistry, cytology, and clinical chemistry. They are used for qualitative and quantitative

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1589

determination of various substances by the methods of enzyme-linked immunosorbent assay [44, 45] and immunoblotting [46]; antibodies can be used to study intracellular and extracellular localization of proteins and distribution and expression level of proteins in various cells of organisms by the methods of immunohistochemistry and immunocytochemistry. Antibodies can also be used for cell sorting by flow cytometry and for purification of various proteins.

In medicine antibodies are widely used in diagnostics and in therapy of various diseases. In diagnostics various immunochemical methods are used for detection of the presence of proteins or determination of protein concentration. The list of such proteins is very long and is constantly increasing. It includes protein markers of cardiovascular diseases (troponins I and T [47-51], creatine kinase [52], myoglobin [53], B-type natriuretic peptide and its precursor [54-56], etc.), diabetes mellitus (glycated hemoglobin [57], microalbumin, insulin, proinsulin, C-peptide [58], etc.), cancer diseases [59], pathologies associated with pregnancy, renal disease (cystatin C [60]), autoimmune diseases (antibodies to endogenous cell components of the body [61]), allergies (total antibody content, content of antibodies to particular antigens), endocrine system disorders (hormones, their precursors, products of their metabolism and proteins interacting with them [62, 63]), various infectious diseases [64-67], etc.

Antibodies are also used for determination of blood groups [68], diagnostics of pregnancy [69], and detection of drug or toxin content in human blood and also in food-stuffs.

Therapeutic use of full-length antibodies obtained from serum of immunized animals or using hybridoma technologies is significantly complicated by the fact that the constant domains of animal antibodies are strongly immunogenic for humans, and this causes production of endogenous antibodies specific to animal antibodies [6]. Thus, for therapeutic purposes recombinant antibodies or their fragments are used; they are obtained from monoclonal antibodies with significantly reduced immunogenicity (by means of gene engineering manipulations) or prepared *de novo* using various display methods (considered below in the section "Practical Application of Recombinant Antibodies in Clinical Practice and Scientific Studies").

RECOMBINANT ANTIBODIES: DERIVATIVES AND FRAGMENTS, METHODS FOR THEIR PREPARATION, AND PRACTICAL IMPORTANCE

Recombinant antibodies are antibodies obtained by means of gene engineering. Using gene engineering methods it is possible to express light and heavy chains of immunoglobulins as individual proteins, to create the

whole set of various antibody fragments, and also to change such antibody properties as affinity, number and specificity of paratopes, domain composition, molecule mobility, spatial orientation of antigen binding sites, molecular weight, isoelectric point, and potential immunogenicity.

Types of Recombinant Antibody Fragments

Preparation of several different types of recombinant antibody fragments has been described in the literature (Fig. 2 shows some of them). The following types of recombinant antibodies are now recognized: Fv, variable fragment; scFv, single chain Fv in which light and heavy chain fragments are connected by a polypeptide linker; (scFv)₂, fragment that consists of two scFv molecules connected by a disulfide bond; dsFv, variable fragment stabilized by additional intramolecular disulfide bond; Fab- and (Fab)₂, fragments identical in their structure with fragments formed during proteolysis of full-length IgG antibodies by papain and pepsin, respectively [70]; V_H, heavy chain variable domain. There are antibody derivatives known as "diabodies", "triabodies", and "tetrabodies"; their molecules consist of two, three, or four identical or different fragments of antibodies of the same or different specificity linked together. The Fv fragment is the smallest antibody fragment that retains antigen binding capacity. It consists of variable fragments of light (V_L) and heavy (V_H) chains, each of which is stabilized by an intramolecular disulfide bond. However, contacts between V_H and V_L involve only ionic interactions and therefore the structure of this fragment is very unstable. Structural stability of Fv fragments can be achieved by either insertion of interchain

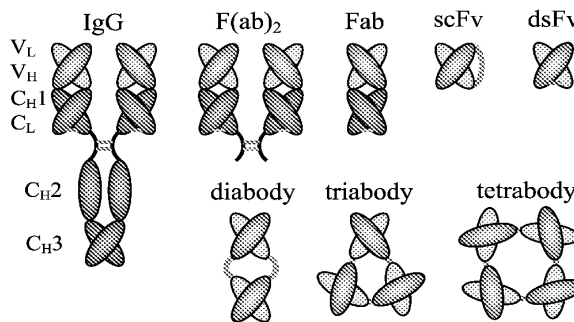


Fig. 2. Main types of fragments and derivatives of recombinant antibodies. Designations: V_L, LC variable region; V_H, heavy chain variable region; C_L, constant region of light chain; C_{H1}, C_{H2}, and C_{H3} are constant regions of heavy chain; IgG, full length immunoglobulin G. Light gray contour lines show disulfide bonds between various chains, dark gray lines show linker sequences inserted for stabilization of the recombinant antibody structure (prepared using [74, 75]).

disulfide bonds (dsFv) or a linker amino acid sequence between variable domains of the HC and LC chains (scFv), and the resulting antigen-binding protein molecule is expressed as a single polypeptide chain [71-73].

The scFv fragments are the “simplest” object for cloning and expression; however, they frequently exhibit lower stability and, sometimes, lower affinity; during therapeutic use they are characterized by shorter half-lifetime in the blood circulation compared with larger fragments [37, 74-78]. The complexes consisting of two (“diabodies” or (scFv)₂), three (“triabodies”), and four scFv-monomers (“tetraabodies”) often demonstrate even higher affinity to the antigen due to increased number of antigen-binding sites. This occurs when scFv-monomers are derived from identical antibodies and the antigen contains many identical epitopes, or in the case when the scFv-monomers are derived from different antibodies to the same antigen and all antigen epitopes are susceptible to them. The (scFv)₂ fragments obtained by disulfide bond linking between C-terminal cysteine residues demonstrate better *in vivo* transport into tissues compared with the scFv-fragments during their use as therapeutic agents. This occurs due to longer half-lifetime in the bloodstream and higher structural stability compared with scFv. Recombinant antibody derivatives containing the Fc-fragment are characterized by even longer half-lifetime; the long-term presence of such antibody derivatives in tissues is determined by interaction with FcRB receptors (Fc Brambell receptor) located on the surface of hemopoietic and endothelial cells [79, 80].

Preparation of Recombinant Antibodies and Their Fragments

There are two principally different approaches for preparation of recombinant antibodies. The first consists in generation of recombinant analogs of monoclonal antibodies or their fragments using genetic materials from hybridoma cells producing monoclonal antibodies. The second approach is based on the development of libraries containing numerous variants of recombinant antibody sequences followed by subsequent selection of antibodies of required specificity and affinity, i.e. *de novo* formation of antibodies of necessary specificity.

Creation of recombinant analogs of antibodies. The method of preparation of recombinant antibodies or their fragments identical to antibodies obtained by the standard hybridoma method includes the following main stages [81-84]: 1) isolation of total RNA from hybridoma cells secreting antibodies; 2) first strand cDNA synthesis (reverse transcription); 3) amplification of heavy and light chain cDNAs by polymerase chain reaction [80]; 4) preparation of molecular-genetic constructs containing resulting cDNA; 5) expression (or coexpression) in a suitable expression system [85]; 6) isolation and purification

of the expressed protein [85]. Using this method it is possible to obtain both full-length antibodies and their fragments and also antibody light and heavy chains as individual proteins. Use of gene engineering methods for antibody preparation allows manipulations with nucleotide and consequently amino acid sequence of light and heavy chains.

Creation of recombinant antibodies and their fragments *de novo*. The method for preparation of recombinant antibodies or their fragments *in vitro* using selection in antibody fragment libraries for antigen binding capacity is the alternative approach for preparation of recombinant antibodies [86]. Methods used for solution of this problem are known as display methods. The advantage of these methods is the possibility of simultaneous work with nucleotide and amino acid sequence of each particular antibody variant. Preparation of recombinant antibody fragments using this approach includes three steps: creation of recombinant antibody DNA libraries, expression and presentation of antibody fragments on a cell surface or phage particles (depending on the display method used), and selection of suitable antibody fragments by their interaction with the antigen. If a full-length antibody specific to a corresponding antigen is needed, initially an antibody fragment is prepared and then used as a basis for reconstruction of full-length nucleotide and amino acid sequences of this antibody.

The display principle consists of the use of nucleotide sequence of the target protein and product of its expression in a single molecular complex. Using this approach it is possible to select necessary genetic material (DNA or RNA) by ability of the product of its expression (immunoglobulin or its fragment) to interact with this antigen. Using several repeated selection cycles it is possible to obtain antibodies demonstrating high affinity interaction with the antigen. Several display methods for preparation of antibodies are now known: phage, ribosomal, mRNA, and cell display [9, 87-95]. All these approaches can be used not only for creation of antibodies *de novo*, but also for improvement of parameters of existing antibodies (see section “Increasing Antibody Affinity”).

Antibody fragments rather than full-length antibodies are usually the basis for creation and testing of antibody libraries. Since scFv fragments are the smallest stable antibody units that can bind antigens, it is much easier to use them to increase affinity in each type of display than full-length antibodies or Fab-fragments. There are several principles for creation of libraries of recombinant antibody fragments [77]: 1) on the basis of antibody genes obtained from immunized donors (library enriched with antibodies to certain antigens); 2) on the basis of primary antibody genes (see section “Affinity Maturation of Antibodies”); 3) on the basis of nucleotide sequence of antibodies obtained from B-lymphocytes [96]; 4) on the basis of sequences of the most stable variable antibody domains with randomized residues in artificially synthesized CDR-loops [97].

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1591

The display technology is used for selection of antibodies with needed properties from the huge number of variants (10^8 – 10^9) available in the library. The common feature of all these methods is the joining of nucleotide and amino acid sequences of the selected antibody fragment in a single object, and their difference consists of the type of such object: from the mRNA complex with the antibody fragment synthesized on this template to the cell carrying the antibody fragment on its surface. Although such recently developed methods as cell display and ribosomal and mRNA displays are becoming increasingly popular, phage display still remains the most widely used and the simplest method.

Cell display. The cell display method uses various prokaryotic or eukaryotic cell systems for expression of various antibody variants and also for selection of the expressed antibodies by certain characteristics. In this case the created library of hybrid DNA simultaneously contains nucleotide sequences of antibody fragments and a transmembrane domain of one of the membrane proteins, and the antibodies synthesized after cell transformation (or transfection) by such library represent hybrid proteins consisting of a native antibody fragment exposed to the extracellular space and the transmembrane domain responsible for anchoring the antibody fragment in the membrane. Thus, the cell functions as a link between the expressing antibody variant and the genes that code it. Clones with the highest affinity are selected by a variant of flow cytometry known as fluorescence activated cell sorting (FACS) [90, 95]. This method is based on the sorting of cells containing antibody fragments of their surface together with a fluorescently labeled antigen. Differences in fluorescence intensity emitted by cells distinguish variants possessing affinity to antigen from variants not capable of antigen binding, and they serve as the criterion for sorting of the material.

There are prokaryotic and eukaryotic displays. The prokaryotic display is characterized by high transformation efficiency and simple use, but it has limited applicability because some antibody fragments containing potential glycosylation sites are functionally inactive when synthesized in the bacterial system. Several transmembrane proteins have been proposed for anchorage of synthesized antibody molecules on the surface of bacterial cells. These transmembrane proteins are used for creation of chimeric proteins containing antibody fragments. For example, the outer membrane protein OmpA is often used for anchorage of the antibody scFv fragments [90, 91].

Using the eukaryotic display it is possible to express both various antibody fragments and full-length antibodies because a protein molecule synthesized in such system has all eukaryotic-specific posttranslational modifications needed for functioning. The yeast display is one of the most widely used versions of the eukaryotic display because yeast cells are the simplest ones for gene engineering manipulations and cultivation. Recombinant antibody fragments are exposed on the yeast cell surface

as a part of hybrid proteins that consist of the antibody or its fragment and the Aga2p agglutinin subunit, which is covalently linked by means of two disulfide bonds with Aga1 agglutinin anchored in the yeast cell wall [92–95]. A similar strategy has also been developed for antibody expression in mammalian cells [94].

Phage display. In the phage display method [87] a gene of the hybrid protein joining an antibody fragment and a phage surface protein is inserted into the bacteriophage genome. Ig fragments are exposed on the surface of viral particles (Fig. 3; see color insert). Phage particles are selected by affinity of antibody fragments to the antigen. Usually the phage M13 is used for preparation of the phage display, and antibody fragments are expressed as hybrid proteins with the phage envelope proteins pIII, pIV, and pVIII [80]. Selection of phage particles is then accompanied by phage cDNA isolation and determination of nucleotide sequence of antigen fragments. This sequence is used for subsequent generation of full-length recombinant antibodies [8, 9, 87, 98, 99].

Ribosome display. Ribosome display is another display method [80, 88]; it uses a cell-free system for synthesis of a polypeptide chain on the mRNA template. Protein synthesis in this system is accompanied by formation of the ternary protein–ribosome–mRNA complex (Fig. 4). This complex is then isolated from solution using

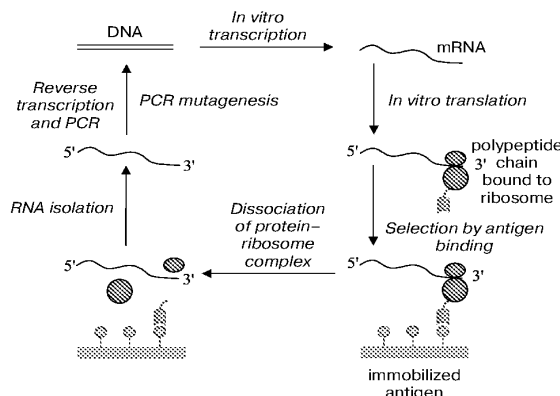


Fig. 4. Ribosome display. A library of antibody genes (e.g. scFv fragments) is transcribed and translated *in vitro*. The resulting mRNA lacks a stop codon and this preserves the ribosome–protein complexes, which are subjected to subsequent selection using the immobilized antigen similarly to selection of the phage display. The selected complexes are used for preparation of mRNA used as a template for reverse transcription and PCR. Using point substitutions inserted into the nucleotide sequence, it is possible to create new variants of antibody fragments that can be used in the subsequent cycle. A DNA molecules coding high affinity variants of antibodies selected during several display cycles can be obtained by the method of reverse transcription of mRNA molecules and PCR and used for subsequent cloning and expression (summarized from [102, 213]).

capacity of the synthesized antibody fragment to bind the target antigen. Using this method it is possible to select simultaneously the highest affinity antibody fragments together with their mRNA. In this case a ribosome functions as a stabilizer of the complex. The mRNA is then subjected to reverse transcription; resulting cDNA is amplified by PCR and the resulting PCR products are used for plasmid construction for recombinant antibody fragments. Prokaryotic and eukaryotic displays have been described in the literature [80].

mRNA display. The mRNA display method (also known as “*in vitro* virus” or “RNA–peptide fusion”) is also used for preparation of recombinant antibodies [89, 100]. The strategy of this method is based on the linkage of *in vitro* synthesized polypeptide chain with its mRNA template by means of the puromycin linker, which ligates two of these molecules. Thus, corresponding mRNA can be selected by immunochemical properties of the synthesized protein product (Fig. 5). Subsequent steps are basically the same as described in the “Ribosome Display” section.

Thus, one can see that there are many methods for selection and preparation of antibody variants of the highest affinity using gene libraries. The phage display method is now most widely used. However, later approaches employing *in vitro* systems of protein translation, which do not require transformation (mRNA and ribosome display), can be used for screening of larger libraries than in the case of phage display [75, 101, 102].

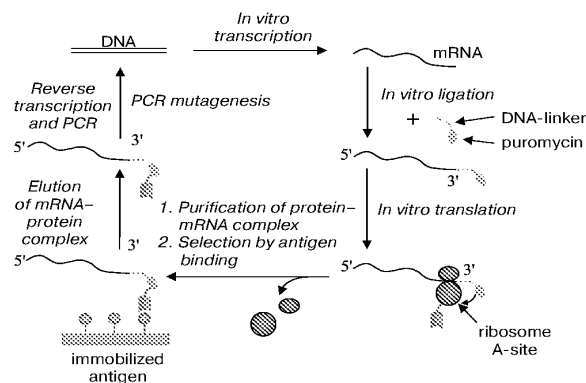


Fig. 5. Method of mRNA display. A library of antibody genes (e.g. scFv fragments) is transcribed *in vitro*. Using transcribed mRNA ligation with puromycin, it is possible to create mRNA–synthesized protein complexes using a DNA-linker. Terminating *in vitro* translation the ribosome stops at the site of DNA–RNA linkage, puromycin binds to the ribosomal A-site, and then the synthesized polypeptide chain is translocated to puromycin. The resulting covalent mRNA–protein complex can be used for affinity selection similar to the phage display selection and then (after elution) for reverse transcription and cDNA amplification by PCR. Diversity of sequence variants can be achieved in cDNA by mutagenesis (adapted from [102]).

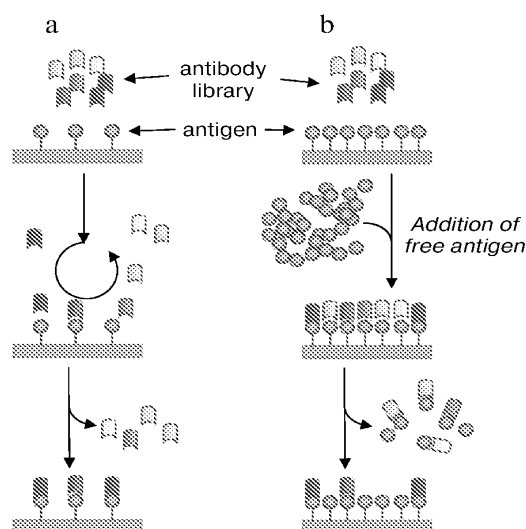


Fig. 6. Two strategies for selection of antibodies with the highest affinity (see explanations in text). a) Equilibrium selection. Antibodies are incubated with a limited amount of an antigen. After reaching equilibrium, antibodies of higher affinity remain preferentially bound to the antigen. b) Selection by kinetic parameters. Antibodies are incubated with sufficient amount of the immobilized antigen and then the free antigen is added. Only antibodies possessing the lowest dissociation rate (and therefore higher affinity) remain bound to the antigen.

One limitation of display methods is the irregular expression of various forms of antibodies. Sometimes even the presence of a single amino acid substitution blocks expression of the mutant form of the antibody [103]. In addition, in the case of libraries containing a large number of variants (e.g. 10^{10} – 10^{13}) there are problems associated with impossibility of analyzing each variant. This should be taken into consideration during creation and use of such libraries.

Methodological approaches for selection of antibody variants of highest affinity using antigens. Preparation of high affinity antibodies requires discrimination between high and low affinity variants. This can be achieved using methods of selection based on kinetic or thermodynamic parameters of antibodies (Fig. 6) [102, 104]. For selection by thermodynamic parameters (under equilibrium state) a library of antibodies is incubated with an antigen used at lower concentrations than a designed K_D value for the antigen–antibody complex. After reaching equilibrium in this system antibodies of higher affinity remain preferentially bound to the antigen, whereas antibodies of lower affinity are unbound. Subsequent sorting of the resulting immune complexes yields antibodies of the highest affinity. However, this method requires prolonged incubation

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1593

(up to one week!) to achieve equilibrium, and so only small amounts of antibodies with improved properties can be found. Selection by kinetic parameters [94, 105, 106] ("off-rate selection") consists of incubation of an antibody library with a small amount of labeled (or adsorbed) antigen whose concentration is close to the K_D value of the analyzed antigen-antibody complex. During the next step this mixture is incubated with excess of the free antigen, and duration of incubation increases at each subsequent step of selection. Addition of free antigen excess makes dissociation of the tested antibodies from labeled (or adsorbed) antigen almost irreversible. Weakly bound antibody molecules characterized by the highest rate of dissociation form a complex with the free antigen and then are removed during sorting, and the antibody molecules characterized by the lowest dissociation rate remain bound to the (labeled or adsorbed) antigen and are then selected for subsequent manipulations.

Expression of recombinant antibodies. Depending on experimental design, recombinant antibodies and their fragments can be expressed in various systems: bacterial (*E. coli*), yeast (*Pichia pastoris*), baculovirus (sf9 cell line), and in mammalian cells (e.g. CHO and HEK293 cell lines) [107]. The bacterial and yeast expression systems are used for expression of small nonglycosylated antibody fragments (V_L , V_H , scFv, dsFv) and also Fab-fragments. In the case of full-length glycosylated antibodies, mammalian cells and baculovirus expression systems are used most frequently. High yield of recombinant fragments (20-1000 mg/liter culture medium) is often achieved using bacterial and yeast expression systems. However, expression may be accompanied by appearance of various problems complicating preparation of functional antibody fragments: 1) formation of incorrect disulfide bonds followed by accumulation of functionally inactive target protein and oligomers of synthesized fragments; 2) loss of functional activity caused by mutations; 3) proteolysis of the synthesized protein by intracellular peptidases. Although in the case of eukaryotic and baculovirus systems the yield of the target product is somewhat lower (1-10 and 10-100 mg/liter, respectively), almost all the synthesized target protein is functionally active.

Thus, using the above-considered methods it is possible to prepare recombinant antibodies or their fragments suitable for all scientific and applied tasks.

Practical Use of Recombinant Antibodies

Advantages of recombinant antibodies and their fragments over monoclonal antibodies significantly extend field of their application, first of all due to the possibility of their use as therapeutic agents for treatment of various diseases.

As mentioned above, the possibility of modification of amino acid sequences and introduction of various

changes needed for particular tasks are important advantages of antibodies obtained using gene engineering technologies. Using gene engineering methods it is possible to overcome such unwanted features of monoclonal antibodies complicating their use in clinical practice as increased immunogenicity. To decrease immunogenicity of monoclonal antibodies sites inducing immune response (these are usually constant domains) are replaced by corresponding sequences of human antibodies. Such antibodies are known as "chimeric", and they preserve antigen specificity due to their unique variable domains. Subsequent decrease in immunogenicity is achieved by preparing *humanized* (almost totally replaced) antibodies, which contain only sites of mouse antibody variable domains directly involved in the interaction with the antigen, and the remaining parts of the mouse antibody are substituted by sequences of human immunoglobulins [14].

Thus, the antibody modifications described above have significantly extended their applicability in clinical practice. Therapeutic use of antibodies includes treatment of cancer, autoimmune, respiratory, cardiovascular, infectious, and many other diseases. Therapeutic antibodies are also used to decrease probability of transplant rejection. Use of recombinant antibody fragments is now successfully developed [108, 109]. Certain difficulty complicating the use of therapeutic antibodies is changeability of molecular targets, such as viral and bacterial proteins, and also the possibility of immune reaction, which can develop in a patient even in response to almost totally humanized antibodies.

Improvement of recombinant antibodies for scientific tasks can be achieved by changing affinity and specificity of antibodies; it is possible to insert additional amino acid residues into an antibody sequence for subsequent conjugation with other molecules (including labels) and also add short amino acid fragments (tags) to the antibody sequence, which significantly simplify antibody purification [80, 110]. In addition, gene engineering technologies create antibodies to antigens that are not immunogenic or are toxic for animals and therefore difficult to produce using the hybridoma technology.

One of the most promising directions in the development of technology of recombinant antibody preparation is the preparation of antibodies of higher affinity than in initial natural antibodies. In the next chapter we consider in detail modern methods developed for artificially increasing antibody affinity.

INCREASING ANTIBODY AFFINITY

Increase in antibody affinity is a natural process associated with maturation of antibodies in vertebrate organisms. Studies of mechanisms of this process revealed the main principles applicable for artificial changes in

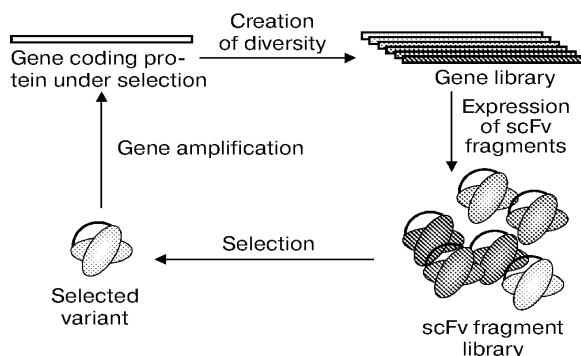


Fig. 7. Scheme illustrating increasing antibody affinity by the method of “*in vitro* evolution” using the example of creation of the scFv fragment (adapted from [101]).

antibody sequences required for preparation of variants of higher affinity.

Natural approaches for increasing antibody affinity (recombination of gene segments and somatic hypermutation) have some limitations. Recombination of gene segments is limited by a set of existing gene segments used for construction of the particular antibody gene, somatic hypermutation mainly involves hotspots of mutagenesis, and single nucleotide substitutions dominate in this process. Thus, parts of antibody sequences remain basically unchanged, and some types of mutations that need more than one nucleotide substitution in the codon become significantly less probable [33]. Artificial mutagenesis increases the number of antibody variants compared with natural variants, for example, by substituting those amino acid residues that are rarely mutated *in vivo* [111]. Using artificial mutagenesis it is possible to perform rare (under natural conditions) amino acid substitutions determined by changes of more than one nucleotide in the codon. Using an effective method of selection, it is possible to obtain recombinant antibodies with affinity exceeding the “affinity ceiling” values for natural antibodies and dissociation constant values reaching 10^{-10} M and below.

Although many different software products exist for computer-aided modeling of antibody–antigen interaction, it is very difficult (basically impossible) to predict what mutation or several mutations will result in an increase in antibody affinity. Thus, it is often necessary to obtain and test many various mutants. This can be carried out using the method of “*in vitro* evolution” [7, 101, 102], which is also based (as natural increase in affinity) on the principle of creation of diversity followed by subsequent selection of antibody variants of the highest affinity. According to this principle, antibodies of the highest affinity are selected and their genes are amplified, and then they are subjected to mutagenesis and selection and

this whole cycle repeats (Fig. 7). Thus, for increase in antibody affinity its phenotype should be physically imposed to the genotype. Mutant antibody forms of the highest affinity are selected using the same display methods as in the case of preparation of recombinant antibodies *de novo*.

Systems for increasing antibody affinity are subdivided into “all *in vitro*” approaches, which are based on all steps of “molecular evolution” *in vitro* (creation of genetic diversity, expression of all possible variants, selection of the best variants), and “partially *in vitro*” approaches in which some of the above-mentioned steps occurs inside cells and some *in vitro* [101, 102]. The “all *in vitro*” approaches include ribosome display [80, 88] and mRNA-display [89, 100]. The “partially *in vitro*” approaches include phage [87] and cell [90–95] displays, which require the step of transformation of antibody gene library (inserted into a plasmid or a phage replicon) in bacterial, yeast, or mammalian cells for expression. In the case of the cell display the expressed antibodies are transported to the cell surface, and in the case of the phage display bacterial cells are used for production of bacteriophage particles [103].

During the last 20 years many different methods have been developed to create genetic diversity *in vitro*; they can be subdivided into the methods of random and targeted mutagenesis. The first group includes various mutagenesis methods that are used in the case when clear information about amino acid residues that should be

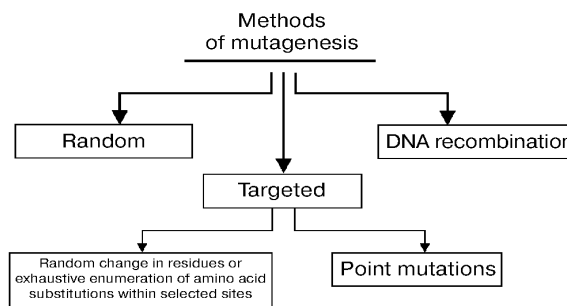


Fig. 8. Classification of mutagenesis methods used to increase antibody affinity. All mutagenesis methods can be subdivided into three groups: site-directed mutagenesis, random mutagenesis, and recombination. Random mutagenesis consists of random change of any amino acid residues in the antibody sequence. The characteristic feature of site-directed mutagenesis is that it is limited to a number of amino acid positions. Site-directed randomization generates random substitutions within selected amino acid positions. The other variant of targeted mutagenesis is exhaustive enumeration of amino acid substitutions within selected sites. Point mutagenesis is used for insertion of substitutions of selected amino acids. Using DNA recombination, it is possible to increase diversity of libraries obtained by means of site-directed and random mutagenesis and also to pool several “useful” mutations within the same amino acid sequence.

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1595

substituted is absent, and also the methods of DNA recombination. The second group includes site-directed mutagenesis and also methods that can predict antigen structure and its complex with the antibody; these are computational methods of protein structure analysis (*in silico*) and crystallography analysis (Fig. 8).

Methods of Random Mutagenesis

The major advantage of random mutagenesis is the following: this method does not need any information about antibody structure and interacting amino acid residues. The main disadvantage is the appearance of a significant proportion of functionally inactive mutant forms; this results in creation of large libraries and complicates selection of functionally active mutants. Experimental libraries obtained by random mutagenesis do not represent all possible variants of amino acid substitutions because most of them require changes in more than one nucleotide in a codon; for example, substitution of 10 of 18 amino acids lacking negative charge for negatively charged amino acid requires substitution of two nucleotides in a codon [112].

Diversity of variants of nucleotide sequences of antibodies obtained by random mutagenesis can be additionally extended by the combination of several sequence variants obtained using *in vitro* DNA recombination (DNA-shuffling) (see below) [99, 113–115].

Modification of antibody amino acid sequence to increase affinity may also result in such unwanted side effects as change in antibody specificity (cross-reactivity), stability, effectiveness of expression and folding, toxicity to producing cells, and tendency to oligomerization. In the case of therapeutic antibodies an additional side effect may also include reduced half-lifetime, increase in immunogenicity, altered tissue distribution of antibodies, and tendency to amyloid structure formation. All these facts can be a consequence not only of “favorable” mutations specially introduced by a researcher, but also of unwanted mutations occurring due to errors of PCR reaction or induced by primers. Thus it is necessary to test selected antibodies with increased affinity for maintenance of their other important biochemical properties [116, 117].

Random mutagenesis. Random mutagenesis is a random change of any amino acid residues over the whole antibody sequence. Its major advantage is the possibility of its use when primary data on the structure of the complex of interacting molecules is absent. However, success of this approach requires mutagenesis frequency control, because most amino acid substitutions are not favorable, and at a high rate of mutagenesis they may result in appearance of a large number of functionally inactive antibody variants. Introduction of two mutations per 1000 base pairs is considered as optimal for the increase in scFv

affinity; in this case the highest number of point (33%) and double (22%) mutations per gene and the minimal number of genes (22%) lacking mutations were observed [118].

Several approaches are used to perform random mutagenesis. One of them known as the error-prone PCR consists of introduction of amino acid substitutions caused by inaccurate functioning of DNA-polymerases under nonstandard conditions of PCR [92, 119, 120]. An important advantage of this approach is the possibility of mutagenesis frequency control and limitation of a mutation region by the size of the amplified fragment. Changes in several parameters of PCR can increase the number of incorrectly inserted nucleotides. These include a certain concentration of bivalent cation and deoxyribonucleotide triphosphate ratio in the reaction mixture and also the number of PCR cycles. The increase in Mn^{2+} and Mg^{2+} in the reaction mixture for PCR increases the number of mutations during amplification. Addition of 0.5 mM Mn^{2+} (final concentration) causes a 5-fold increase in the number of mutations without any influence on PCR effectiveness, whereas addition of Mg^{2+} not only increases the number of errors but also decreases effectiveness of amplification during PCR. The ratio of deoxyribonucleotide triphosphates in the reaction mixture is the other factor increasing the number of incorrectly inserted nucleotides. Increased content of one of them and inclusion of nucleotide analogs (e.g. 8-oxo-dGTP and dPTP) can also result in a number of incorrectly inserted nucleotides [121]. Probability of appearance of wrong nucleotides at a low mutagenesis rate is also proportional to the number of PCR cycles [99, 118]. The other approach used for appearance of random mutations is the use of so-called “mutator strains” of *E. coli* cells providing accumulation of mutations due to switched off mechanisms of correction of synthesized DNA [122, 123]. The mutD5 strain is one such strain; it has a deficient DNA polymerase III ϵ -subunit, which normally possesses 3'-5'-exonuclease and removes incorrectly inserted nucleotides. The rate of mutagenesis in the bacterial “mutator strains” depends on conditions of bacterial growth: in an ordinary medium containing minimum nutrients the mutagenesis rate is about 50-times higher than in the wild type strain, and in enriched media this rate may be increased by 10^3 – 10^5 times. Among appearing mutations transitions dominate, but transversions and frame shifts are also possible. The rate of mutagenesis of certain nucleotides strongly depends on the nucleotide environment. Mutagenesis of antibody sequences shares similarity with somatic hypermutation. First, mutagenesis frequency is similar to that seen in somatic hypermutation (3–5 mutations per 10^4 base pairs); the ratio of various mutation types is similar to the ratio observed in somatic hypermutation; third, mutations are irregularly distributed over the sequence, and many mutations are located near certain consensus sequences (“hotspots”)

such as the AGY-motif [122]. The advantage of this approach over PCR-based approaches is the possibility of more convenient control of the mutagenesis rate and also lack of necessity of many gene engineering manipulations. Disadvantages of this method include the need for several rounds of mutagenesis and also constant control of antibody expression, because appearance of mutations may occur at any site of the vector sequence and stop antibody expression [124].

Increasing antibody affinity by the recombination method. Recombination of DNA sites carrying antibody genes is often used to increase the number of variants obtained by random mutagenesis and for preparation of combinations of several mutations. Depending on types of combining sites, there are recombination of heavy and light chain variable domains (chain shuffling), CDR loops (CDR shuffling), and also combinations of random homologous fragments of sequences of several mutant antibody variants (DNA shuffling) [125].

There are several methods for antibody recombination. One is based on fragmentation and partial degradation of a pool of DNA molecules coding amino acid sequences of several antibody variants by DNase I endonuclease followed by subsequent PCR to obtain hybrid DNA molecules ("sexual PCR", DNA shuffling). This procedure consists of three steps. The first step includes preparation of a set of random fragments of two or more parent sequences, which are then subjected to PCR in the absence of primers. During this stage recombination occurs due to annealing of partially complementary fragments acting as primers. The final step consists of PCR using primers limiting the initial gene to obtain a reasonable number of full-length molecules from the pool of DNA fragments [111, 114, 126]. Another method is overlap extension PCR [127], which can be used for shuffling of both various combinations of light and heavy chains and various CDR sites [125]. The other PCR-based approach consists of so-called "StEP" amplification (staged extension process): in this case complementary DNA synthesis (elongation) is periodically interrupted by denaturation of double-stranded DNA followed by formation of DNA duplexes (annealing) between an under-synthesized DNA fragment and a new template molecule, and then chain elongation continues. This results in formation of DNA strands composed of sites complementary to various DNA templates [128]. There is a method used for recombination that includes treatment of a pool of DNA molecules carrying antibody genes with the same set of restriction endonucleases followed by subsequent ligation of the resulting DNA fragments. In this case the order of DNA fragments in the resulting molecular genetic constructs is preserved due to unique features of the restriction sites, but newly formed constructs represent a product of pooled fragments formed from several DNA molecules. It should be noted that DNA recombination can also be used for combining several mutant

variants obtained by the methods of targeted mutagenesis (see below).

Although the random approaches for creation of genetic diversity are still used, now the technology for increasing affinity is intensively developed towards creation of genetic diversity by means of targeted mutagenesis methods.

Targeted Mutagenesis

Approaches for selection of potential targets for mutagenesis. Application of point mutagenesis requires information about amino acid residues that need to be mutated. Several approaches are used for selection of mutagenesis sites. For example, this may be information about a position of mutagenesis hotspots in the antibody sequence. Data on three-dimensional structure of the antibody-antigen complex is especially valuable for selection of sites for targeted mutagenesis.

Data on three-dimensional structure of antibodies and their complexes with antigens can be obtained using experimental approaches (X-ray analysis or nuclear magnetic resonance) or by means of *in silico* modeling (if X-ray data are not available) [129]. Analysis of three-dimensional structure has some advantages compared with antibody sequence analysis because it can predict which amino acid modification would increase antibody affinity (taking into consideration contribution of individual amino acids into maintenance of stability of the antibody structure and interaction with antigen). Use of antibody sequence analysis and analysis of three-dimensional structures and antibody-antigen complexes followed by subsequent targeted mutagenesis (rational design) has some advantages compared with random mutagenesis. First, this approach significantly reduces the number of amino acid residues subjected to mutagenesis to several amino acid positions and simultaneously increases probability of detection of favorable mutations. In addition, the process of targeted mutagenesis can be subdivided into several parallel testings of small libraries. A small size of these libraries (compared with the size of libraries obtained during random mutagenesis) significantly reduces the number of tested antibody variants and significantly decreases risk of false negative result, i.e. risk of missing of an improved variants due to insignificant completeness of the library or due to impossibility of effective screening of all existing variants by the display technology [130].

There are two factors limiting the rational design methods. The first factor is impossibility of absolutely accurate prediction of the effects of even single amino acid substitutions on mutant affinity by means of currently existing calculation algorithms. However, in some cases accuracy of predictions of consequences of possible rearrangements by the method of *in silico* modeling is rea-

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1597

sonably high, and good examples of design of higher affinity antibodies based on prediction of changes in existing antibodies have already been reported [131, 132].

The second limiting factor is the necessity for validation of an astronomically high number of possible mutations [133]. For consideration of all possible amino acids at each position (saturating mutagenesis) of the sequence of LC and HC variable domains (about 230 residues) testing of 10^{300} antibody variants is needed, and this is technically impossible.

In silico approaches. Although results obtained using experimental approaches are more reliable, harder work is needed compared with *in silico* analysis. Pilot simplification by simulating mutation consequences predicted by *in silico* analysis may significantly facilitate subsequent experimental manipulations. It should be noted that computer-aided approaches cannot fully substitute for experimental work, but they can significantly decrease the number of variants for direct experimental search for favorable mutations [134]. Thus, the major task of *in silico* analysis in terms of increasing antibody affinity is the study of the effects of amino acid substitution on the antibody structure and stability of the immune complexes for detection of substitutions that are suitable for increasing affinity during antibody–antigen interaction.

Sequence prediction of unfavorable mutations. In the absence of information about three-dimensional structure of the antibody of interest and its amino acid residues involved in interaction with a particular antigen, it is possible to reduce significantly the number of residues that have to be mutated to increase antibody affinity: *in silico* analysis of antibody sequence can exclude high probability mutations of residues that will impair antibody structure. These include FR residues, conservative CDR residues, and also residues with side chains located inside domains. Computer modeling methods employ various approaches for prediction of mutation effects in the antibody sequence; they can use various input data for subsequent analysis from amino acid sequence to atomic coordinates in a three-dimensional structure. They can combine available information to increase prediction accuracy (methods used in programs SNPs3d [135], SIFT [136], PolyPhen [137–140], and SNAP [141]). Some programs can evaluate the energetic effect of amino acid substitution on stability of antibodies and their complexes with antigens (programs FOLD-X [142], CHARMM [143–145], SNPEffect [146], LS-SNP [147], I-Mutant2.0 [148], and PoPMuSiC [149]). Thus use of *in silico* approaches for antibodies with unknown spatial structure significantly decreases the size of screening libraries due to exclusion of potentially unfavorable mutations from the list of generated mutations.

Identification of hotspots for mutagenesis. The method of hotspot mutagenesis is also used to increase antibody affinity. It is based on the *in vitro* use of the same principle that is used for natural increase in antibody affinity

during somatic hypermutation. As in the case of the search for unfavorable mutations, the search for hotspots for mutagenesis involves antibody sequence analysis.

The localization of amino acid residues corresponding to hotspots for mutagenesis (i.e. nucleotide sequences that are changed during somatic mutation most frequently) consists of three steps: 1) search of V gene regions corresponding to variable domains of the analyzed antibody; 2) search for consensus sequences typical for hotspot mutagenesis in the V gene sequences; 3) identification of residues corresponding to hotspots for mutagenesis in the particular antibody. For this purpose the search of V gene sequences closely related to variable domain sequences of this antibody is performed using the IGMT database [150]. In the found V gene sequences all sites corresponding to the consensus sequences RGWY (A/G G C/T A/T) and also AGC and AGT should then be localized [27, 28]. During mutagenesis of CDR-H3 residues one should avoid hotspots containing nucleotides added during recombination of gene segments (V(D)J recombination) in the process of antibody gene generation.

Two types of hotspots are recognized in nucleotide sequence: germline hotspots (primary) contained in primary antibodies and gene segments from which these antibodies have been obtained, and non-germline hotspots (secondary) that are absent in primary antibodies and obviously represent a result of somatic hypermutation [27, 28, 33, 151–153]. Results of mutagenesis studies using these two types of hotspots have shown that changes in primary hotspots are much more effective for increasing antibody affinity [33]. During mutagenesis it is necessary to randomize all codons involved (partially or totally) in the selected hotspots [27].

In silico modeling of three-dimensional structure of antibody–antigen complex and in silico mutagenesis. Generation of three-dimensional structure of an antibody and its complex with the antigen represents a much more difficult task compared with sequence analysis. Increasing antibody affinity by *in silico* methods is performed by predicting mutations that would increase: a) the number of antibody residues interacting with the antigen; b) strength of antibody–antigen interaction. Such changes usually result in an increase in antibody affinity due to the decrease in dissociation (k_{off}). Increase in association rate may be achieved using an approach based on changes in the surface charge of the antibody molecule due to insertion of charged residues near interacting surfaces. It is believed that appearance of such residues in the antibody structure facilitates correct orientation of the antigen molecule versus the antibody without formation of new bonds between the antibody and the antigen [154, 155].

Existence of three-dimensional structure of the antibody–antigen complex obtained at high resolution is an important precondition for increasing antibody affinity.

However, for most antibodies their crystal structures remain unknown, and therefore models of their three-dimensional structures are used. The modeling of the antigen–antibody complex consists of three steps: 1) modeling of three-dimensional structures of the antigen and antibody separately and optimization of resulting models; 2) docking of antibody and antigen models followed by formation of a virtual complex and, finally; 3) analysis of the energy of the antibody–antigen complex for all possible mutant forms with subsequent selection of mutant forms with minimum energy.

Two major approaches are used for modeling of three-dimensional structure of proteins: homology modeling and *de novo* modeling. Homology modeling uses three-dimensional structures available in the PDB (Protein Data Bank) as the template for modeling of proteins with unknown structure. The initial search yields proteins demonstrating the highest sequence similarity with the protein under study, and then the model is generated by homology with the template protein: it consists in overlapping of the sequence of the investigated protein onto the template composed on the basis of homologous structures [156, 157]. According to studies performed within CASP (Critical Assessment of Techniques for Protein Structure Prediction), modeling of protein structure by homology can be correctly performed when structures of homologous proteins share at least 30% identity [157]. In the case of proteins lacking homologs with known structure and reasonable similarity over the whole sequence, the method of protein threading (similar to the homology method) using homology of some structural elements with known tertiary structure is employed [158, 159]. There are many automated tools for homology modeling of three-dimensional structures of various proteins. These include MODELLER [160], SWISS-MODEL [161], I-TASSER [162], 3D-JIGSAW [163], ESyPred3D [164], Phyre [165], CPHmodels [166], etc. They can be rapidly and easily used for modeling of various proteins, but they do not take into consideration characteristic features of antibodies, and therefore a low probability exists that the use of these programs will result in generation of models of good quality.

The idea of the second approach is the modeling of protein folding (Rosetta [167] and TASSER [168] programs). This approach involves generation and subsequent evaluation of multiple folding variants depending of potential energy values. The completed search yields a conformation having significantly lower energy compared with all other possible conformations. To reproduce a natural mechanism of protein structure formation, researchers try to identify structural elements in the analyzed sequence that are initially folded and remain unchanged during subsequent folding. The procedure of *de novo* modeling is very sophisticated; it requires huge computer resources, and these algorithms are frequently used together with homology modeling for optimization

of resulting models (for example, for modeling of loop structures).

Antibody modeling has some specific features. The sequence of the framework regions is so conservative that the task is usually limited to modeling of six CDR loops [169]. However, generation of the model of the antibody–antigen complex by the docking method requires a very accurate paratope model, and this significantly complicates the task [129].

Detection of correspondence between amino acid residues from different antibody sequences and correct homology modeling of CDR loops requires a system for designation of amino acid positions in the sequences of variable domains. It is also important to determine principles of identification of antibody regions involved in interaction with an antigen. For these purposes the following criteria are used: profile of amino acid variability [170], topology of amino acid residues [171–173], an optimized model of three-dimensional structure of the AbM loops interacting with the antigen [174], sequences of V genes coding κ and λ LC, and also sequences of HC and T-cell receptor domains [150, 175] and the role of amino acid residues in the interaction with the antigen [176].

Thus, one can see that no universal numeration of amino acid residues has been yet developed and “universal borders” of the antigen binding sites still need to be determined. Researchers do not try to reassess CDR borders — they just identify alternative sets of amino acid residues overlapping with the CDR that can be used for solution of various tasks [169].

For generation of three-dimensional structures of CDR loops by the method of homology modeling, the structures of antibody loops related to various structural groups (canonic classes) determined by Chotia [171–173] are used as templates. For this purpose antibody loops related to the same class as the loops of the modeled antibody and coinciding with its loop sequences by maximal number of amino acid positions are selected from the structural database. The V_H CDR3 loops are rather variable, and therefore they cannot be clearly subdivided into canonic classes; nevertheless, they can also be subdivided into groups. For modeling of CDR loops that cannot be referred to certain groups, the method of *ab initio* loop modeling and the method of conformational search are used [174, 177]. Sometimes a structure of the same length that is characterized by similar distance between points of attachment to the FR is used as a template [169]. In the case of modeling of the variable domain FR, it is necessary to check homologous structures found in databases and used as templates for the presence of sites of low resolution and to replace such sites by consensus conformations of other known structures [178].

Several special programs are available for modeling of variable fragments of antibodies: WAM (Web Antibody Modeling) [179, 180], PIGS (Prediction of Immuno-

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1599

globulin Structure) [181], and RosettaAntibody [182]. These programs use combined methods of analysis for generation of antibody models and so their application is more effective than automated modeling by means of universal programs for protein modeling. The method used in programs specialized on antibody modeling is based on generation of a model using variable domain FR as a template by transplanting template loops or by modeling of loop structures *de novo*. The PIGS and WAM servers do not optimize the resulting models with high resolution and do not consider thermodynamic parameters for modeling [182], whereas the primary model generated by the RosettaAntibody program undergoes subsequent optimization initially at low and then at high resolution.

The RosettaAntibody program for antibody modeling is the most developed tool for antibody modeling. It combines various principles of modeling of CDR loops such as use of canonic classes, homologous antibody loops, available structural databases, conformational search [174, 177], and *de novo* modeling of the H3 loop in the absence of its structure in the structural database. In addition, the RosettaAntibody program performs multi-stage optimization of the resulting structure and mutual orientation of V_L and V_H domains taking into consideration mutual location of the H3 loop FR modeled *de novo* and also other loops. For antibodies sharing high similarity with the found template, the prediction accuracy of structures obtained by the RosettaAntibody program allows use of the resulting structures for generation of models of the antigen–antibody complex [129].

Modeling of mutant forms of antibodies based on three-dimensional structure of an initial antibody (*in silico* mutagenesis) is a simpler task compared with modeling of antibodies with unknown structure because amino acid substitutions in CDR loops influence only the local environment and leave the general domain structure unchanged [178].

Despite diversity of program products developed for protein modeling, researchers often face the problem when the most energetically favorable structure of a protein molecule determined *in silico* does not necessarily coincide with its original structure [129, 178]. This is associated with complexity of correct evaluation of all intramolecular interactions and also with complexity of evaluation of interaction of the molecule with the solvent [129]. In this connection the most promising approach is the generation of several most reasonable models (ten in the case of RosettaAntibody) and subsequent validation of correctness of these models by virtual docking of the antibody model molecules to the antigen. Taking into consideration the conformational mobility of antibody and antigen during modeling of a structure of their complex, it is possible to compensate some inaccuracies in the modeling of conformation of loops interacting with the antigen.

Protein–protein docking can be defined as prediction of a structure of the complex of two proteins (e.g.

antibody with antigen) provided that their structures are known. Various programs for docking use either “rigid body” approximation (proteins are considered as “rigid bodies” with fixed conformation) or they are considered as mobile structures [183]. The programs that perform “rigid” docking, include Zdock/Rdock [183], ClusPro [184], 3D-dock [185], and RosettaDock [129, 186]. These programs do not take into consideration conformational changes in the protein backbone during protein interactions, but they consider mobility of amino acid side chains. Two models exist for flexible docking that take into consideration intramolecular mobility of proteins [186]: 1) the model of selection of conformation; according to this model a free protein exists as a set of conformers with low energy and one of them can bind to another protein; 2) the model of induced fit; according to this model, interaction of two proteins influence structures of both interacting partners. In addition, there are programs that use a hybrid model; according to this model, initial selection of a conformation is then accompanied by primary complex formation followed by subsequent induced fit of interacting proteins. The programs performing flexible docking include Autodock [187], Dock [188], FlexX [189], Glide [190], Gold [191], HADDOCK [186, 192], ICM [193], and Situs [194]. The complete list of existing programs for docking is rather long and constantly changing. Autodock is considered the most popular program for docking [195]. Although there are certain achievements in *in silico* prediction, modeling of protein molecule flexibility and those changes that occur during complex formation still represents one of the major problems limiting *in silico* approaches for modeling of protein complexes [115].

Various conformations obtained by the docking method and affinity of various mutant variants are evaluated and ranged by scoring functions that discriminate antibody variants capable of complex formation from variants that cannot form complexes. The same functions should predict the most probable structure of the complex among all structures generated by a computer program [195].

Rational design based on modeling results. After analysis of an antibody sequence and/or three-dimensional structure of the antigen–antibody complex (or its model), it is important to select amino acid residues that will be mutated in direct experiments. Several criteria now exist for rational amino acid selection for subsequent targeted mutagenesis.

Amino acid residues of CDR loops and, possibly, some FR residues that may be involved into direct antigen binding or may influence antigen interaction with contacting residues should be preferentially used for targeted mutagenesis [13, 196]. Usually mutagenesis of FR residues involved in maintenance of the immunoglobulin domain can cause dramatic consequences [38], and it seems unlikely that the effect of alteration of amino acids distantly located from the antigen binding site on the

antibody affinity can be correctly predicted. During mutagenesis accompanying affinity maturation FR mutations increasing affinity due to loss of stability are not preserved [25]. Although examples of mutations that occur distantly from the binding site and increase antibody affinity are known in the literature [92], their consequences cannot be predicted *in silico*.

CDR mutations should not involve residues that can play structural functions (form parts of the domain “internal core”, internal salt bridges, hydrogen bonds, etc.). Usually these are conservative residues, and any substitution of these residues causes decrease in affinity (deleterious sequence features) [76, 143]. CDR residues susceptible to a solvent and involved in solvent interaction are considered as the best candidates for mutagenesis [25, 197]. Such mutations have minor effect on the general domain structure, but they may be involved in interactions with the antigen and the increase in affinity caused by mutations of these residues can be predicted most accurately.

Selection of hotspots (amino acid positions that are modified during somatic hypermutation most frequently) for subsequent mutagenesis increases probability of *de novo* preparation of antibodies with higher affinity because it simulates a natural process of antibody maturation. However, this approach may be less effective for the increase in affinity of recombinant antibodies obtained from monoclonal antibodies (which already passed through somatic hypermutation and demonstrate high affinity) because their hypervariable positions have been already optimized during maturation.

Decreasing the number of enumerated types of amino acids at each position is one of the approaches limiting the total number of antibody gene variants subjected to further selection. This can be achieved by exclusion of rare amino acids either found in CDR or rarely appearing during natural antibody maturation in B-cells [25, 198–200]. On the other hand, introduction of substitutions that have not been found in natural antibodies may increase affinity that has not been achieved due to limitations of somatic hypermutation. In addition, the number of amino acid variant at each position can be limited by the set of amino acids representing the main physico-chemical groups of amino acids [200]. However, frequently increase in affinity is induced by “conservative” substitutions that only slightly modify existing interactions rather than mutations dramatically influencing amino acid features at this particular position. The other possible variant of limitation of enumerated amino acids at each position is the fact that most substitutions of amino acids significantly varying in their properties often yield inactive protein. Thus, mutagenesis should be limited to substitutions for similar amino acids (see the section “Parsimonious Mutagenesis”) [17, 201]. However, this approach does not take into consideration cases when nonconservative substitutions increase affinity.

To increase the number of screened positions, one of the following approaches is used: the “sequential” approach consists in optimization of one CDR and then of another CDR using for each new step of the “*in vitro* evolution” antibodies optimized in the previous step; the parallel approach uses independent optimization of various antibody sites followed by subsequent pooling of all favorable mutations.

For the increase in affinity of monoclonal antibodies prepared *in vivo*, mutagenesis of amino acid residues located on the periphery of the antigen binding site may have advantages over mutagenesis of central residues because the main energetic hotspots located in the center of the antigen-binding site have usually already been optimized during maturation and, therefore, their substitution may only decrease binding energy. Peripheral residues are more promising for mutagenesis [13, 39, 121, 202] because their changes may involve other residues (which have not participated in antigen binding) in antigen binding with minimal risk of impairments of existing bonds. Increase in antibody affinity by peripheral residues may occur due to increase in the antigen interacting hydrophobic surface inaccessible to the solvent; approaching and the increase in complementarity of the interacting surfaces of the antigen and the antibody; the increase in electrostatic interactions and also altered mobility of antigen binding site residues [99, 121, 201, 203, 204]. Increase in affinity may occur due to increased mobility of the antibody molecule (owing to increase in complementarity of epitope and paratope surfaces) and also due to its decrease by fixing the antibody conformation demonstrating optimal antigen binding.

When designing antibody with higher affinity for potential use in a diagnostic system, it is reasonable to limit its mobility to minimize the possibility of nonspecific interactions of the resulting antibody with other structurally similar molecules. *In silico* mutagenesis, i.e. modeling of mutant antibodies followed by subsequent evaluation of antigen binding energy allows prediction of which point substitutions may result in increase in antibody affinity. This is the most rational approach that needs the use of three-dimensional structure of high resolution. Although the number of known crystal structures of antibody–antigen complexes is rather modest, it is constantly increasing. Development of methods for prediction of three-dimensional structure together with the increase in accuracy of the methods used for modeling of mutated forms will improve successful applicability of *in silico* mutagenesis [134, 142, 143, 145, 205].

Thus, after generation of the three-dimensional structure of the antibody–antigen complex and identification of amino acid residues that contribute to formation of this complex, subsequent targeted mutagenesis of these residues yields several variants of antibody mutants to be subjected to subsequent selection.

Methods of targeted mutagenesis. Targeted mutagenesis is based on the idea that increase in affinity can be

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1601

achieved by mutagenesis of only those amino acid residues that are located within the antigen binding site and can be involved in antigen interaction. Several subtypes of targeted mutagenesis have been developed depending on substitutable residues and modes of their substitutions (Fig. 8). In some ways targeted mutagenesis is similar to *in vivo* somatic hypermutation: mutagenesis covers a limited number of CDR amino acid residues or a small number of residues selected by means of *in silico* approaches [101, 102, 152, 206]. Targeted mutagenesis can include substitution of single residues for other (earlier determined) residues (point mutagenesis), randomization within selected residues, or complete enumeration of all amino acid positions within selected sites. Point mutagenesis is applicable for antibodies with known three-dimensional structure when it is already known which amino acid substitution has to be performed in order to get the desired effect.

Point mutagenesis. Point mutagenesis (also known as site-specific mutagenesis) is used for substitution of one amino acid at a certain position for another earlier determined amino acid. Amino acid substitutions are carried out by PCR using primers containing the desired mutations. Enumeration of various types of amino acids in the same position is achieved by using primers degenerate in this particular position (i.e. using the set of primers differing by just one amino acid inserted into this position by means of mutation). Such primers have identical nucleotide sequences except for the randomized nucleotide triplet corresponding to the amino acid selected for mutagenesis.

Targeted randomization and mutagenesis with complete enumeration of variants. This group contains some methodical approaches that include both random changes of selected residues (randomization) and also enumeration of all possible variants of amino acid substitutions within selected positions of residues (saturation mutagenesis).

Optimization of CDR residues. Since simultaneous optimization of all CDR residues is impossible due to limited sizes of tested libraries, three approaches are used to solve this problem: sequential modification of CDR residues ("CDR walking") [106], parallel modification of CDR residues, and randomization of some CDR loops. The first approach implies sequential optimization of amino acid residues at various CDR sites. A fragment sequence of antibody demonstrating increased affinity and obtained due to optimization of previous CDR variants serves as a starting material for residue optimization in each new cycle. The strategy of parallel optimization is an alternative for the former approach; in this case various CDR fragments undergo independent optimization, and then the best variants are pooled in a single gene. This strategy is based on experimental data demonstrating an additive effect during combination of non-interacting mutations [207], and this frequently gives positive results

[105, 208, 209]. The advantage of this strategy is the rapid preparation of the final product. However, lack of the additive effect during combination of several mutations has also been reported [106]. Sometimes saturating mutagenesis of only one or two principal CDR loops (usually V_L -CDR3 and V_H -CDR3 and sometimes V_H -CDR2) results in an increase in affinity, possibly due to major energetic contribution of these loops into the interaction with the antigen [210-212].

Look-through mutagenesis. Look-through mutagenesis has been developed for total optimization of all six CDR loops to improve antigen binding. Among 20 proteinogenic amino acids, this approach uses just nine (alanine, serine, histidine, leucine, proline, tyrosine, aspartate, glutamine, and lysine) representing the main amino acid groups classified on the basis of physicochemical properties of their side chains. For each CDR amino acid position a series of mutant forms in which a wild type residue is substituted for one of nine selected amino acids is created. Then the CDR sites coding single amino acid substitutions are linked to each other by DNA recombination followed by formation of scFv fragments containing combinations of single amino acid substitutions in various CDR. After selection of resulting clones by their antigen-binding capacity, genes of clones demonstrating improved characteristics are sequenced for identification of favorable mutations, which are then combined for detection of synergistic mutations [200].

"Parsimonious mutagenesis". Parsimonious mutagenesis is the method of preparation of antibody variants with higher affinity by means of simultaneous and total mutagenesis of CDR residues in small libraries. Decrease in the library size can be achieved by decreasing the number of degenerated coding sequences (one codon for each amino acid is selected) and limitation of the number of enumerated amino acids at each position. Although, theoretically, for each amino acid position 19 substitution variants exist, the method of parsimonious mutagenesis uses only those variants that share chemical and/or steric similarity with wild type residues. This approach is also based on the principle that only a small proportion of amino acids make the most substantial contribution to antigen binding, whereas other amino acid residues of the antigen binding site may be mutated for formation of additional contacts with the antigen [17, 201].

Using the above described methods (random mutagenesis, *in silico* and rational design methods, targeted mutagenesis) it is possible to prepare libraries of genetic variants of investigated antibodies. High affinity variants are subsequently selected by means of various display methods that have been discussed in the chapter "Preparation of Recombinant Antibodies *de novo*". It should be noted that in some cases it is nearly impossible to prepare an antibody with affinity exceeding the affinity of its natural analogs. This may be attributed to the fact

that during natural maturation of antibodies *in vivo* an optimal combination of antibody residues demonstrating the maximal affinity towards the corresponding antigen has already been chosen during antibody selection. In this case subsequent attempts to increase affinity of such antibody by using combinatorial methods will not result in a derivative with higher affinity.

CONCLUSIONS

Antibodies are widely used tools for scientific studies, diagnostics, and therapy of various diseases. In many cases practical use of recombinant antibodies and their fragments has certain advantages over full-length antibodies obtained by the hybridoma method. Changing amino acid sequence of antibodies by gene engineering approaches, it is possible to improve such antibody characteristics as specificity, affinity, stability, pharmacokinetic parameters, effector parameters, tissue penetrating capacity of antibodies, and their immunogenicity. By modifying these antibody features it is possible to develop a new generation of useful antibodies with improved properties for solution of scientific problems and problems of clinical medicine. Subsequent promise for improvement of antibody affinity includes preparation of antibodies to therapeutically relevant antigens and also creation of antibodies with ultrahigh affinity of 10^{-12} and even 10^{-15} M [92, 96, 106, 121, 210, 213]. In the future creation of antibodies with such high affinity will significantly extend field of antibody application in scientific studies, diagnostics, and also as highly specific and effective therapeutics.

The authors are grateful to Dr. A. G. Laman (Branch of Shemyakin and Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, Pushchino, Moscow Region), Professor N. B. Gusev, and Dr. A. V. Kharitonov (Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Moscow State University) for reading this review and their valuable comments.

REFERENCES

- Hagemeyer, C. E., von Zur Muhlen, C., von Elverfeldt, D., and Peter, K. (2009) *Thromb. Haemost.*, **101**, 1012-1019.
- Hudson, P. J., and Souriau, C. (2001) *Expert Opin. Biol. Ther.*, **1**, 845-855.
- Arbabi-Ghahroudi, M., Tanha, J., and MacKenzie, R. (2005) *Cancer Metastasis Rev.*, **24**, 501-519.
- Buchner, J., and Rudolph, R. (1991) *Biotechnology* (N.Y.), **9**, 157-162.
- Cowell, L. G., and Kepler, T. B. (2000) *J. Immunol.*, **164**, 1971-1976.
- Donzeau, M., and Knappik, A. (2007) *Meth. Mol. Biol.*, **378**, 14-31.
- Honegger, A. *Troubleshooting Antibody Fragments*, URL: <http://www.bioc.uzh.ch/antibody/Introduction/VirtualSeminars/AE2003/source/slide01.htm>.
- Maynard, J., and Georgiou, G. (2000) *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **2**, 339-376.
- Winter, G., Griffiths, A. D., Hawkins, R. E., and Hoogenboom, H. R. (1994) *Annu. Rev. Immunol.*, **12**, 433-455.
- Schroeder, H. W., Jr., and Cavacini, L. (2010) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **125**, S41-52.
- Volkov, V., Kayushina, R., Lapuk, V., Shtykova, E., Varlamova, E., Malfois, M., and Svergun, D. (2003) *Crystallogr. Rep.*, **48**, 98-105.
- Padlan, E. A. (1994) *Mol. Immunol.*, **31**, 169-217.
- Sundberg, E. J. (2009) *Meth. Mol. Biol.*, **524**, 23-36.
- Kashmiri, S. V., de Pascalis, R., Gonzales, N. R., and Schlom, J. (2005) *Methods*, **36**, 25-34.
- Padlan, E. A., Abergel, C., and Tipper, J. P. (1995) *FASEB J.*, **9**, 133-139.
- Duquesnoy, R. J. *Structural and Functional Definitions of Epitopes Reacting with Mouse Monoclonal Antibodies*, URL: HLAMatchmaker Website: <http://www.hlamatchmaker.net>.
- Balint, R. F., and Larrick, J. W. (1993) *Gene*, **137**, 109-118.
- Muller, Y. A., Chen, Y., Christinger, H. W., Li, B., Cunningham, B. C., Lowman, H. B., and de Vos, A. M. (1998) *Structure*, **6**, 1153-1167.
- Saul, F. A., and Alzari, P. M. (1996) *Meth. Mol. Biol.*, **66**, 11-23.
- Nakanishi, T., Hori, M., Tsumoto, K., Yokota, A., Kondo, H., and Kumagai, I. (2007) *Photon Factory Activity Report*, **25B**, 217.
- Yokota, A., Tsumoto, K., Shiroishi, M., Kondo, H., and Kumagai, I. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5410-5418.
- Chi, S. W., Maeng, C. Y., Kim, S. J., Oh, M. S., Ryu, C. J., Han, K. H., Hong, H. J., and Ryu, S. E. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9230-9235.
- Raghavan, M., and Bjorkman, P. J. (1996) *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **12**, 181-220.
- Jung, D., Giallourakis, C., Mostoslavsky, R., and Alt, F. W. (2006) *Annu. Rev. Immunol.*, **24**, 541-570.
- David, M. P., Asprey, J. J., Ibanez, J. S., Concepcion, G. P., and Padlan, E. A. (2007) *Mol. Immunol.*, **44**, 1342-1351.
- Berek, C., and Milstein, C. (1987) *Immunol. Rev.*, **96**, 23-41.
- Chowdhury, P. S. (2003) *Meth. Mol. Biol.*, **207**, 179-196.
- Ho, M., and Pastan, I. (2009) *Meth. Mol. Biol.*, **525**, 293-308.
- Tomlinson, I. M., Walter, G., Jones, P. T., Dear, P. H., Sonnhämmer, E. L., and Winter, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **256**, 813-817.
- Foote, J., and Eisen, H. N. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1254-1256.
- Batista, F. D., and Neuberger, M. S. (1998) *Immunity*, **8**, 751-759.
- Cauerhff, A., Goldbaum, F. A., and Braden, B. C. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 3539-3544.
- Ho, M., Kreitman, R. J., Onda, M., and Pastan, I. (2005) *J. Biol. Chem.*, **280**, 607-617.
- Thorpe, I. F., and Brooks, C. L., 3rd (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 8821-8826.
- Davies, D. R., and Padlan, E. A. (1992) *Curr. Biol.*, **2**, 254-256.
- Braden, B. C., and Poljak, R. J. (1995) *FASEB J.*, **9**, 9-16.
- Acierio, J. P., Braden, B. C., Klinke, S., Goldbaum, F. A., and Cauerhff, A. (2007) *J. Mol. Biol.*, **374**, 130-146.
- Jung, S., Spinelli, S., Schimmele, B., Honegger, A., Pugliese, L., Cambillau, C., and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 701-716.

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1603

39. Li, Y., Li, H., Yang, F., Smith-Gill, S. J., and Mariuzza, R. A. (2003) *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 482-488.
40. Sundberg, E. J., Urrutia, M., Braden, B. C., Isern, J., Tsuchiya, D., Fields, B. A., Malchiodi, E. L., Tormo, J., Schwarz, F. P., and Mariuzza, R. A. (2000) *Biochemistry*, **39**, 15375-15387.
41. Masuda, K., Sakamoto, K., Kojima, M., Aburatani, T., Ueda, T., and Ueda, H. (2006) *FEBS J.*, **273**, 2184-2194.
42. Wedemayer, G. J., Patten, P. A., Wang, L. H., Schultz, P. G., and Stevens, R. C. (1997) *Science*, **276**, 1665-1669.
43. Barta, A. H., and Hirshaut, Y. (1987) *Methods of Hybridoma Formation*, Humana Press.
44. Engvall, E., and Perlmann, P. (1971) *Immunochemistry*, **8**, 871-874.
45. Van Weeman, B., and Schuurs, A. (1971) *FEBS Lett.*, **15**, 232-235.
46. Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 4350-4354.
47. Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Severina, M. E., Pulkki, K., Vuopio-Pulkki, L. M., and Gusev, N. B. (1997) *Clin. Chem.*, **43**, 1379-1385.
48. Katrukha, A., Bereznikova, A., Filatov, V., and Esakova, T. (1999) *Clin. Chem. Lab. Med.*, **37**, 1091-1095.
49. Katrukha, A. G., Bereznikova, A., and Pettersson, K. (1999) *Scand. J. Clin. Lab. Invest. (Suppl.)*, **230**, 124-127.
50. Koshkina, E. V., Krasnosel'skii, M., Fedorovskii, N. M., Goriacheva, E. V., Polupan, A. A., Aref'ev, A. A., and Katrukha, A. G. (2009) *Anestezjol. Reanimatol.*, 42-46.
51. Adams, J. E., 3rd, Bodor, G. S., Davila-Roman, V. G., Delmez, J. A., Apple, F. S., Ladenson, J. H., and Jaffe, A. S. (1993) *Circulation*, **88**, 101-106.
52. Feng, Y. J., Chen, C., Fallon, J. T., Lai, T., Chen, L., Knibbs, D. R., Waters, D. D., and Wu, A. H. (1998) *Am. J. Clin. Pathol.*, **110**, 70-77.
53. Vaidya, H. C. (1994) *J. Clin. Immunoassay*, **17**, 35-39.
54. Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Filatov, V. L., Esakova, T. V., Kolosova, O. V., Pettersson, K., Lovgren, T., Bulargina, T. V., Trifonov, I. R., Gratsiansky, N. A., Pulkki, K., Voipio-Pulkki, L. M., and Gusev, N. B. (1998) *Clin. Chem.*, **44**, 2433-2440.
55. Filatov, V. L., Katrukha, A. G., Bereznikova, A. V., Esakova, T. V., Bulargina, T. V., Kolosova, O. V., Severin, E. S., and Gusev, N. B. (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **45**, 1179-1187.
56. Semenov, A. G., Postnikov, A. B., Tamm, N. N., Seferian, K. R., Karpova, N. S., Bloshchitsyna, M. N., Koshkina, E. V., Krasnoselsky, M. I., Serebryanaya, D. V., and Katrukha, A. G. (2009) *Clin. Chem.*, **55**, 489-498.
57. Krishnamurti, U., and Steffes, M. W. (2001) *Clin. Chem.*, **47**, 1157-1165.
58. Clark, P. M. (1999) *Ann. Clin. Biochem.*, **36** (Pt. 5), 541-564.
59. Ludwig, J. A., and Weinstein, J. N. (2005) *Nat. Rev. Cancer*, **5**, 845-856.
60. Arthur, J. M., Janech, M. G., Varghese, S. A., Almeida, J. S., and Powell, T. B. (2008) *Contrib. Nephrol.*, **160**, 53-64.
61. Nakamura, R. M., and Binder, W. L. (1988) *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **112**, 869-877.
62. Ekins, R. (1992) *Clin. Chem.*, **38**, 1289-1293.
63. Shivaraj, G., Prakash, B. D., Sonal, V., Shruthi, K., Vinayak, H., and Avinash, M. (2009) *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.*, **13**, 341-349.
64. Cummings, M. C., Lukehart, S. A., Marra, C., Smith, B. L., Shaffer, J., Demeo, L. R., Castro, C., and McCormack, W. M. (1996) *Sex. Transm. Dis.*, **23**, 366-369.
65. Stamm, W. E., Cole, B., Fennell, C., Bonin, P., Armstrong, A. S., Herrmann, J. E., and Holmes, K. K. (1984) *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 399-403.
66. Black, C. M. (1997) *Clin. Microbiol. Rev.*, **10**, 160-184.
67. Safford, J. W., Abbott, G. G., Craine, M. C., and MacDonald, R. G. (1991) *J. Clin. Pathol.*, **44**, 238-242.
68. Malongre, W., and Neumeister, B. (2009) *Anal. Bioanal. Chem.*, **393**, 1443-1451.
69. Cole, L. A. (2009) *Expert Rev. Mol. Diagn.*, **9**, 721-747.
70. Andrew, S. M., and Titus, J. A. (2001) *Curr. Protoc. Immunol.*, Unit 2.8, DOI: 10.1002/0471142735.im0208s21, Online Posting Date: 2001.
71. Hust, M., Jostock, T., Menzel, C., Voedisch, B., Mohr, A., Brenneis, M., Kirsch, M. I., Meier, D., and Dubel, S. (2007) *BMC Biotechnol.*, **7**, 14.
72. Nieba, L., Honegger, A., Krebber, C., and Pluckthun, A. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 435-444.
73. Whitlow, M., Bell, B. A., Feng, S. L., Filpula, D., Hardman, K. D., Hubert, S. L., Rollence, M. L., Wood, J. F., Schott, M. E., Milenic, D. E., et al. (1993) *Protein Eng.*, **6**, 989-995.
74. Jain, M., Kamal, N., and Batra, S. K. (2007) *Trends Biotechnol.*, **25**, 307-316.
75. Wark, K. L., and Hudson, P. J. (2006) *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **58**, 657-670.
76. Chowdhury, P. S., and Vasmatzis, G. (2003) *Meth. Mol. Biol.*, **207**, 237-254.
77. Conrad, U., and Scheller, J. (2005) *Comb. Chem. High Throughput Screen.*, **8**, 117-126.
78. Borrebaeck, C. A., Malmberg, A. C., Furebring, C., Michaelsson, A., Ward, S., Danielsson, L., and Ohlin, M. (1992) *Biotechnology (N.Y.)*, **10**, 697-698.
79. Telleman, P., and Junghans, R. P. (2000) *Immunology*, **100**, 245-251.
80. Lo, B. K. C. (ed.) (2004) *Antibody Engineering. Methods and Protocols*, Humana Press.
81. Benhar, I., and Pastan, I. (1994) *Protein Eng.*, **7**, 1509-1515.
82. Tachibana, H., Cheng, X. J., Watanabe, K., Takekoshi, M., Maeda, F., Aotsuka, S., Kaneda, Y., Takeuchi, T., and Ihara, S. (1999) *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **6**, 383-387.
83. Tachibana, H., Takekoshi, M., Cheng, X. J., Maeda, F., Aotsuka, S., and Ihara, S. (1999) *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, **60**, 35-40.
84. Wlad, H., Ballagi, A., Bouakaz, L., Gu, Z., and Janson, J. C. (2001) *Protein Expr. Purif.*, **22**, 325-329.
85. Saviranta, P., Haavisto, T., Rappu, P., Karp, M., and Lovgren, T. (1998) *Bioconj. Chem.*, **9**, 725-735.
86. Presta, L. G. (2005) *J. Allergy Clin. Immunol.*, **116**, 731-736.
87. Smith, G. P. (1985) *Science*, **228**, 1315-1317.
88. Hanes, J., and Pluckthun, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4937-4942.
89. Liu, R., Barrick, J., Szostak, J. W., and Roberts, R. W. (2000) *Meth. Enzymol.*, **1**, 268-293.
90. Daugherty, P. S., Chen, G., Olsen, M. J., Iverson, B. L., and Georgiou, G. (1998) *Protein Eng.*, **11**, 825-832.
91. Georgiou, G., Stathopoulos, C., Daugherty, P. S., Nayak, A. R., Iverson, B. L., and Curtiss, R., 3rd (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 29-34.
92. Boder, E. T., Midelfort, K. S., and Wittrup, K. D. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 10701-10705.
93. Boder, E. T., and Wittrup, K. D. (1998) *Biotechnol. Prog.*, **14**, 55-62.

1604

ALTSHULER et al.

94. Boder, E. T., and Wittrup, K. D. (1997) *Nat. Biotechnol.*, **15**, 553-557.
95. Siegel, R. W. (2009) *Meth. Mol. Biol.*, **504**, 351-383.
96. Vaughan, T. J., Williams, A. J., Pritchard, K., Osbourn, J. K., Pope, A. R., Earnshaw, J. C., McCafferty, J., Hodits, R. A., Wilton, J., and Johnson, K. S. (1996) *Nat. Biotechnol.*, **14**, 309-314.
97. Knappik, A., Ge, L., Honegger, A., Pack, P., Fischer, M., Wellnhöfer, G., Hoess, A., Wölle, J., Plückthun, A., and Virnekas, B. (2000) *J. Mol. Biol.*, **296**, 57-86.
98. Luginbuhl, B., Kanyo, Z., Jones, R. M., Fletterick, R. J., Prusiner, S. B., Cohen, F. E., Williamson, R. A., Burton, D. R., and Plückthun, A. (2006) *J. Mol. Biol.*, **363**, 75-97.
99. Krebber, A., Bornhauser, S., Burmester, J., Honegger, A., Willuda, J., Bosshard, H. R., and Plückthun, A. (1997) *J. Immunol. Meth.*, **201**, 35-55.
100. Tabuchi, I., Soramoto, S., Nemoto, N., and Husimi, Y. (2001) *FEBS Lett.*, **508**, 309-312.
101. Matsuura, T., and Yomo, T. (2006) *J. Biosci. Bioeng.*, **101**, 449-456.
102. Plückthun, A., Schaffitzel, C., Hanes, J., and Jeremius, L. (2000) *Adv. Protein Chem.*, **55**, 367-403.
103. Ulrich, H. D., Patten, P. A., Yang, P. L., Romesberg, F. E., and Schultz, P. G. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 11907-11911.
104. Levin, A. M., and Weiss, G. A. (2006) *Mol. Biosyst.*, **2**, 49-57.
105. Hawkins, R. E., Russell, S. J., and Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.*, **226**, 889-896.
106. Yang, W. P., Green, K., Pinz-Sweeney, S., Briones, A. T., Burton, D. R., and Barbas, C. F., 3rd (1995) *J. Mol. Biol.*, **254**, 392-403.
107. Verma, R., Boleti, E., and George, A. J. (1998) *J. Immunol. Meth.*, **216**, 165-181.
108. Dimitrov, D. S., and Marks, J. D. (2009) *Meth. Mol. Biol.*, **525**, 1-27.
109. Dubel, S. (2007) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 723-729.
110. Groner, B., Hartmann, C., and Wels, W. (2004) *Curr. Mol. Med.*, **4**, 539-547.
111. Stemmer, W. P. C. (1995) *Nat. Biotechnol.*, **13**, 549-553.
112. Lippow, S. M., Wittrup, K. D., and Tidor, B. (2007) *Nat. Biotechnol.*, **25**, 1171-1176.
113. Cramer, A., Raillard, S. A., Bermudez, E., and Stemmer, W. P. (1998) *Nature*, **391**, 288-291.
114. Stemmer, W. P. (1994) *Nature*, **370**, 389-391.
115. Chodorge, M., Fourage, L., Ravot, G., Jeremius, L., and Minter, R. (2008) *Protein Eng. Des. Sel.*, **21**, 343-351.
116. Cline, J., Braman, J. C., and Hogrefe, H. H. (1996) *Nucleic Acids Res.*, **24**, 3546-3551.
117. Hoogenboom, H. R., and Chames, P. (2000) *Immunol. Today*, **21**, 371-378.
118. Martineau, P. (2002) *Meth. Mol. Biol.*, **178**, 287-294.
119. Schlapsch, M., Gruber, H., Gresch, O., Schafer, C., Renner, C., Pfreundschuh, M., and Skerra, A. (2004) *Protein Eng. Des. Sel.*, **17**, 847-860.
120. Fujii, I. (2004) *Meth. Mol. Biol.*, **248**, 345-359.
121. Zahnd, C., Spinelli, S., Luginbuhl, B., Amstutz, P., Cambillau, C., and Plückthun, A. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 18870-18877.
122. Low, N. M., Holliger, P. H., and Winter, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **260**, 359-368.
123. Greener, A., Callahan, M., and Jerpseth, B. (1996) *Meth. Mol. Biol.*, **57**, 375-385.
124. Irving, R. A., Kortt, A. A., and Hudson, P. J. (1996) *Immunotechnology*, **2**, 127-143.
125. Lantto, J., Jirholt, P., Barrios, Y., and Ohlin, M. (2002) *Meth. Mol. Biol.*, **178**, 303-316.
126. Bikkulatova, S. M., Mingazetdinova, S. R., Chemeris, A. V., and Vakhitov, V. A. (2009) *Usp. Sovr. Biol.*, **129**, 323-335.
127. Pogulis, R. J., Vallejo, A. N., and Pease, L. R. (1996) *Meth. Mol. Biol.*, **57**, 167-176.
128. Zhao, H., Giver, L., Shao, Z., Affholter, J. A., and Arnold, F. H. (1998) *Nat. Biotechnol.*, **16**, 258-261.
129. Sivasubramanian, A., Sircar, A., Chaudhury, S., and Gray, J. J. (2009) *Proteins*, **74**, 497-514.
130. Barderas, R., Desmet, J., Timmerman, P., Meloen, R., and Casal, J. I. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 9029-9034.
131. Essen, L. O., and Skerra, A. (1994) *J. Mol. Biol.*, **238**, 226-244.
132. Schiweck, W., and Skerra, A. (1995) *Proteins*, **23**, 561-565.
133. Marvin, J. S., and Zhu, Z. (2005) *Drug Design Reviews-Online*, **2**, 419-425.
134. Teng, S., Michonova-Alexova, E., and Alexov, E. (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, **9**, 123-133.
135. Yue, P., Li, Z., and Moul, J. (2005) *J. Mol. Biol.*, **353**, 459-473.
136. Ng, P. C., and Henikoff, S. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3812-3814.
137. Ramensky, V., and Sunyaev, S. (2009) *Mol. Biol. (Moscow)*, **43**, 286-294.
138. Sunyaev, S., Ramensky, V., and Bork, P. (2000) *Trends Genet.*, **16**, 198-200.
139. Sunyaev, S., Ramensky, V., Koch, I., Lathe, W., 3rd, Kondrashov, A. S., and Bork, P. (2001) *Hum. Mol. Genet.*, **10**, 591-597.
140. Ramensky, V., Bork, P., and Sunyaev, S. (2002) *Nucleic Acids Res.*, **30**, 3894-3900.
141. Bromberg, Y., and Rost, B. (2007) *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3823-3835.
142. Schymkowitz, J. W., Rousseau, F., Martins, I. C., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., and Serrano, L. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 10147-10152.
143. Teng, S., Madej, T., Panchenko, A., and Alexov, E. (2009) *Biophys. J.*, **96**, 2178-2188.
144. Brooks, B. R., Brucoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., and Karplus, M. (1983) *J. Comput. Chem.*, **4**, 187-217.
145. Boas, F. E., and Harbury, P. B. (2008) *J. Mol. Biol.*, **380**, 415-424.
146. Reumers, J., Schymkowitz, J., Ferkinghoff-Borg, J., Stricher, F., Serrano, L., and Rousseau, F. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, D527-532.
147. Karchin, R., Diekhans, M., Kelly, L., Thomas, D. J., Pieper, U., Eswar, N., Haussler, D., and Sali, A. (2005) *Bioinformatics*, **21**, 2814-2820.
148. Capriotti, E., Fariselli, P., and Casadio, R. (2005) *Nucleic Acids Res.*, **33**, W306-310.
149. Dehouck, Y., Grosfils, A., Folch, B., Gilis, D., Bogaerts, P., and Rooman, M. (2009) *Bioinformatics*, **25**, 2537-2543.
150. Lefranc, M. P., Pommie, C., Ruiz, M., Giudicelli, V., Foulquier, E., Truong, L., Thouvenin-Contet, V., and Lefranc, G. (2003) *Dev. Comp. Immunol.*, **27**, 55-77.
151. Chowdhury, P. S. (2002) *Meth. Mol. Biol.*, **178**, 269-285.
152. Yau, K. Y., Dubuc, G., Li, S., Hiram, T., Mackenzie, C. R., Jeremius, L., Hall, J. C., and Tanha, J. (2005) *J. Immunol. Meth.*, **297**, 213-224.

GENERATION OF RECOMBINANT ANTIBODIES WITH INCREASED AFFINITY

1605

153. Chowdhury, P. S., and Pastan, I. (1999) *Nat. Biotechnol.*, **17**, 568–572.
154. Marvin, J. S., and Lowman, H. B. (2003) *Biochemistry*, **42**, 7077–7083.
155. Selzer, T., Albeck, S., and Schreiber, G. (2000) *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 537–541.
156. Chugunov, A. (2007) URL: <http://biomolecula.ru/content/189>.
157. Chugunov, A. (2008) URL: <http://biomolecula.ru/content/264>.
158. Guo, J. T., Ellrott, K., and Xu, Y. (2008) *Meth. Mol. Biol.*, **413**, 3–42.
159. Xu, J., Jiao, F., and Yu, L. (2008) *Meth. Mol. Biol.*, **413**, 91–121.
160. Eswar, N., Webb, B., Marti-Renom, M. A., Madhusudhan, M. S., Eramian, D., Shen, M. Y., Pieper, U., and Sali, A. (2007) *Curr. Protoc. Protein Sci.*, Published Online 2007 in Wiley Interscience, Unit 2.9.1–2.9.31, DOI: 10.1002/0471140864.ps0209s50.
161. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3381–3385.
162. Zhang, Y. (2008) *BMC Bioinformatics*, **9**, 40.
163. Bates, P. A., Kelley, L. A., MacCallum, R. M., and Sternberg, M. J. (2001) *Proteins*, Suppl. 5, 39–46.
164. Lambert, C., Leonard, N., de Bolle, X., and Depiereux, E. (2002) *Bioinformatics*, **18**, 1250–1256.
165. Kelley, L. A., and Sternberg, M. J. (2009) *Nat. Protoc.*, **4**, 363–371.
166. Lund, O., Frimand, K., Gorodkin, J., Bohr, H., Bohr, J., Hansen, J., and Brunak, S. (1997) *Protein Eng.*, **10**, 1241–1248.
167. Qian, B., Raman, S., Das, R., Bradley, P., McCoy, A. J., Read, R. J., and Baker, D. (2007) *Nature*, **450**, 259–264.
168. Zhang, Y., and Skolnick, J. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7594–7599.
169. Martin, A. C. R., and Allen, J. (2007) *Bioinformatics Tools for Antibody Engineering*, in *Handbook of Therapeutic Antibodies*.
170. Wu, T. T., and Kabat, E. A. (1970) *J. Exp. Med.*, **132**, 211–250.
171. Al-Lazikani, B., Lesk, A. M., and Chothia, C. (1997) *J. Mol. Biol.*, **273**, 927–948.
172. Chothia, C., and Lesk, A. M. (1987) *J. Mol. Biol.*, **196**, 901–917.
173. Chothia, C., Lesk, A. M., Tramontano, A., Levitt, M., Smith-Gill, S. J., Air, G., Sheriff, S., Padlan, E. A., Davies, D., and Tulip, W. R. (1989) *Nature*, **342**, 877–883.
174. Martin, A. C., Cheetham, J. C., and Rees, A. R. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 9268–9272.
175. Honegger, A., and Pluckthun, A. (2001) *J. Mol. Biol.*, **309**, 657–670.
176. MacCallum, R. M., Martin, A. C., and Thornton, J. M. (1996) *J. Mol. Biol.*, **262**, 732–745.
177. Bruccoleri, R. E. (2000) *Meth. Mol. Biol.*, **143**, 247–264.
178. Martin, A. C., Cheetham, J. C., and Rees, A. R. (1991) *Meth. Enzymol.*, **203**, 121–153.
179. Whitelegg, N. R., and Rees, A. R. (2000) *Protein Eng.*, **13**, 819–824.
180. Whitelegg, N., and Rees, A. R. (2004) *Meth. Mol. Biol.*, **248**, 51–91.
181. Marcatili, P., Rosi, A., and Tramontano, A. (2008) *Bioinformatics*, **24**, 1953–1954.
182. Sircar, A., Kim, E. T., and Gray, J. J. (2009) *Nucleic Acids Res.*, **37**, W474–479.
183. Wiehe, K., Peterson, M. W., Pierce, B., Mintseris, J., and Weng, Z. (2008) *Meth. Mol. Biol.*, **413**, 283–314.
184. Comeau, S. R., Gatchell, D. W., Vajda, S., and Camacho, C. J. (2004) *Bioinformatics*, **20**, 45–50.
185. Sternberg, M. J., Gabb, H. A., Jackson, R. M., and Moont, G. (2000) *Meth. Mol. Biol.*, **143**, 399–415.
186. Chaudhury, S., and Gray, J. J. (2008) *J. Mol. Biol.*, **381**, 1068–1087.
187. Goodsell, D. S., Morris, G. M., and Olson, A. J. (1996) *J. Mol. Recognit.*, **9**, 1–5.
188. Ewing, T. J., Makino, S., Skillman, A. G., and Kuntz, I. D. (2001) *J. Comput. Aided Mol. Des.*, **15**, 411–428.
189. Rarey, M., Kramer, B., Lengauer, T., and Klebe, G. (1996) *J. Mol. Biol.*, **261**, 470–489.
190. Halgren, T. A., Murphy, R. B., Friesner, R. A., Beard, H. S., Frye, L. L., Pollard, W. T., and Banks, J. L. (2004) *J. Med. Chem.*, **47**, 1750–1759.
191. Verdonk, M. L., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., and Taylor, R. D. (2003) *Proteins*, **52**, 609–623.
192. Dominguez, C., Boelens, R., and Bonvin, A. M. (2003) *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 1731–1737.
193. Totrov, M., and Abagyan, R. (1997) *Proteins*, Suppl. 1, 215–220.
194. Wriggers, W., and Birmanns, S. (2001) *J. Struct. Biol.*, **133**, 193–202.
195. Sousa, S. F., Fernandes, P. A., and Ramos, M. J. (2006) *Proteins*, **65**, 15–26.
196. Skerra, A. (2000) *J. Mol. Recognit.*, **13**, 167–187.
197. Sidhu, S. S., Li, B., Chen, Y., Fellouse, F. A., Eigenbrot, C., and Fuh, G. (2004) *J. Mol. Biol.*, **338**, 299–310.
198. Bostrom, J., Lee, C. V., Haber, L., and Fuh, G. (2009) *Meth. Mol. Biol.*, **525**, 353–376.
199. Lee, C. V., Liang, W. C., Dennis, M. S., Eigenbrot, C., Sidhu, S. S., and Fuh, G. (2004) *J. Mol. Biol.*, **340**, 1073–1093.
200. Rajpal, A., Beyaz, N., Haber, L., Cappuccilli, G., Yee, H., Bhatt, R. R., Takeuchi, T., Lerner, R. A., and Crea, R. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 8466–8471.
201. Schier, R., Balint, R. F., McCall, A., Apell, G., Larrick, J. W., and Marks, J. D. (1996) *Gene*, **169**, 147–155.
202. Brorson, K., Thompson, C., Wei, G., Krasnokutsky, M., and Stein, K. E. (1999) *J. Immunol.*, **163**, 6694–6701.
203. Jackson, T., Morris, B. A., Martin, A. C., Lewis, D. F., and Sanders, P. G. (1992) *Protein Eng.*, **5**, 343–350.
204. Clark, L. A., Boriack-Sjodin, P. A., Eldredge, J., Fitch, C., Friedman, B., Hanf, K. J., Jarpe, M., Liparoto, S. F., Li, Y., Lugovskoy, A., Miller, S., Rushe, M., Sherman, W., Simon, K., and van Vlijmen, H. (2006) *Protein Sci.*, **15**, 949–960.
205. Liu, Y., and Kuhlman, B. (2006) *Nucleic Acids Res.*, **34**, W235–238.
206. Yuan, L., Kurek, I., English, J., and Keenan, R. (2005) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69**, 373–392.
207. Wells, J. A. (1990) *Biochemistry*, **29**, 8509–8517.
208. Riechmann, L., and Weill, M. (1993) *Biochemistry*, **32**, 8848–8855.
209. Foote, J., and Winter, G. (1992) *J. Mol. Biol.*, **224**, 487–499.
210. Schier, R., McCall, A., Adams, G. P., Marshall, K. W., Merritt, H., Yim, M., Crawford, R. S., Weiner, L. M., Marks, C., and Marks, J. D. (1996) *J. Mol. Biol.*, **263**, 551–567.
211. Chen, C., Roberts, V. A., and Rittenberg, M. B. (1992) *J. Exp. Med.*, **176**, 855–866.
212. Gustchina, E., Louis, J. M., Frisch, C., Ylera, F., Lechner, A., Bewley, C. A., and Clore, G. M. (2009) *Virology*, **393**, 112–119.
213. Hanes, J., Schaffitzel, C., Knappik, A., and Pluckthun, A. (2000) *Nat. Biotechnol.*, **18**, 1287–1292.

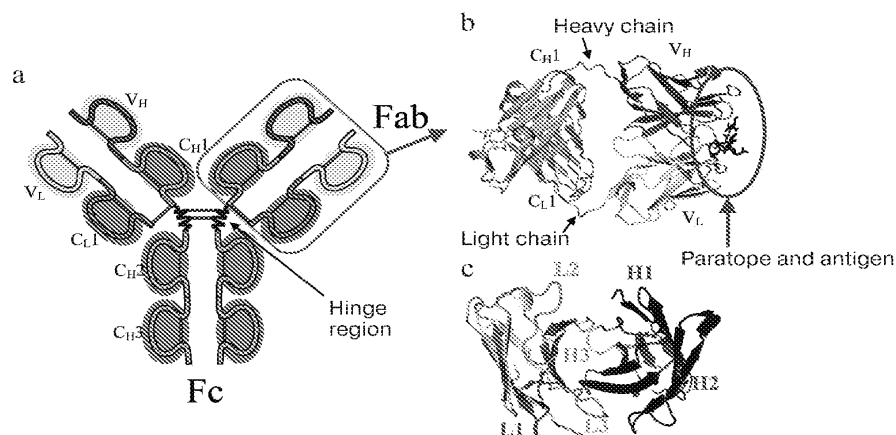


Fig. 1. (E. P. Altshuler et al.) Structure of the IgG molecule. a) General scheme. The IgG molecule consists of two light chains (LC) and two heavy chains (HC). Each LC consists of a variable domain (V_L) and a constant domain (C_{L1}), and each HC consists of one variable domain (V_H) and three constant domains (C_{H1} -3). Two fragments are recognized in the IgG structure: the antigen-binding Fab-fragment and the Fc-fragment performing effector functions. The Ig structure is stabilized by disulfide bonds (marked with red lines) connecting LC and HC and also linking HC to each other. There are disulfide bonds inside each domain. b) Interaction between an antigen and the antibody Fab-fragment (three-dimensional structure of Fab-fragment from PDB, code 1CFN). The Fab-fragment includes LC and the HC N-terminal region including V_H and C_{H1} domains. Each Fab-fragment contains the antigen binding site (paratope) located in the region of heavy and light chain variable domains. CDR loops are marked with red color. c) The antigen-binding site structure (three-dimensional structure of Fab-fragment from PDB, code 1CFN). The antigen-binding site of each Fab-fragment consists of amino acid residues of six hypervariable loops (CDR-loops) located on the surface of the LC and HC variable domains. The hypervariable loops are marked with color (L1-3 are the LC CDR loops shown in the order of their location in the amino acid sequence; H1-3 are the HC CDR loops).

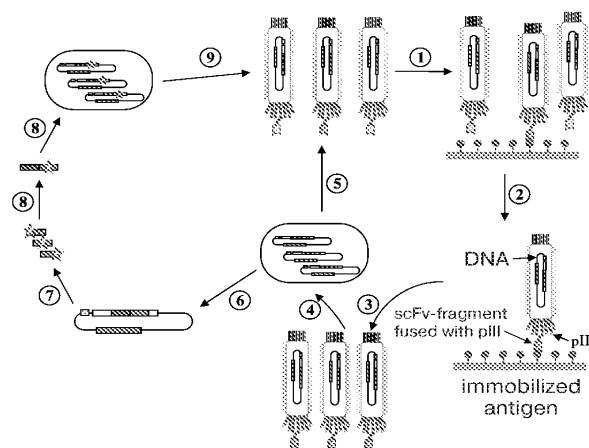


Fig. 3. (E. P. Altshuler et al.) Increasing antibody affinity using the phage display method. A library of 10^8 - 10^9 variants of antibody fragments (usually antibody scFv-fragments are used) exposed on the surface of M13 phage particles is incubated with an immobilized antigen (1). Several washing steps remove low affinity phage particles (2), and then remaining bound phage particles are eluted (3). Particles selected after the first cycle are amplified by infecting *E. coli* cells (4) for generation of a library enriched with variants of antibody fragments demonstrating high affinity interaction with the antigen. This cycle is repeated from two to four times (5) until domination of the fraction of high affinity antibodies. Affinity of selected antibodies can be further increased by isolation of their genes from phage particles (6) and creation of new variants using the mutagenesis method (7). The resulting genes are cloned into plasmids (8), which are used for transformation of *E. coli* cells (8); this yields a new library of antibody fragments exposed on the surface of phage particles (9); this library can be used for the next selection (1) and subsequent increase in affinity. The use of phage display results in selection of high affinity antibodies, and their genes can be isolated from phage particles (6) for subsequent cloning and expression (adapted from [117]).

Учебная литература
для студентов медицинских вузов

А.А. Ярилин

Основы иммунологии

Рекомендовано Управлением научных и образовательных
медицинских учреждений Министерства здравоохранения
Российской Федерации в качестве учебника для студентов
медицинских вузов



Москва
"Медицина"
1999

УДК 616-092:612.017.1(075.8)
ББК 52.5
Я73

Рецензент Р.В.Петров —
академик РАН и РАМН, вице-президент РАН

Ярилин А.А.

Я73 Основы иммунологии: Учебник. — М.: Медицина, 1999. — 608 с.: ил. (Учеб. лит. Для студ. мед. вузов). ISBN 5-225-02755-5

В учебнике отражены новейшие достижения иммунологии. Описаны структура и организация иммунной системы, факторы естественного иммунитета, молекулярные и клеточные основы адаптивного иммунитета, иммунный ответ. Большое внимание уделено патологии иммунной системы.

ББК 52.5

ISBN 5-225-02755-5

© Издательство «Медицина»
Москва, 1999

Все права автора защищены. Ни одна часть этого издания не может быть занесена в память компьютера либо воспроизведена любым способом без предварительного письменного разрешения издателя.

две Н- и две L-цепи, соединенные дисульфидными связями. Каждая цепь содержит от 2 до 5 гомологичных участков, состоящих примерно из 110 остатков аминокислот и имеющих сходную пространственную организацию. Эти участки образуют компактные, относительно изолированные пространственные структуры, скрепленные дисульфидной связью, и обладают автономными функциями. Такие структуры называют доменами (рис. 41).

Во всех цепях лишь N-концевой домен имеет отношение к распознаванию антигена. Это связано с тем, что цепи индивидуальных молекул иммуноглобулинов, как правило, отличаются первичной структурой данного домена (отсюда его название — переменный, или V-домен). Такая структура является основой для формирования антигенсвязывающих участков с индивидуальной, сильно варьирующей от молекулы к молекуле специфичностью. Эти участки образуются в результате комбинирования V-доменов Н- и L-цепей. Структура остальных доменов постоянна в молекулах конкретных типов, поэтому они называются константными, или С-доменами. В L-цепях содержится один С-домен, в Н-цепях — 3—4 С-домена. С С-доменами связаны некоторые функции иммуноглобулинов, не имеющих отношения к распознаванию антигенов: взаимодействие с рецепторами клеток, активация комплемента и др.

При действии на молекулы иммуноглобулинов папаина молекулы расщепляются с образованием двух фрагментов — Fab (antigen-binding) и одного Fc (crystallizable). Первый фрагмент содержит всю легкую цепь, V-домен и первый С-домен Н-цепи; Fc-фрагмент включает остальные С-домены Н-цепей. При воздействии пепсина разрыв Н-цепей происходит ближе к С-концу. Образующиеся антигенсвязывающие фрагменты несколько больше по размерам, чем Fab-фрагменты, и соединены дисульфидной связью. Они обозначаются как F(ab')₂-фрагменты. Пепсиновый Fc'-фрагмент короче папаинового Fc-фрагмента.

Строение С-домена L-цепей обуславливает принадлежность этих цепей одному из двух изотипов — κ и λ. Строение константных участков Н-цепей определяет наличие нескольких изотипов этих молекул, которые первоначально были идентифицированы серологически (с помощью антител). Существует 5 основных изотипов Н-цепей — μ, γ, α, δ и ε. Каждая молекула может содержать цепи лишь одного изотипа. В зависимости от разновидностей Н-цепей различают 5 основных классов иммуноглобулинов: IgM, IgG, IgA, IgD и IgE (латинские буквы в обозначении классов иммуноглобулинов соответствуют греческим буквам в обозначении Н-цепей). На основе более тонких различий аминокислотной последовательности Н-цепей среди IgG выделяют подклассы (субтипы) IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4 (у мышей IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3), среди IgA — IgA1 и IgA2. Иммуноглобулины всех классов могут относиться к К- или L-типу в зависимости от присутствия в их составе κ- или λ-цепей. У человека соотношение К- и L-типов иммуноглобулинов составляет 3 : 2.

Данные о свойствах иммуноглобулинов разных классов и подклассов и их содержании в сыворотке крови представлены в табл. 38. Как уже отмечалось, домены иммуноглобулинов весьма сходны по пространственной организации. Они представляют собой компактные глобулы, обра-

Your reference: **SF-3303RU**
Our reference: **2420-552707RU**
Application No.: **2018140709**
Attorney Name: **Elena Nazina**

GORODISSKY

Page 1 of 7

TRANSLATION

Textbooks for medical students

A.A. Yarilin

FUNDAMENTALS OF IMMUNOLOGY

The textbook is recommended by the Department of Scientific and Medical Educational Institutions of the Ministry of Health of the Russian Federation for medical students

Moscow, "Meditsina", 1999

Reviewer: R.V. Petrov

Academician of the Russian Academy of Sciences and Academy of Medical Sciences, Vice-President of the Russian Academy of Sciences

Yarilin A.A.

Fundamentals of Immunology: A Textbook. - M.: Meditsina, 1999. – 608p.: ill. (Textbook for medical students). ISBN 5-225-02755-5

The book reflects the latest achievements in immunology. It describes the structure and organization of the immune system, factors of natural immunity, molecular and cellular bases of adaptive immunity, and an immune response. Large attention is paid to pathologies of the immune system.

© Publishing House "Meditsina"

Moscow, 1999

All rights reserved. No part of this publication may be entered into a computer or reproduced in any manner without the publisher's written permission.

!0028759643!

Your reference: **SF-3303RU**
 Our reference: **2420-552707RU**
 Application No.: **2018140709**
 Attorney Name: **Elena Nazina**

Comments

Page 2 of 7

pp.172-174

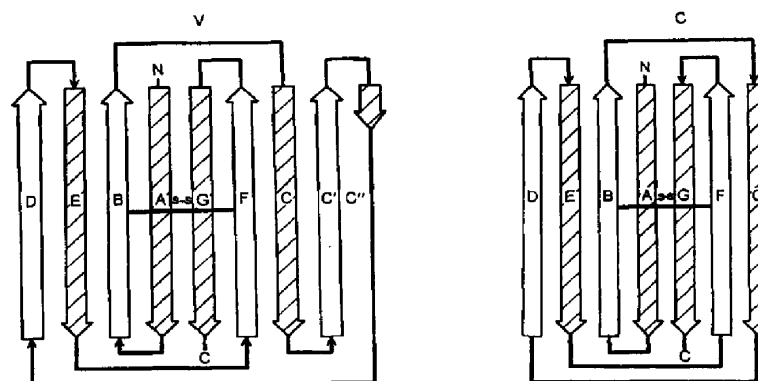


Fig.42. Structure of immunoglobulin domains.

The folding pattern of polypeptide chain β -layers in variable (V) and constant (C) domains is shown. Letters designate the arrangement order of the chain regions ("stripes") in a molecule (from the N- to C-terminus, also marked in the diagram). The open and shaded bars relate to two different β -layers placed opposite each other. S-S is an intra-domain disulfide bond. Note the two bands C' and C'' which are present in the V-domain, but are absent in the C-domain.

[...] by two β -layers which are formed by fragments of a Z-folded polypeptide chain (C-domains comprise 4 fragments on one side and 3 fragments on the other side, and V-domains comprise 4 fragments). In the center of this two-layer structure there is a disulfide bond. In the domains, the layers consisting of 4 and 3 fragments are oriented opposite each other (rotated to 180° relative to each other). The layers in the H- and L-chain domains adjacent to each other are also oriented opposite each other. C-domains in H- and L-chains are in contact through the hydrophobic surfaces of the layers formed by four fragments. The structure of the V- and C-domains is schematically shown in Fig. 42.

V-domains. Antigen-binding sites. V-domains contain 4 regions (occupying a large part of the domain) having a relatively constant structure (V-domain framework), and 3 regions with a very high variability between individual molecules (hypervariable regions). Positions of these regions slightly vary in different chains and roughly correspond to amino acid residues 28-36, 49-68, and 92-103. Since these regions are very important in the recognition and binding of the antigen, they are also called complementarity-determining regions (CDR).

V-domains of the H chain are identical for all immunoglobulin classes.

Your reference: **SF-3303RU**
 Our reference: **2420-552707RU**
 Application No.: **2018140709**
 Attorney Name: **Elena Nazina**

Comments

Page 3 of 7

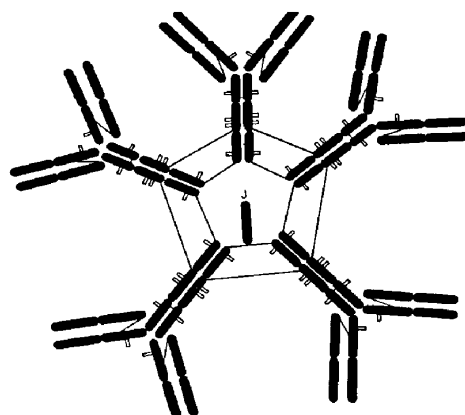


Fig. 43. IgM pentamer structure

Black ovals are domains; rectangular protrusions are carbohydrate chains; lines connecting IgM monomers are intermolecular disulfide bonds. J is a joining chain (see page 177).

Depending on the framework structure, these domains are divided into three subgroups, V-domains of κ -chains – into 3 subgroups and λ -chains – into 5 subgroups. The framework sequence of V-domains is very conservative. The homology between V-domains within one subgroup is 85-90%.

In the spatial structure of the V-domain, variable sequences are localized within the bending areas of the polypeptide chain directed opposite to C-domains, towards the corresponding regions of the V-domain of the other type chain (i.e. CDRs of H- and L-chains are directed towards each other), thus forming a hydrophilic channel corresponding to an antigen-binding site (active center) of antibodies. It is a cavity that, according to electron-microscopy data, has a length of about 6 nm and a diameter of 1.2-1.5 nm. The surface area contacting with an antigen is 7.2 nm².

The antigen-binding site is formed by spatially separated residues of the H- and L-chains (see Fig. 41). The structure of the site consists of hypervariable regions of V-domains, but not completely: the surface of the antigen-binding site occupies only about 30% of the CDR surface. The structure of the antigen-binding [...]

[...] affinity. The method is based on the use of a hapten (a low-molecular weight compound which binds to the active center of the antibody) that, while interacting with the antibody, is capable of forming a covalent bond with it and that, in addition, bears a label allowing the detection of this binding. Later, many details of the structure of the antibody active sites and their interaction with antigens were studied by using X-ray analysis. The antigen-binding capacity of V-domains of H- and,

Your reference:	SF-3303RU	Comments
Our reference:	2420-552707RU	
Application No.:	2018140709	
Attorney Name:	Elena Nazina	Page 4 of 7

especially, L-chains, taken separately, is significantly less pronounced compared to the active center formed by their combination. Since monomer immunoglobulin molecules have two pairs of H- and L-chains, they form two antigen-binding sites. This is clearly demonstrated by electron microscopy where visible ring structures are formed when an antibody binds to bifunctional molecules.

Although the structures of V-domains and binding sites are, in general, the same, variations in the amino acids involved in the formation of the antigen-binding cavity leads to a change in the fine details of its configuration. This is the basis of a huge variability of this part of immunoglobulin molecules, due to which almost every individual molecule of immunoglobulin-antibody is unique by its specificity for binding an antigen. Biological basis of the formation of this variability is discussed below.

Idiotypic and allotypic. A reflection of the structural diversity of the antigen-binding site of immunoglobulin-antibodies is their idiotypic diversity. When antibodies are considered as molecules with antigenic properties, it is natural to assume that the antigenic specificity of their variable regions will be almost unique. Antigenic sites, which are *epitopes* localized in variable regions, are called *idiotopes*, and the corresponding antigenic immunoglobulin types are called *idiotypes*. Some idiotypes are common to almost all antibodies of a certain specificity, produced by the body of genetically homogeneous animals. This is, for example, idiotype T15 inherent in anti-phosphorylcholine antibodies produced in mice C57DL/6. Specific antibodies have repeated (cross-reacting, or general, idiotypes) and so-called specific idiotypes. *Common idiotypes* are typical for antibodies to prevalent epitopes, for example, IdX which is idiotype of antibodies to dextran in mice having allele IgH^a. *Specific idiotypes* are unique markers of antibodies. The active center of antibodies to some idiotypes reproduces the spatial structure of the antigen to which the antibodies bearing this idiotype are directed; such active sites are referred to as *internal antigen image*. Anti-idiotypic antibodies play an important role in the regulation of humoral immune response (see Section 4.2.2).

Genetically determined variability of the constant domains or framework regions of V-domains becomes apparent in the variation of immunoglobulin antigenic properties, designated as an *allotype*.
[...]

Your reference:	SF-3303RU	Comments
Our reference:	2420-552707RU	
Application No.:	2018140709	
Attorney Name:	Elena Nazina	Page 5 of 7

Finkelstein A.V., Ptitsin O.B.

PROTEIN PHYSICS: Lecture course with color and stereoscopic illustrations and tasks: a training manual/ A.V. Finkelstein, O.B., Ptitsin. - 4th ed., rev. and add. - M.: KDU, 2012.- 524 p. : tab., ill. [32] p. col. ill.

ISBN 978-5-98227-834-0

Protein physics extends from the classification and principles of the protein structure (membrane, fibrillary and, in particular, water-soluble globular proteins) to the principles of their work, the structure of their active sites; from elementary interactions in and around proteins to structural transitions in proteins, polypeptides and synthetic polymers.

This lecture course was delivered to students of the Moscow Institute of Physics and Technology, and then to the Training Center of the Protein Institute of the Russian Academy of Sciences, students and graduate students of the Pushchino University and the Pushchino branch of Moscow State University. Currently, it is also being read to students of the Faculty of Biology and the Faculty of Bioengineering and Bioinformatics of Moscow State University. Separate chapters of this course were also read at many domestic and international scientific schools.

The book is intended for a wide range of students (undergraduate, graduate), post-graduate students and researchers - biologists, physicians, biochemists, biophysicists - as well as for everyone who works with proteins or just thinks about them.

UDC 577 (075.8)

BBK 28.071 ya73

© Finkelstein A.V., Ptitsin O.B., 2012

© Finkylstein A.V., stereoscopic drawings, 2005

ISBN 978-5-98227-834-0 ©Publishing house "KDU", 2012

Your reference:	SF-3303RU	Comments
Our reference:	2420-552707RU	
Application No.:	2018140709	
Attorney Name:	Elena Nazina	Page 6 of 7

p.23

[...]

However, sometimes almost the same spatial structure can provide completely different functions. Thus, one (cytochrom) of the three proteins depicted in Fig. 1-4, which are similar in their “rough” spatial structure binds an electron, the other (hemerythrin) binds oxygen (these functions are slightly similar - both are included in the oxidative reaction chain), and the third (virus envelope protein) binds much larger molecules - RNA, as well as other enveloped proteins.

As already mentioned, the structure of a protein determines its function.

Is the opposite true, that is, does the function of a protein determine its structure? Some partial correlations are also traced here, but, in general, such a decisive influence of the function can be traced only at a very rough level — a level determined by the “environment” of protein functions. Thus, proteins that have a structural function - for example, those that make up hair or fibrils - are usually fibrillar; receptors are membrane proteins, etc. But often this is completely wrong at the level of protein architecture, i.e. at the level of its internal structure. For example, two serine proteases (chymotrypsin and subtilisin) have the same catalytic function and even almost the same specificity, while having completely different (see Fig. 1-5) internal structure of the globules [these proteins are similar to each other not more than a seal is similar to a swimming beetle): only their (proteins) “fins”, i.e. their active centers, including half a dozen amino acid residues from a couple of hundred chain links, are designed in the same way, and everything else is different]. Moreover, there are differently structured active centers that perform the same work (for example, in serine proteases, on the one hand, and metalloproteases, on the other).

So, a number of examples show that the function of a protein does not determine its spatial structure. But, having said this, one must keep in mind the scale. If the molecule being treated is large, almost the entire protein can interact with it, and then almost its entire form is important for its function. If the molecule treated by the protein is small (which happens more often), then it is the small-scale details of a small portion of the protein surface that determine its function, and the rest of its body only maintains these critical details. The latter means that the main task of most of the protein chain is to build a solid foundation for the active center. In other words, the specificity of the function of a protein implies its hardness.

Your reference:	SF-3303RU	Comments
Our reference:	2420-552707RU	
Application No.:	2018140709	
Attorney Name:	Elena Nazina	Page 7 of 7

Inner sense: Emphasizing the non-trivial and piquant facts of the performance of one function with proteins of completely different architecture, and the performance of different functions with architecturally similar proteins, one should not forget....



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
BIOTECNOLÓGICA

Certificado de acuse de recibo
registro(s):
MX/2021/070565;
MX/2021/083349

Expediente de Patente PCT fase nacional Capítulo I **MX/a/2019/013597**

Asunto: Se informa 2° requisito de fondo.

Ciudad de México, a 4 de marzo de 2022.

SERGIO LUIS OLIVARES LOBATO
Apoderado de
DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED
Pedro Luis Ogazón 17
Col. San Ángel C.P. 01000,
Ciudad de México, México

No. Folio: **21966**

REF: Su solicitud No. MX/a/2019/013597 de Patente PCT presentada el 14 de mayo de 2018.

Como resultado del examen de fondo, realizado con fundamento en los artículos 53 de la Ley de la Propiedad Industrial (LPI) y 42 del Reglamento de la Ley de la Propiedad Industrial (RLPI), se le comunica lo siguiente:

El examen fue realizado en base a los siguientes documentos de la solicitud:

Descripción: Páginas 1 a 103, como originalmente fueron presentadas.

Reivindicaciones: No. 1 a 62, como fue presentada en su escrito con folio No. MX/E/2021/083349 de fecha 18 de noviembre de 2021, que da respuesta al oficio de requisitos No. 82908 de fecha 07 de septiembre de 2021.

Figuras: No. 1 a 16 (1/29-29/29), como originalmente fueron presentadas.

Listado de secuencias: SEQ ID NO: 1 a 86, como originalmente fueron presentadas.

1. Respecto de los argumentos presentados por el solicitante.

El solicitante presenta en su escrito con folio No. MX/E/2021/083349 de fecha 18 de noviembre de 2021, que da respuesta al oficio de requisitos No. 82908 de fecha 07 de septiembre de 2021, las reivindicaciones 1 a 62; así como argumentos para poner de manifiesto la claridad de la materia reclamada y documentos solicitados.

Se le informa al solicitante que han sido consideradas las modificaciones al capítulo reivindicatorio, así como los argumentos presentados. Se continúa con el examen de fondo.



MX/2022/21966

Arenal No. 550, Pueblo Santa María Tepepan, Xochimilco, C.P. 16020, CDMX

Tel: (55) 5624 0400

buzon@impi.gob.mx

www.gob.mx/impi

Creatividad para el Bienestar



2022 Flores
Ricardo
Año de
Magón
Presidencia de la República



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
 COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
 BIOTECNOLÓGICA

2. Respecto a las reivindicaciones.

Las objeciones que se exponen a continuación concernientes a las reivindicaciones, son hechas bajo el supuesto de los artículos 47 fracción III de la LPI y 29 del RLPI.

- Se le comunica al solicitante que la **reivindicación 1 no es concisa y carece de suficiencia en la descripción**, debido a que dicha reivindicación intenta reclamar una amplia gama de anticuerpos definidos porque comprenden la CDRL1, CDRL2 y CDRL3 en cualquier combinación seleccionada del grupo que consiste en las combinaciones de las secuencias de aminoácidos reivindicadas y la CDRH1, CDRH2 y CDRH3 en cualquier combinación seleccionada del grupo que consiste en las combinaciones de las secuencias de aminoácidos reivindicadas. Sin embargo, derivado de la descripción originalmente presentada **no resulta creíble que cualquier combinación de CDRL1, CDRL2, CDRL3 y CDRH1, CDRH2, CDRH3 resulten con el mismo efecto técnico**. Lo mismo aplica para la **reivindicación 5**, que intenta reclamar cualquier región variable de cadena ligera seleccionada del grupo que consiste en las siguientes regiones variables (1) a (4) y cualquier región variable de cadena pesada seleccionada del grupo que consiste en las siguientes regiones variables (5) a (9).
- Además de lo anterior, se le comunica al solicitante que la **reivindicación 5 no son concisas y carecen de suficiencia en la descripción**, donde hacen referencia a los incisos (3), (4), (8) y (9). Lo anterior, debido a que, derivado de la descripción originalmente presentada **no resulta creíble que una secuencia de aminoácidos que tiene una homología de secuencia de por lo menos 95% o más con la secuencia de una región marco diferente en cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos reivindicadas; ó una secuencia de aminoácidos que comprende una eliminación, sustitución o adición de uno o varios aminoácidos en la secuencia de una región marco diferente en cada secuencia CDR en las secuencias de aminoácidos reivindicadas RESULTE CON EL MISMO EFECTO TÉCNICO**.
- Las **reivindicaciones 53, 54 y 55 presentan problemas de claridad**, donde hacen referencia a los términos H01L02, H02L02 y H04L02, respectivamente, debido a que dichos términos son una designación interna del laboratorio, por lo cual deberá cambiarlos por el término Ab.

3. Estado de la técnica.

Al determinar el estado de la técnica de acuerdo a lo establecido en los artículos 12 fracción II y 17 de la LPI se encontró el documento:

D1. CORADA M ET AL, "Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability", BLOOD, vol. 97, no. 6, 15 de marzo de 2001, páginas 1679-1684.

DIVULGA: anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes regiones del dominio extracelular de cadherina endotelial vascular que afectan la adhesión y el agrupamiento de la proteína y modulan la permeabilidad endotelial. Tres anticuerpos monoclonales (Cad 5, BV6, BV9) pudieron aumentar la permeabilidad paracelular, inhibir la reorganización de VE-adherina y bloquear la angiogénesis *in vitro*. D1 divulga estudios de mapeo de epítomos que muestran que los anticuerpos anti-CDH se unen a un fragmento recombinante que abarca los dominios extracelulares yuxtamembrana EC3 (todo el documento).



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
 COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
 BIOTECNOLÓGICA

4. Respetto de la actividad inventiva.

Las objeciones que se exponen a continuación son concernientes a la actividad inventiva, las cuales se hacen de acuerdo a lo establecido en los artículos 12 fracción III, y 16 de la LPI.

El problema técnico planteado por el solicitante es proporcionar anticuerpos alternativos anti-CDH6.

El solicitante propone como solución al problema técnico planteado anticuerpos con las secuencias de aminoácidos reivindicadas.

Se le comunica al solicitante la reivindicación 1, y sus reivindicaciones dependientes 2-52 y 56-62 reclaman una amplia gama de anticuerpos, y derivado de la descripción originalmente presentada **no resulta creíble que cualquier anticuerpo reivindicado resulte con el mismo efecto técnico**, por lo cual, **en ausencia de resultados técnicos de laboratorio, las distintas combinaciones de CDRs y secuencia VH y VL reivindicadas solo pueden considerarse como alternativas arbitrarias que un técnico en la materia puede realizar**, particularmente tomando en consideración los conocimientos del documento D1, que divulga anticuerpos monoclonales dirigidos a diferentes regiones del dominio extracelular de cadherina endotelial vascular que afectan la adhesión y el agrupamiento de la proteína y modulan la permeabilidad endotelial. Tres anticuerpos monoclonales (Cad 5, BV6, BV9) pudieron aumentar la permeabilidad paracelular, inhibir la reorganización de VE-adherina y bloquear la angiogénesis *in vitro*. D1 divulga estudios de mapeo de epítomos que muestran que los anticuerpos anti-CDH se unen a un fragmento recombinante que abarca los dominios extracelulares yuxtamembrana EC3.

Se le comunica al solicitante que, de conformidad con la descripción originalmente presentada, los cuatro anticuerpos anti-CDH6 humanizados, de la presente solicitud, es decir: (1) el anticuerpo H01L02 que comprende una región variable de cadena ligera (VL) de SEQ ID NO: 61 y una región variable de cadena pesada (VH) de SEQ ID NO: 69, (2) el anticuerpo H02L02 que comprende una VL de SEQ ID NO: 61 y una VH de SEQ ID NO: 73, (3) el anticuerpo H02L03 que comprende una VL de SEQ ID NO: 65 y una VH de SEQ ID NO: 73 y (4) el anticuerpo H04L02 que comprende una VL de SEQ ID NO: 61 y una VH de SEQ ID NO: 77 **tienen el mismo efecto técnico de unirse específicamente al epítipo EC3**.

Por lo anterior, se le comunica al solicitante que **no es posible reconocer a la materia de las reivindicaciones 1-52 y 56-62 una actividad inventiva** de acuerdo a lo establecido en los artículos 12 fracción III, y 16 de la LPI.

Se le requiere al solicitante hacer las aclaraciones correspondientes con respecto a la actividad inventiva de su invención y realizar las modificaciones correspondientes a la materia del capítulo reivindicatorio.

Las aclaraciones o modificaciones realizadas ya sea en la descripción, en los dibujos y/o en las reivindicaciones, no deberán contener materia adicional con mayor alcance que la materia presentada originalmente en la solicitud y/o elementos que den soporte a reivindicaciones adicionales, de tal manera que se cumpla con lo establecido en el artículo 55 BIS LPI.

Asimismo, deberá efectuar el pago que establece la tarifa vigente y exhibir el comprobante correspondiente.

Para que satisfaga estos requisitos, se le concede un plazo de dos meses contados a partir del día siguiente a la fecha en que se le notifique el presente oficio, apercibido que de no cumplir este requerimiento en el plazo señalado se considerará abandonada su solicitud de Patente de conformidad con lo dispuesto por los arts. 55 y 58 de la Ley de la Propiedad Industrial.



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
 COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
 BIOTECNOLÓGICA

El presente oficio corresponde al segundo requerimiento de examen de fondo, el cual se emite, además de lo fundamentado anteriormente, conforme al artículo 13 del Acuerdo por el que se establecen Reglas y Criterios para la resolución de diversos trámites ante el Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, publicado en el Diario Oficial de la Federación el día 9 de agosto de 2004.

Por lo anterior, la presente resolución se emite con fundamento en lo dispuesto por los artículos 5º fracciones I y XIX, 9 y 10 de la Ley Federal de Protección a la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º fracción V inciso a) sub inciso ii) segundo guion, 4º y 12º fracciones I, II, III, IV y VI del Reglamento del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; artículos 1º, 3º, 5º fracción V inciso a) sub inciso ii) segundo guion, 16 fracciones I, II, III, IV y VI y 30 del Estatuto Orgánico del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; 1º, 3º, 5º fracciones VII y XV y penúltimo párrafo del Acuerdo Delegatorio de Facultades del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

El presente documento electrónico ha sido firmado mediante el uso de la firma electrónica avanzada por el servidor público competente, amparada por un certificado digital vigente a la fecha de su elaboración, y es válido de conformidad con lo dispuesto en los artículos 7 y 9 fracción I de la Ley de Firma Electrónica Avanzada y artículo 12 de su Reglamento.

El presente documento electrónico, su integridad y autoría, se podrá comprobar en www.gob.mx/impj.

Asimismo, se emitió conforme lo previsto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial.

AT E N T A M E N T E
COORDINADORA DEPARTAMENTAL DE
EXAMEN DE FONDO ÁREA BIOTECNOLÓGICA
MARÍA GABRIELA CABRERA VALLADARES
 MGCV/AAM/2022



Cadena Original
 MARIA GABRIELA CABRERA VALLADARES|00001000000506482289|SERVICIO DE
 ADMINISTRACION TRIBUTARIA|151|BIO|MX/2022/21966|MX/a/2019/013597|"2do"
 Requisito de fondo LPI PCT|1800|AAM|Pág(s) 4|7IO3xbSio8871QNmsePL4iiBSH8=

Sello Digital
 EhiC6/Q1K2JsVSwcMvp4YiQNhgcKnskQ7n2tl9PWMqzK8DMF7E6Pnpu3Uwm
 zgFtjxknAFtGOq4LT4W1pju6z16xTHzwqEOz8j9XeviRV69MgoaJQa+peooQ
 c4xCIQtCn6adB6lmZj4/zCWHSe4t+ajMt7qjdJNmG1lo/YDvrJGAn8n5HRIS
 dZ3LehpYhg3DPNqygMhmv9fs3NumZ/ne3aRwtUmvLbIiYLBwLvpp9Rufk
 LH5ulvEGC9yUIZtFEUONTzFO0e6TrLQ+sEwshovdq4Y6cTl+5EAu0SAHlax
 TrJEset1oCiF1Nh7xu6c5ZsUt1JHfcwgK2T9RB/lg==

Para verificar la autenticidad del presente documento, podrá ingresar a la página electrónica <https://validadocumento.impi.gob.mx/>, escaneando el código bidimensional QR que aparece a un costado de la e-firma del Servidor Público que signó el mismo, indicando, en su caso, el tipo de documento que pretende validar (solicitud, acuse, oficio o promoción); lo anterior, con fundamento en lo dispuesto por los artículos 1º fracción III; 2º fracción VI; 37, 38 y 39 del Acuerdo por el que se establecen lineamientos en materia de Servicios





DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
SUBDIRECCIÓN DIVISIONAL DE EXAMEN DE FONDO DE
PATENTES ÁREAS BIOTECNOLÓGICA, FARMACÉUTICA Y
QUÍMICA
COORDINACIÓN DEPARTAMENTAL DE EXAMEN DE FONDO ÁREA
BIOTECNOLÓGICA

Electrónicos del Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial; en caso de no contar con lector QR o en su defecto no pueda ser leído por su dispositivo, digitar en la página antes referida el siguiente código: cBPaAkdoSRKtS8xKXKrLc5jv1sQ=



Machine Translated by Google

**DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES**DIVISIONAL SUB-DIRECTORATE OF SUBSTANTIVE EXAMINATION OF
PATENTS BIOTECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL ANDCHEMISTRY
DEPARTMENTAL COORDINATION OF SUBSTANTIVE EXAMINATION AREA
BIOTECHNOLOGY

acknowledgment certificate

PCT National Phase Patent File Chapter I MX/a/2019/013597

record(s):

MX/2021/070565;

MX/2021/083349

Subject: 2nd background requirement is reported.

Mexico City, March 4, 2022.

SERGIO LUIS OLIVARES LOBATO

Folio No.: 21966

Representative of DAIICHI
SANKYO COMPANY, LIMITED
Pedro Luis Ogazón
17 Col. San Angel CP
01000, Mexico City, Mexico

REF: Your PCT Patent Application No. MX/a/2019/013597 filed on May 14, 2018.

As a result of the substantive examination, carried out based on articles 53 of the Industrial Property Law (LPI) and 42 of the Regulations of the Industrial Property Law (RLPI), you are informed of the following:

The examination was carried out based on the following application documents:

Description: Pages 1 to 103, as originally presented.

Claims: No. 1 to 62, as presented in its brief with folio No. MX/E/2021/083349 dated November 18, 2021, which responds to the official letter of requirements No. 82908 dated September 7, 2021 .

Figures: No. 1 to 16 (1/29-29/29), as originally presented.

Sequence listing: SEQ ID NO: 1 to 86, as originally submitted.

1. Regarding the arguments presented by the applicant.

The applicant submits in his brief with folio No. MX/E/2021/083349 dated November 18, 2021, which responds to the official letter of requirements No. 82908 dated September 7, 2021, claims 1 to 62; as well as arguments to highlight the clarity of the matter claimed and requested documents.

The applicant is informed that the modifications to the claim chapter have been considered, as well as the arguments presented. The substantive examination continues.

MX/2022/21966

MX/2022/21966

Arsenal No. 550, Puesto Santa María Tepic, Jalisco, C.P. 46000, CDMX.

Tel: (55) 5524 0400

buzon@impi.gob.mx

www.gob.mx/impi

Creatividad para el Bienestar


2022 Flores
 Año de
 Magón
 GOBIERNO DEL ESTADO DE COAHUILA

Machine Translated by Google



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
 DIVISIONAL SUB-DIRECTORATE OF SUBSTANTIVE EXAMINATION OF
 PATENTS BIOTECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL AND
 CHEMISTRY
 DEPARTMENTAL COORDINATION OF SUBSTANTIVE EXAMINATION AREA
 BIOTECHNOLOGY

2. Regarding the claims.

The objections set forth below concerning the claims are made under the assumption of articles 47 section III of the LPI and 29 of the RLPI.

- The applicant is informed that claim 1 is not concise and lacks sufficiency in the description, because said claim attempts to claim a wide range of antibodies defined because they comprise CDRL1, CDRL2 and CDRL3 in any combination selected from the group consisting in combinations of the claimed amino acid sequences and CDRH1, CDRH2 and CDRH3 in any combination selected from the group consisting of combinations of the claimed amino acid sequences. However, derived from the description originally presented, it is not credible that any combination of CDRL1, CDRL2, CDRL3 and CDRH1, CDRH2, CDRH3 will result in the same technical effect. The same applies to claim 5, which attempts to claim any light chain variable region selected from the group consisting of the following variable regions (1) to (4) and any heavy chain variable region selected from the group consisting of the following regions variables (5) to (9).
- In addition to the above, the applicant is informed that claim 5 is not concise and lacks sufficiency in the description, where they refer to subsections (3), (4), (8) and (9). The foregoing, because, derived from the originally presented description, it is not credible that an amino acid sequence that has a sequence homology of at least 95% or more with the sequence of a different framework region in each CDR sequence in the sequences of amino acids claimed; or an amino acid sequence comprising a deletion, substitution or addition of one or more amino acids in the sequence of a different framework region in each CDR sequence in the claimed amino acid sequences RESULTS IN THE SAME TECHNICAL EFFECT.
- Claims 53, 54 and 55 present clarity problems, where they refer to the terms H01L02, H02L02 and H04L02, respectively, because these terms are an internal designation of the laboratory, for which they must be changed to the term Ab.

3. State of the art.

When determining the state of the art in accordance with the provisions of articles 12 section II and 17 of the LPI, the document was found:

D1. CORADA M ET AL, "Monoclonal antibodies directed to different regions of vascular endothelial cadherin extracellular domain affect adhesion and clustering of the protein and modulate endothelial permeability", BLOOD, vol. 97, no. 6, 15 de marzo de 2001, páginas 1679-1684.

DISCLOSES: Monoclonal antibodies targeting different regions of the vascular endothelial cadherin extracellular domain that affect adhesion and protein aggregation and modulate endothelial permeability. Three monoclonal antibodies (Cad 5, BV6, BV9) were able to increase paracellular permeability, inhibit VE-cadherin rearrangement, and block angiogenesis *in vitro*. D1 discloses epitope mapping studies showing that anti-CDH antibodies bind to a recombinant fragment spanning EC3 juxtamembrane extracellular domains (full paper).



Machine Translated by Google



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
 DIVISIONAL SUB-DIRECTORATE OF SUBSTANTIVE EXAMINATION OF
 PATENTS BIOTECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL AND
 CHEMISTRY
 DEPARTMENTAL COORDINATION OF SUBSTANTIVE EXAMINATION AREA
 BIOTECHNOLOGY

4. Regarding the inventive activity.

The objections set forth below are related to the inventive activity, which are made in accordance with the provisions of articles 12, section III, and 16 of the LPI.

The technical problem raised by the applicant is to provide alternative anti-CDH6 antibodies.

The applicant proposes as a solution to the technical problem raised antibodies with the claimed amino acid sequences.

Claim 1 is communicated to the applicant, and its dependent claims 2-52 and 56-62 claim a wide range of antibodies, and derived from the description originally presented it is not credible that any claimed antibody results in the same technical effect, therefore which, in the absence of technical labor and effort, the different antibodies only be CDRs considered as arbitrary alternatives that a person skilled in the art can make, particularly taking into account the knowledge of document D1, which discloses antibodies monoclonals targeting different regions of the vascular endothelial cadherin extracellular domain that affect adhesion and protein aggregation and modulate endothelial permeability. three antibodies monoclonal (Cad 5, BV6, BV9) were able to increase paracellular permeability, inhibit VE-adherin reorganization and block angiogenesis *in vitro*. D1 discloses epitope mapping studies showing that anti-CDH antibodies bind to a recombinant fragment spanning EC3 juxtamembrane extracellular domains.

The applicant is informed that, in accordance with the description originally submitted, the four humanized anti-CDH6 antibodies of the present application, that is: (1) the H01L02 antibody comprising a light chain variable region (VL) of SEQ ID NO: 61 and a heavy chain variable region (VH) of SEQ ID NO: 69, (2) the H02L02 antibody comprising a VL of SEQ ID NO: 61 and a VH of SEQ ID NO: 73, (3) the H02L03 antibody comprising a VL of SEQ ID NO: 65 and a VH of SEQ ID NO: 73 and (4) the H04L02 antibody comprising a VL of SEQ ID NO: 61 and a VH of SEQ ID NO: 77 have the same technical effect of specifically binding to the EC3 epitope.

Due to the foregoing, the applicant is informed that it is not possible to recognize the subject matter of claims 1-52 and 56-62 as an inventive step in accordance with the provisions of articles 12, section III, and 16 of the LPI.

The applicant is required to make the corresponding clarifications regarding the inventive activity of his invention and make the corresponding modifications to the subject matter of the claiming chapter.

The clarifications or modifications made either in the description, in the drawings and/or in the claims, must not contain additional matter with a greater scope than the matter originally presented in the application and/or elements that support additional claims, in such a way that the provisions of article 55 BIS LPI are complied with.

Likewise, you must make the payment established by the current rate and show the corresponding receipt.

In order to satisfy these requirements, you are granted a period of two months from the day following the date on which you are notified of this official letter, provided that if you do not comply with this requirement within the indicated period, your Patent application will be considered abandoned. in accordance with the provisions of arts. 55 and 58 of the Industrial Property Law.

Machine Translated by Google

**DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES**

DIVISIONAL SUB-DIRECTORATE OF SUBSTANTIVE EXAMINATION OF
PATENTS BIOTECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL AND
CHEMISTRY
DEPARTMENTAL COORDINATION OF SUBSTANTIVE EXAMINATION AREA
BIOTECHNOLOGY

This official letter corresponds to the second substantive examination requirement, which is issued, in addition to what was previously substantiated, in accordance with article 13 of the Agreement establishing Rules and Criteria for the resolution of various procedures before the Mexican Institute of Property industrial, published in the Official Gazette of the Federation on August 9, 2004.

Due to the foregoing, this resolution is issued based on the provisions of articles 5, sections I and XIX, 9 and 10 of the Federal Law for the Protection of Industrial Property; Articles 1, 3, section V subsection a) subsection ii) second indent, 4th and 12th sections I, II, III, IV and VI of the Regulations of the Mexican Institute of Industrial Property; Articles 1, 3, 5, section V subsection a) subsection ii) second indent, 16 sections I, II, III, IV and VI and 30 of the Organic Statute of the Mexican Institute of Industrial Property; 1st, 3rd, 5th sections VII and XV and penultimate paragraph of the Agreement Delegating Powers of the Mexican Institute of Industrial Property.

This electronic document has been signed through the use of the advanced electronic signature by the competent public servant, protected by a digital certificate in force at the date of its preparation, and is valid in accordance with the provisions of articles 7 and 9 section I of the Advanced Electronic Signature Law and article 12 of its Regulations.

This electronic document, its integrity and authorship, can be verified at www.gob.mx/impl.

Likewise, it was issued in accordance with the provisions of articles 1, section III; 2nd section VI; 37, 38 and 39 of the Agreement establishing guidelines on Electronic Services of the Mexican Institute of Industrial Property.

CAREFULLY
DEPARTMENTAL COORDINATOR OF
IN-DEPTH EXAMINATION BIOTECHNOLOGY AREA
MARIA GABRIELA CABRERA VALLADARES

MGCV/AAM/2022

**Original string**

MARIA GABRIELA CABRERA VALLADARES|00001000000506482289|SERVICE OF
TAX ADMINISTRATION|151|BIO|MX/2022/21966|MX/a/2019/013597|"2nd"
Background requirement LPI PCT|1800|AAM|Page(s) 4|7103xbSio8871QNmsePL4iiBSH=

Digital stamp

EhIC6/Q1K2JsVSwcMvp4YIQNhgcKnskQ7n2tI9PwMqzK8DMF7E6Pnpub3Uwm
zgFtjxknAFtGOq4LT4W1pju6z16xTHzwqEOz8j9XevlRV69MgoaJQa+peooQ
c4xCIQICn6adB6ImZj4/zCWHSe4t+ajMt7qjdJNmG1lo/YDvrJGAn8n5HRIS
dZ3LehpYhg3DPNqXgMhmv9fs3NumZ/ne3aRwtUmvLbllYLxVBwLvpp9Rufk
LH5ulvEGC9yUIZtFEUONTzFO0e6TrLQ+sEwshovdq4Y6cTi+5EAu0SAHlaix
TrJEset1oCf1Nh7xu6c5ZzsU1JHfcwgK2T9RB / Ig ==

To verify the authenticity of this document, you can access the electronic page <https://validadocumento.impl.gob.mx/>, scanning the two-dimensional QR code that appears next to the e-signature of the Public Servant who signed it, indicating, where appropriate, the type of document that it intends to validate (application, acknowledgment, official letter or promotion); the foregoing, based on the provisions of articles 1, section III; 2nd section VI; 37, 38 and 39 of the Agreement establishing guidelines on Services



Machine Translated by Google



DIRECCIÓN DIVISIONAL DE PATENTES
DIVISIONAL SUB-DIRECTORATE OF SUBSTANTIVE EXAMINATION OF
PATENTS BIOTECHNOLOGY, PHARMACEUTICAL AND
CHEMISTRY
DEPARTMENTAL COORDINATION OF SUBSTANTIVE EXAMINATION AREA
BIOTECHNOLOGY

Electronics of the Mexican Institute of Industrial Property; If you do not have a QR reader or if it cannot be read by your device,
enter the following code on the aforementioned page: cBPAAkdoSRKtS8xKXKrLc5jv1sQ=



Федеральная служба по интеллектуальной
собственности

Федеральное государственное бюджетное
учреждение



«Федеральный институт
промышленной собственности»
(ФИПС)

Бережковская наб., 30, корп. 1, Москва, Г-59, ГСП-3, 125993
Телефон (8-499) 240- 60- 15. Факс (8-495) 531-63-18

Форма N 10 ИЗ-2017
100

ООО "Юридическая фирма Городисский и
Партнеры"

ул. Б. Спасская, 25, стр. 3

Москва

129090

На № 2420-560298RU от 23.12.2021

Наш № 2019141268/10(080634)

При перетиске просим ссылаться на номер заявки

Исходящая корреспонденция от **22.02.2022**

З А П Р О С
экспертизы по существу

(21) Заявка № 2019141268/10(080634)

(22) Дата подачи заявки 14.05.2018

(86) Заявка № РСТ РСТ/JP2018/018572 от 14.05.2018

(71) Заявитель(и) ДАЙИТИ САНКИО КОМПАНИ, ЛИМИТЕД, JP

(51) МПК

C12N15/13 (2006.01)

12

ДОМ 23.12.2021

105201



ВОПРОСЫ, ДОВОДЫ, ЗАМЕЧАНИЯ, ПРЕДЛОЖЕНИЯ

Экспертиза ознакомилась с ответом заявителя от 23.12.2021 и сообщает следующее.

Заявитель представил к рассмотрению скорректированную формулу изобретения, к которой у экспертизы имеются следующие замечания.

Заявитель скорректировал п.1 формулы, уточнив признак функционального фрагмента антитела.

Однако заявитель не включил в п.1 признаки аминокислотной последовательности заявленного антитела и не представил дополнительные примеры осуществления изобретения, подтверждающие возможность реализации назначения и достижения технического результата при осуществлении изобретения по п.1 во всем заявленном объеме.

Заявитель утверждает, что «в описании показано, что относительно широкий спектр конструктивных особенностей может достичь требуемый функциональный эффект», вследствие чего «пункт 1 удовлетворяет требования достаточности раскрытия» (стр.4 ответа заявителя). Мнение заявителя основано на том, что в заявке раскрыты четыре крысиных антитела и гуманизированные антитела, специфичные в отношении домена EC3 CDH6, которые имеют различия в их последовательностях CDR. Также заявитель указывает на то, что в заявке приведены сведения, на основании которых специалист «определит, будет ли антитело специфически связываться с доменом EC3 CDH6, следуя протоколу, описанному в параграфах 0237 и 0280».

-
- Информация о состоянии делопроизводства по заявке может быть получена по телефону 8 (499) 240 60 15;
 - Сведения о состоянии делопроизводства по заявкам размещаются на сайте ФИПС по адресу «www.fips.ru» в разделе «Информационные ресурсы / Открытые реестры»;
 - При изменении адреса для переписки по заявке заявитель обязан сообщить об этом незамедлительно.

*Гражданский кодекс Российской Федерации Часть четвертая от 18 декабря 2006 г. N 231-ФЗ с изменениями и дополнениями.

**Положение о патентных и иных пошлинах за совершение юридически значимых действий, связанных с патентом на изобретение, полезную модель, промышленный образец, с государственной регистрацией товарного знака и знака обслуживания, с государственной регистрацией и предоставлением исключительного права на наименование места происхождения товара, а также с государственной регистрацией отчуждения исключительного права на результат интеллектуальной деятельности или средство индивидуализации, залога исключительного права, предоставления права использования такого результата или такого средства по договору, перехода исключительного права на такой результат или такое средство без договора, утвержденное постановлением Правительства Российской Федерации от 10.12.2008 N 941 с изменениями.

***Административный регламент предоставления Федеральной службой по интеллектуальной собственности государственной услуги по государственной регистрации изобретения и выдаче патента на изобретение, его дубликата утвержден приказом Минэкономразвития России от 25.05.2016 года N 315, зарегистрирован 14.07.2016, регистрационный N 42843, с изменениями.

****Правила составления, подачи и рассмотрения документов, являющихся основанием для совершения юридически значимых действий по государственной регистрации изобретений, и их формы утверждены приказом Минэкономразвития России от 25.05.2016 N 316, зарегистрированы 11.07.2016, регистрационный N 42800.

*****Требования к документам заявки на выдачу патента на изобретение утверждены приказом Минэкономразвития России от 25.05.2016 N 316, зарегистрированы 11.07.2016, регистрационный N 42800.

Кроме того, заявитель указывает на то, что антитела, связывающие домен EC3 CDH6 с последовательностью SEQ ID NO: 4, на которые направлено изобретение, ранее не были описаны (стр.3 ответа заявителя).

Экспертиза не может согласиться с заявителем по следующим причинам.

В материалах заявки действительно раскрыты указанные заявителем антитела с различными наборами CDR. Однако возможность достижения технического результата, который в соответствии с первоначальными материалами заявки заключается в повышенной способности антитела к интернализации в клетки, экспрессирующие CDH6, позволяющей использование его в качестве антитела для ADC (параграф [0013] первоначального описания), не подтверждена для всех этих антител. Только для четырех гуманизированных вариантов антитела G019 подтверждено, как специфическое связывание с доменом EC3 CDH6, имеющим последовательность SEQ ID NO: 4, так и вышеуказанные технические эффекты (см. Пример 6-9, Фиг.10, 11, 12). Данные гуманизированные варианты антитела G019 не демонстрируют структурного разнообразия в последовательностях CDR, на которое указывает заявитель в своем ответе.

Также экспертиза обращает внимание на то, что признак связывания с SEQ ID NO: 4 не является достаточной характеристикой заявленного антитела по п.1, поскольку не обеспечивает возможность достижения указанного технического результата.

Так, SEQ ID NO: 4 представляет собой последовательность домена EC3 CDH6, и не может рассматриваться в качестве эпитопа антигена, с которым связывается антитело по изобретению. Указанная последовательность SEQ ID NO: 4 включает 115 а.о., в то время как из уровня техники известно, что во взаимодействие с антителом, как правило, вовлечено от 5 до 15 а.о. белкового антигена (D1: АЛЪТШУЛЕР Е.П. и др., Получение рекомбинантных антител и способы увеличения их аффинности, Успехи биологической химии, 2010, т.50, с.203-258, см. стр.207-208). Из представленных материалов заявки также не следует, что все аминокислотные остатки SEQ ID NO:4 принимают участие в связывании с антителом.

При этом поскольку домен EC3 CDH6 с последовательностью SEQ ID NO: 4 имеет некоторую степень идентичности и гомологии с соответствующими доменами других кадгеринов (например, на 73.9% идентичен и на 90.4% гомологичен последовательности мышинного кадгерина 9, см. базу данных UniProtKB: locus CADH9_MOUSE, accession P70407, 25.11.2002), то антитела, связывающиеся с другими членами семейства кадгеринов, могут также связываться и с SEQ ID NO: 4, но не проявлять при этом необходимой функциональной активности.

Учитывая вышесказанное, а также известность из уровня техники того, что белок обладает определенными функциями в силу его аминокислотной последовательности, а не

наоборот (СИНГЕР М., БЕРГ П., Гены и геномы: в 2-х т. Том 1. Пер. с англ. М.: Мир, 1998. – 373 с., ил.; см. стр.63-64), а аминокислотная последовательность и взаимное расположение CDR-участков каждого вариабельного домена имеют решающее значение для формирования антигенсвязывающего участка (активного центра) антитела (см., например, ЯРИЛИН А.А., Основы иммунологии: Учебник. - М.: Медицина, 1999, 608с.; стр.171 второй абзац, стр.172-173), экспертиза пришла к выводу, что именно структура вариабельных доменов антитела определяет возможность реализации заявленного в п.1 изобретения с достижением указанного заявителем технического результата.

В связи с вышесказанным, по мнению экспертизы сущность изобретения по п.1 в документах заявки раскрыта недостаточно для осуществления изобретения специалистом в данной области техники, в связи с чем изобретение по п.1 по-прежнему признается экспертизой несоответствующим положениям п.53 Правил, п.45 Требований, п.2(2) ст.1375 ГК РФ.

Заявитель вправе представить дополнительные примеры, подтверждающие возможность осуществления изобретения по п.1 с реализацией назначения и достижением технического результата во всем заявленном объеме. При этом указанные примеры должны быть представлены в виде дополнительных материалов, без включения их в скорректированное описание (п.96 Правил).

Также заявитель вправе скорректировать п.1 на основании первоначальных материалов заявки, ограничив объем испрашиваемой правовой охраны существенными признаками вышеуказанных гуманизованных вариантов антитела G019, обеспечивающими реализацию назначения с достижением указанного технического результата. Указанными признаками, по мнению экспертизы, являются аминокислотные последовательности вариабельных доменов тяжелой и легкой цепей антитела (как минимум, в объеме шести CDR-участков).

Остальные представленные в формуле изобретения основаны на получении и использовании антитела по п.1, вследствие чего указанные изобретения также не могут быть на данный момент признаны соответствующими требованиям п.53 Правил, п.45 Требований, п.2(2) ст.1375 ГК РФ.

Кроме того, в отношении изобретений по пп.29 и 49 формулы экспертиза отмечает следующее. Конъюгат по п.29 и композиция по п.49 предназначены для использования в качестве лекарственного средства. При этом в представленных материалах заявки отсутствуют сведения, подтверждающие возможность использования указанных конъюгата

и композиции в качестве лекарственного средства для лечения/предотвращения любого заболевания или расстройства (п.45, п.53(2) Требований, п.2(2) ст.1375 ГК РФ). В первоначальном описании (см. Примеры) раскрыта возможность применения конъюгата антитело-лекарственное средство, включающего антитело по изобретению, и включающей его композиции только в качестве противоопухолевых лекарственных средств.

Заявитель вправе уточнить назначение конъюгата по п.29 и композиция по п.49, основываясь на первоначальных материалах заявки.

Заявитель вправе ознакомиться с замечаниями экспертизы и высказать свое мнение.

Если заявитель **в трёхмесячный срок со дня направления запроса** не представит запрашиваемые материалы или не подаст ходатайство о продлении этого срока, заявка будет признана отозванной. Срок представления запрошенных материалов может быть продлен, но не более чем на десять месяцев (*общий срок продления не должен превышать десять месяцев*) (п. 6 ст. 1386 Кодекса*)

Продление срока ответа на запрос экспертизы осуществляется при условии уплаты соответствующей патентной пошлины в установленном порядке.

Дополнительные материалы, поданные заявителем, не должны изменять заявку на изобретение по существу (п. 2 ст. 1378 Кодекса*).

Дополнительные материалы представляются на ознакомление третьим лицам в соответствии с п. 2 ст. 1394 Кодекса* после публикации сведений о выдаче патента.

Ведущий
государственный
эксперт по
интеллектуальной
собственности отдела
биотехнологии,
сельского хозяйства и
пищевой
промышленности
ФИПС

Документ подписан электронной подписью
Сведения о сертификате ЭП
Сертификат
5F1F8A00EAADEF8F46583ABB8E686ED3
Владелец Тулинова
Ольга Анатольевна
Срок действия с 24.11.2021 по 24.11.2022

О. А. Тулинова
8(499)240-61-46

Machine Translated by Google

Federal Service for Intellectual Property
Federal State Budgetary**Form N 10 IZ-2017**
100

Institution



"Federal Institute of Industrial
Property" (FIPS) Berezhkovskaya emb., 30,
bldg. 1, Moscow, G-59,
GSP-3, 125993 Tel. (8-499) 240-60-15 Fax (8-495) 531-63-18

LLC "Law Firm Gorodissky and Partners"
st. B. Spasskaya, 25, building 3 Moscow

129090

To No. 2420-560298RU dated 12/23/2021

Our No. 2019141268/10(080634) *When
corresponding, please refer to the application
number Outgoing correspondence dated 02/22/2022*

REQUEST
substantive examination

(21) Application No. 2019141268/10(080634)

(22) Application date 05/14/2018

(86) Application No. PCT PCT/JP2018/018572 dated May 14,
2018 (71) Applicant(s) DAIICHI SANKYO COMPANY, LIMITED, JP

(51) IPC

C12N15/13 (2006.01)

12	HOUSE 23.12.2021	105201
----	------------------	--------



Machine Translated by Google

2

QUESTIONS, REASONS, COMMENTS, SUGGESTIONS

The Examiner reviewed the applicant's response dated 12/23/2021 and reports the following.

The applicant submitted for consideration the amended claims, to which the examiner has the following remarks.

The Applicant corrected claim 1 of the formula, specifying the sign of a functional fragment of an antibody.

However, the Applicant did not include in claim 1 the features of the amino acid sequence claimed antibody and did not provide additional exemplary embodiments inventions confirming the possibility of realizing the purpose and achievement technical result in the implementation of the invention according to claim 1 in the entire declared scope.

The Applicant claims that "the description shows that a relatively wide range of design features can achieve the desired functional effect", whereby "paragraph 1 satisfies the requirements for sufficiency of disclosure" (p. 4 of the answer applicant). The applicant's opinion is based on the fact that the application disclosed four rat antibodies and humanized antibodies specific for the EC3 domain of CDH6, which have differences in their CDR sequences. The applicant also points out that the application contains information on the basis of which the specialist "determines whether antibody to specifically bind to the EC3 domain of CDH6 following the protocol described in paragraphs 0237 and 0280".

• Information about the state of paperwork on the application can be obtained by calling 8 (499) 240 60 15;
 • Information on the state of paperwork on applications is posted on the FIPS website at www.fips.ru in the section "Information resources / Open registries";
 • When changing the address for correspondence on the application, the applicant is obliged to inform about it immediately.

* Civil Code of the Russian Federation Part Four of December 18, 2006 N 231-FZ with amendments and additions.

**Regulations on patent and other fees for legally significant actions related to a patent for an invention, utility model, industrial design, with state registration of a trademark and service mark, with state registration and the granting of an exclusive right to an appellation of origin, as well as with state registration of the alienation of the exclusive right to the result of intellectual activity or means of individualization, pledge of the exclusive right, granting the right to use such a result or such

funds under a contract, transfer of the exclusive right to such a result or such a means without a contract, approved by Decree of the Government of the Russian Federation of December 10, 2008 N 941, as amended.

***The administrative regulations for the provision by the Federal Service for Intellectual Property of the state service for the state registration of an invention and the issuance of a patent for an invention, its duplicate was approved by order of the Ministry of Economic Development of Russia dated May 25, 2016 N 315, registered on July 14, 2016, registration N 42843, with changes.

****The rules for the preparation, submission and consideration of documents that are the basis for the performance of legally significant actions for the state registration of inventions, and their forms were approved by order of the Ministry of Economic Development of Russia dated May 25, 2016 N 316, registered on July 11, 2016, registration N 42800.

*****Requirements for the documents of an application for a patent for an invention approved by order of the Ministry of Economic Development of Russia dated May 25, 2016 N 316, registered on July 11, 2016, registration N 42800.

Machine Translated by Google

3

In addition, the Applicant points out that antibodies binding the EC3 domain of CDH6 with the sequence of SEQ ID NO: 4, to which the invention is directed, have not been previously described (page 3 of the applicant's response).

The Examiner cannot agree with the Applicant for the following reasons.

In the application materials, the antibodies indicated by the applicant with different sets of CDRs. However, the possibility of achieving a technical result, which, in accordance with the original application materials, consists in increased the ability of an antibody to internalize into cells expressing CDH6, allowing its use as an antibody for ADC (paragraph [0013] of the original description) has not been validated for all of these antibodies. Only for four humanized variants of the G019 antibody confirmed as specific binding to the EC3 domain CDH6 having the sequence of SEQ ID NO: 4, and the above technical effects (see Example 6-9, Fig.10, 11, 12). These humanized antibody variants G019 do not show structural diversity in the CDR sequences that indicates the applicant in his answer.

The Examiner also notes that the linking feature with SEQ ID NO: 4 is not a sufficient characteristic of the claimed antibody according to claim 1, since it does not provides the possibility of achieving the specified technical result.

Thus, SEQ ID NO: 4 is the sequence of the EC3 domain of CDH6, and not can be considered as an epitope of the antigen to which the antibody binds invention. The specified sequence of SEQ ID NO: 4 includes 115 a.a., while it is known from the prior art that the interaction with an antibody, as a rule, involves from 5 up to 15 a.a. protein antigen (D1: ALTSHULER E.P. et al., Obtaining recombinant antibodies and ways to increase their affinity, Advances in Biological Chemistry, 2010, v.50, pp. 203-258, see pp. 207-208). It also does not follow from the submitted application materials that all amino acid residues of SEQ ID NO:4 are involved in binding to the antibody.

However, since the EC3 domain of CDH6 with the sequence of SEQ ID NO: 4 has some degree of identity and homology with the corresponding domains of others cadherins (for example, 73.9% identical and 90.4% homologous to the sequence mouse cadherin 9, see UniProtKB database: locus CADH9_MOUSE, accession P70407, November 25, 2002), then antibodies that bind to other members of the cadherin family can also bind to SEQ ID NO: 4, but do not show the necessary functional activity.

In view of the foregoing, as well as the knowledge from the prior art that the protein has certain functions by virtue of its amino acid sequence, and not

Machine Translated by Google

4

on the contrary (SINGER M., BERG P., Genes and genomes: in 2 volumes. Volume 1. Translated from English. M.: Mir, 1998. - 373 p., ill.; see pages 63-64), and the amino acid sequence and relative position

The CDRs of each variable domain are critical for the formation of an antigen-binding site (active center) of an antibody (see, for example, YARILIN A.A., Fundamentals of Immunology: Textbook. - M.: Medicine, 1999, 608s.; p.171 second paragraph, p.172-173), the examination came to the conclusion that it is the structure of the variable domains of the antibody that determines the possibility of implementing the invention claimed in claim 1 with the achievement of the technical result indicated by the applicant.

In connection with the foregoing, according to the examination, the essence of the invention according to claim 1 in documents of the application are not sufficiently disclosed for the implementation of the invention by a specialist in the art, in connection with which the invention according to claim 1 is still recognized as inconsistent with the provisions of clause 53 of the Rules, clause 45 of the Requirements, clause 2 (2) of Article 1375

Civil Code of the Russian Federation.

The Applicant may submit additional examples confirming the possibility of carrying out the invention according to claim 1 with the implementation of the destination and the achievement of the technical result in the entire declared volume. However, these examples should be presented as additional materials, without including them in the corrected description (clause 96 of the Rules).

Also, the applicant has the right to adjust paragraph 1 on the basis of the initial application materials, limiting the scope of the claimed legal protection to essential features of the above humanized variants of the G019 antibody, ensuring the implementation of the appointment with the achievement of the specified technical result. These features, according to the examination, are amino acid sequences of the heavy and light chain variable domains (at least in the amount of six CDR-sections).

The rest of the inventions presented in the claims are based on the receipt and the use of an antibody according to claim 1, as a result of which these inventions also cannot be currently recognized as complying with the requirements of clause 53 of the Rules, clause 45 of the Requirements,

Clause 2(2) of Article 1375 of the Civil Code of the Russian Federation.

In addition, with respect to the inventions under claims 29 and 49, the Examiner notes the following. The conjugate of claim 29 and the composition of claim 49 are intended for use in as a medicinal product. At the same time, in the submitted application materials there is no information confirming the possibility of using these conjugates

Machine Translated by Google

5

and compositions as a medicament for the treatment/prevention of any diseases or disorders (clause 45, clause 53(2) of the Requirements, clause 2(2) of Article 1375 of the Civil Code of the Russian Federation). AT the original description (see Examples) discloses the possibility of using the conjugate an antibody drug comprising an antibody of the invention and comprising its compositions only as anticancer drugs.

The applicant has the right to clarify the purpose of the conjugate according to paragraph 29 and the composition according to paragraph 49, based on the original application materials.

The applicant has the right to familiarize himself with the remarks of the examination and express his opinion.

If the applicant , **within three months from the date of sending the request** , does not submit requested materials or fails to apply for an extension of this deadline, the application will be recognized as withdrawn. The deadline for submission of requested materials may be extended, but for no more than ten months (*the total extension period should not exceed ten months*) (Clause 6, Article 1386 of the Code*)

The extension of the response time to the examination request is carried out subject to payment the relevant patent fee in the prescribed manner.

Additional materials submitted by the applicant should not change the application for invention on the merits (Clause 2, Article 1378 of the Code*).

Additional materials are submitted for review to third parties in in accordance with paragraph 2 of Art. 1394 of the Code* after the publication of information on the grant of a patent.

Leading
State Expert on
Intellectual Property
of the FIPS
Department of
Biotechnology,
Agriculture and Food
Industry

The document is signed with an electronic signature
Information about the
Certificate
5F1F8A00EAADEF8F46583ABB8E686ED3
Owner Tulinova
Olga Anatolievna
Valid from 11/24/2021 to 11/24/2022

O. A. Tulinova
8(499)240-61-46

GENES & GENOMES

A changing Perspective

Maxine Singer

President, Carnegie Institution of
Washington Scientist Emeritus,
National Institutes of Health

Paul Berg

Willson Professor of Biochemistry
Director, Beckman Center for Molecular
and Genetic Medicine,
Stanford University School of Medicine

University Science Books
Mill Valley, California

М.СИНГЕР, П.БЕРГ

ГЕНЫ И ГЕНОМЫ

В двух томах
Том 1

Перевод с английского
д-ра биол. наук Т. С. Ильиной
д-ра биол. наук Ю. М. Романовой

под редакцией
д-ра биол. наук Н. К. Янковского



МОСКВА «МИР» 1998

УДК 575.113/118
ББК 28.04
С38

Авторы: Сингер М., Берг П.
С38 **Гены и геномы:** В 2-х т. Т. 1. Пер. с англ. - М.: Мир,
1998. - 373 с., ил.
ISBN 5-03-002849-8

Университетское руководство по молекулярной биологии, написанное выдающимися американскими учеными, членами Национальной академии наук (П. Берг - лауреат Нобелевской премии). Книгу отличает общепрофессиональный подход, глубина теоретических обобщений, ясная и наглядная форма подачи материала.

В 1-м томе рассматриваются следующие вопросы: строение и функционирование биологических молекул, участвующих в работе генетического аппарата; процессы репликации и экспрессии генов; широкий круг вопросов, относящихся к технологии рекомбинантных ДНК (ферментные системы, системы вектор-хозяин, манипуляции с рекомбинантными ДНК).

Для молекулярных биологов, преподавателей и студентов университетов, специалистов.

ББК 28.04

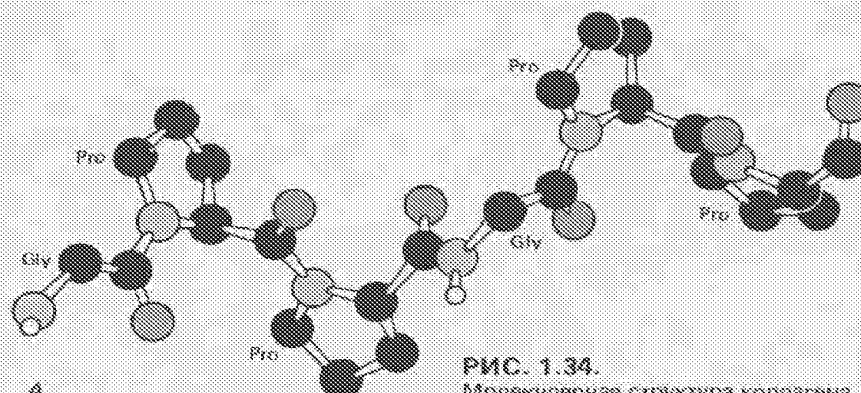
Редакция литературы по биологии



Издание осуществлено при поддержке
Российского фонда фундаментальных исследований
по проекту № 98-04-62107

ISBN 5-03-002848-X (русск.)
ISBN 5-03-002849-8
ISBN 0-935702-17-2 (англ.)

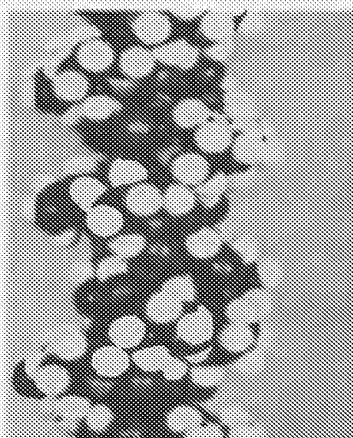
© 1991 by University Science Books
© перевод на русский язык издательство
«Мир», 1998



A

РИС. 1.34.

Молекулярная структура коллагена. А. Основной повторяющийся структурный элемент, состоящий из остатков глицина и двух остатков пролина. Б. Скелетная модель трехцепочечной коллагеновой спирали. Каждая цепочка состоит из нескольких повторяющихся структурных элементов, указанных на рис. А. [L. Styer, *Biochemistry* (San Francisco: W.H. Freeman, 1981).] В. Пространственная модель коллагена II. Каждая цепочка состоит из повторяющихся элементов глицин-пролин-гидроксипролин. Шаг спирали равен 2,86 нм. [A. Rich, F.H.C. Crick, *J. Mol. Biol.*, 3 (1961), p. 483.]



B



B

очередь с помощью дополнительных взаимодействий объединяются в $\alpha_1\beta_2$ -тетрамер (рис. 1.36). Детальные исследования структуры гемоглобина позволили установить, как изменяются соответствующие взаимодействия при связывании этим белком кислорода.

Вторичная, третичная и четвертичная структуры белков тесно связаны между собой и в конечном счете определяются первичной структурой одной или нескольких полипептидных цепей. Последствия такой взаимосвязи очень значительны: информация, определяющая укладку белковой молекулы и переход ее в биологически активное состояние, закодирована в его аминокислотной последовательности. Подтверждением этого принципиального положения служит то, что химические модификации и мутационные изменения аминокислотной последовательности полипептидов сильно влияют на их ренатурацию и способность формировать вторичную, третичную и четвертичную структуры с полной биологической активностью.

В качестве одного из многочисленных примеров зависимости структуры и функции белка от его аминокислотной последовательности можно привести серповидноклеточную анемию. Генетическое нарушение при этой болезни выражается в замене глутаминовой кислоты, шестой по счету от N-конца β -цепи в нормальном гемоглобине, на валин. Изменение в первичной структуре β -глобина приводит

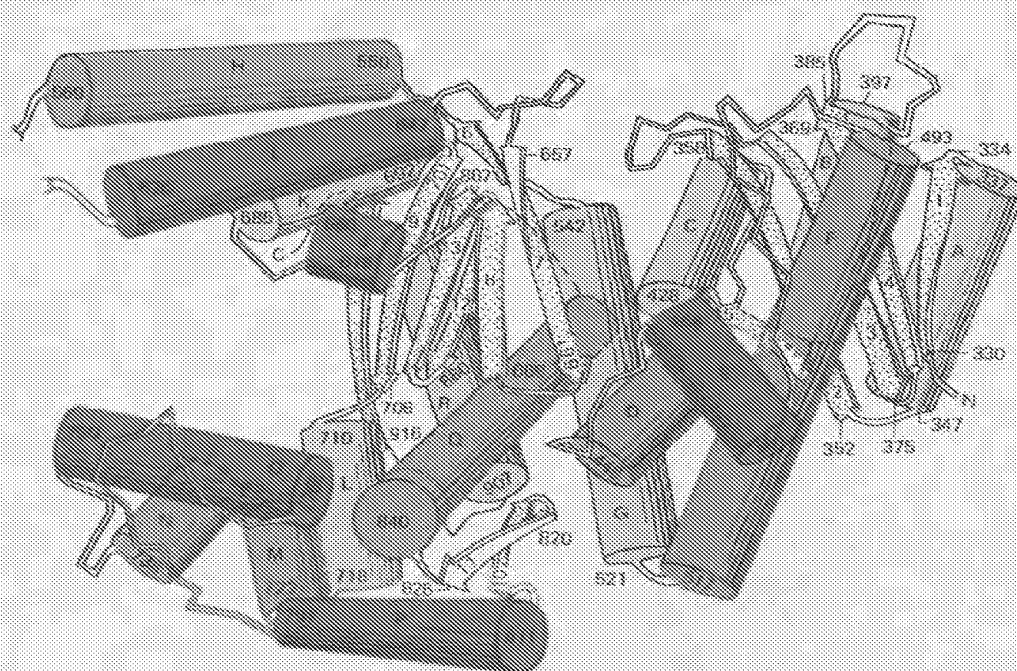


РИС. 1.35.

Схематическое изображение участка ДНК-полимеразы I *E. coli*. а-Спирали изображены в виде цилиндров, β -спои – в виде стрелок. Чем интенсивнее окрашены эти

элементы, тем ближе они расположены к читателю. [D. L. Ollis et al., *Nature*, 313 (1985), p. 762.]

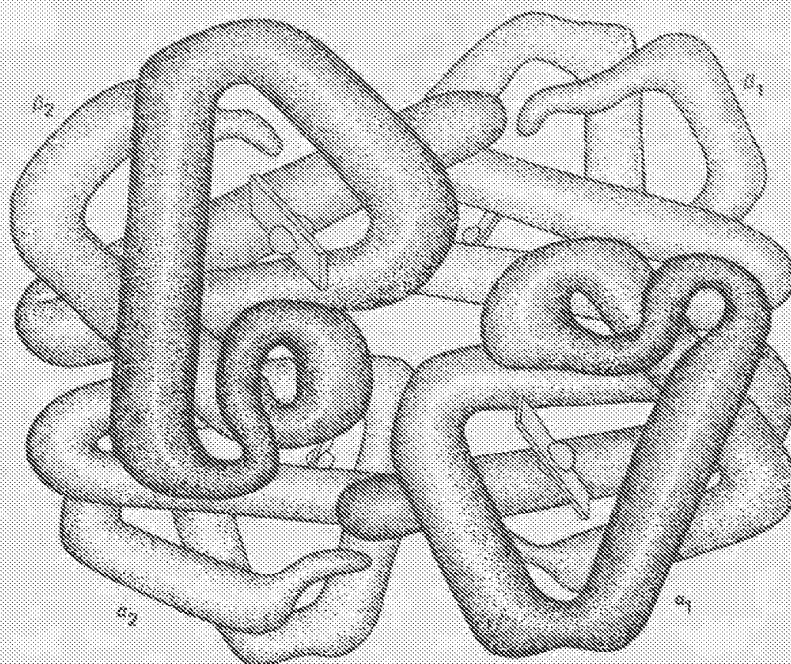


РИС. 1.36.

Модель гемоглобина, построенная при низком разрешении. Гемоглобин – это тетрамерный белок, состоящий из двух α -цепей (α_1 и α_2) и двух β -цепей (β_1 и β_2). С каждой из цепей связана гемогруппа (выделена цветом; прямоугольник – гем, шарик – атом железа). (Copyright Irving Geis.)

Authors: Singer M., Berg P. Genes and Geomes: In 2 vols. T. 1. Per. from English-M.: Mir. 1998.- 373 S.,],fL. ISBN 5-03-002849-8

University Guide to Molecular Biology written by eminent American scientists, members of the National: Iot1aJ1b Academy Sciences (P. Berg Nobel Prize winner). The book is distinguished by general biological approach, the depth of the theoretical. generalizations. graceful and visual material feed form.t. Volume 1 deals with the following questions: structure and function biological molecules involved1 in the work of genetically apparatus: processes of replication and gene expression; wide circle questions related to recombinant DNA technology (enzymatic systems" of the investor-host system, manipulations with rec-ombi-.~antnyM1! DNA). For molecular biologists, teachers and university students specialists.

FIG.1.34.

Molecular structure of collagen. A. Main recurring structural element. made up of leftovers glycine and two proline residues. B. Skenet!-th model,rechnocular collagen coil. Every chain consists of several repeating structural elements. y1<aza1-1nyh in fig. A. [L. Stryer, Bioctemistry (San Francisco: W. H. Freeman. 1981}..] V. Space venous model of collagen 11. Each chain consists of repeating units glycine-roline-hydroxy-roline. The helix pitch is 2.86 nm. (A. R, ch. F. N. C. Crick, J. Mol. Biol., Z (1961), p. 483.]

queue with additional interactions unite in a1P2-tetramer (Fig. 1.36). Detail1 study of the structure of remo1 lo6J1Na allowed1t establish how the corresponding interactions u,11 binding tpsh et11m protein kr1clor() yes. Secondary, tertiary and quaternary structures proteins are closely related to each other 11 in a single account are determined by the primary structure of one 1:~whether there are several~<their nol intid circuits. Effects such a relationship is very significant: information, determining the j1ya1<>folding1<of the protein molecule 11 transition her to a legally active state, encoded in its amino1<islot11oii sequence. Confirmation of this is the plch11 pial position serves that. that chemi•leskne mo.dj1fpkacpi 11 mutated r1 changes in the amino acid sequence;; valence11 renaturation and the ability to form a secondary, tertiary II quaternary structure with a full 61-lop1chesky activity.

As one of many examples depend:nbridge structure 11 protein functions from ero amino acid sequence can be given sernovi:diocellular ane!\-NIU, Genet1{Chemical violation in this disease is expressed in the replacement-lutamic acid, sixth from the N-terminus J.i,-cep11 in normal remo-lobin, for valine. Change in the primary structure R., lobina drive ~ 1t

FIG. 1.35.

Schematic representation of the DNA polymerase 1 region f coli C,I Spirals are depicted as cylinders,13-sing in the form of arrows. The more intensely colored these elements. the closer he1-1 are located to the reader [D. L. Osh et al "Nature. 313 (1985), p. 762.]

FIG.1.36.

Mo;: ~ spruce hemoglob.ina, built with low resolution hemoglobin tetra11: dimensional protein. consisting of two a-chains (o 1 and a2) and deux P-chains (131 and R2). Remorpyinfla is associated with each of the chains (highlighted in color; rectangle- rem, ball - iron atom). (Copyright Irving Geis.)

We will be switching to the new UniProt website soon. Please explore and share your feedback. [Take me to the new website.](#)



UniProtKB - P70407 (CADH9_MOUSE)

Protein **Cadherin-9**
Gene **Cdh9**
Organism *Mus musculus* (Mouse)
Status **Reviewed** - Annotation score: - Experimental evidence at transcript level

Function

Cadherins are calcium-dependent cell adhesion proteins. They preferentially interact with themselves in a homophilic manner in connecting cells; cadherins may thus contribute to the sorting of heterogeneous cell types.

GO - Molecular function

- [cadherin binding](#) Evidence: Source: GO_Central
- [cadherin binding involved in cell-cell adhesion](#) Evidence: Source: SynGO-UCL
- [calcium ion binding](#) Evidence: Source: GO_Central
- [identical protein binding](#) Evidence: Source: SynGO-UCL

GO - Biological process

- [adherens junction organization](#) Evidence: Source: GO_Central
- [calcium-dependent cell-cell adhesion via plasma membrane cell adhesion molecules](#) Evidence: Source: GO_Central
- [cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules](#) Evidence: Source: GO_Central
- [cell-cell junction assembly](#) Evidence: Source: GO_Central
- [cell morphogenesis](#) Evidence: Source: GO_Central
- [homophilic cell adhesion via plasma membrane adhesion molecules](#) Evidence: Source: InterPro
- [synapse assembly](#) Evidence: Source: SynGO-UCL
- [synaptic membrane adhesion](#) Evidence: Source: SynGO

Keywords

Biological process [Cell adhesion](#)
Ligand [Calcium](#), [Metal-binding](#)

Enzyme and pathway databases

Readome [R-MMU-418990](#), Adherens junctions interactions

Names & Taxonomy

Protein names	Recommended name: Cadherin-9 Alternative name(s): • T1-cadherin
Gene names	Name: Cdh9
Organism	Mus musculus (Mouse)
Taxonomic identifier	10090 [NCBI]
Taxonomic lineage	Eukaryota > Metazoa > Chordata > Craniata > Vertebrata > Euteleostomi > Mammalia > Eutheria > Euarchontoglires > Glires > Rodentia > Myomorpha > Muroidea > Muridae > Murinae > Mus > Mus
Proteomes	UP000000589 Component: Unplaced

Organism-specific databases

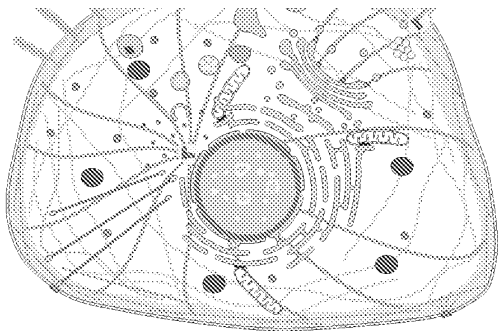
MGI [MGI:107433](#), Cdh9

Subcellular location

UniProt annotation [GO - Cellular component](#)



Plasma membrane



Cell membrane ; Single-pass type I membrane protein ;

Automatic annotation
Manual annotation
Source: SwissProt

Topology

Feature key	Position(s)	Description	Graphical view
Topological domain	22 – 614	Extracellular ; Evidence: Sequence analysis	
Transmembrane	615 – 635	Helical ; Evidence: Sequence analysis	
Topological domain	636 – 786	Cytoplasmic ; Evidence: Sequence analysis	

Keywords - Cellular component

Cell membrane, Membrane

PTM / Processing

Molecule processing

Feature key	Position(s)	Description	Graphical view
Signal peptide	1 – 21	; Evidence: Sequence analysis	
Propeptide (PRO_0000269661)	22 – 52	; Evidence: Sequence analysis	
Chain (PRO_0000126645)	53 – 786	Cadherin-9	

Amino acid modifications

Feature key	Position(s)	Description	Graphical view
Glycosylation	21	N-linked (GlcNAc...) asparagine ; Evidence: Sequence analysis	
Glycosylation	254	N-linked (GlcNAc...) asparagine ; Evidence: Sequence analysis	
Glycosylation	454	N-linked (GlcNAc...) asparagine ; Evidence: Sequence analysis	
Glycosylation	535	N-linked (GlcNAc...) asparagine ; Evidence: Sequence analysis	
Modified residue	785	Phosphoserine ; Evidence: By similarity	

Keywords - PTM

Cleavage on pair of basic residues, Glycoprotein, Phosphoprotein

Proteomic databases

PaxDb	P70407
PRIDE	P70407
ProteomicsDB	281745

PTM databases

GlyConnect	2173, 2 N-Linked glycans (2 sites)
GlyGen	P70407, 5 sites, 2 N-linked glycans (2 sites)
iPTMnet	P70407
PhosphoSitePlus	P70407

Expression

Developmental stage

Not detected in fetal, newborn or 7-day-old testis. Present in 21-day-old and adult testes. Levels are 10-fold higher in adult testis than in testis of 21-day-old animals. ; Evidence: 1 Publication

Interaction

GO - Molecular function

- cadherin binding Evidence Source: GO_Central
- cadherin binding involved in cell-cell adhesion Evidence Source: SynGO-UCL
- identical protein binding Evidence Source: SynGO-UCL

Protein-protein interaction databases

STRING	10090.ENSMUSP00000026432
--------	--------------------------

Miscellaneous databases

RNAct	P70407, protein
-------	-----------------

Structure

Model Confidence:

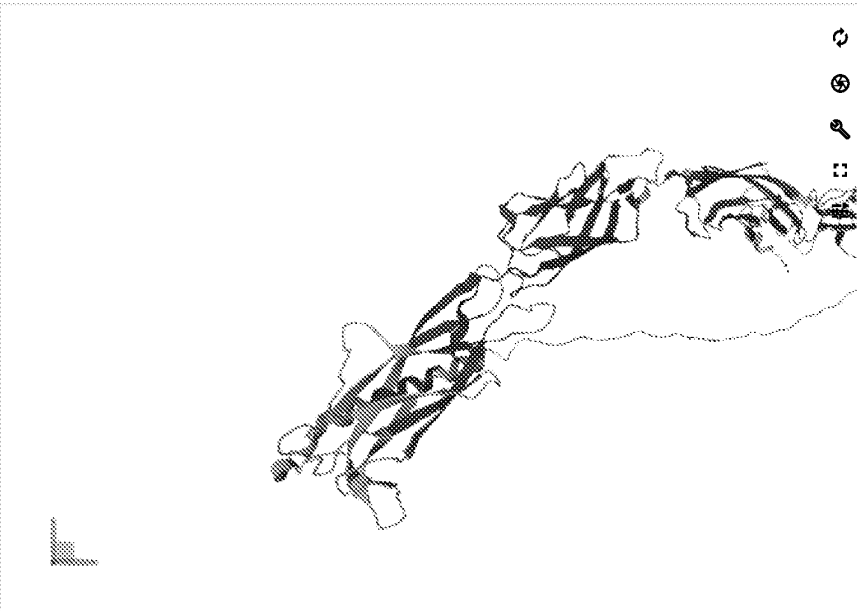
Very high (pLDDT > 90)

Confident (90 > pLDDT > 70)

Low (70 > pLDDT > 50)

Very low (pLDDT < 50)

AlphaFold produces a per-residue confidence score (pLDDT) between 0 and 100. Some regions with low pLDDT may be unstructured in isolation.



SOURCE	IDENTIFIER	METHOD	RESOLUTION	CHAIN	POSITIONS	LINKS
-- Select --		-- Select --				
AlphaFold	AF-P70407-F1	Predicted			1-786	AlphaFold

3D structure databases

SMR	P70407
ModBase	Search...

Family & Domains

Domains and Repeats

Feature key	Position(s)	Description	Graphical view
Domain	54 – 158	Cadherin 1 Evidence PROSITE-ProRule annotation	
Domain	159 – 267	Cadherin 2 Evidence PROSITE-ProRule annotation	
Domain	268 – 382	Cadherin 3 Evidence PROSITE-ProRule annotation	
Domain	383 – 487	Cadherin 4 Evidence PROSITE-ProRule annotation	
Domain	487 – 604	Cadherin 5 Evidence PROSITE-ProRule annotation	

Domain

Three calcium ions are usually bound at the interface of each cadherin domain and rigidify the connections, imparting a strong curvature to the full-length ectodomain. Evidence By similarity

Keywords - Domain

Repeat, Signal, Transmembrane, Transmembrane helix

Phylogenomic databases

eggNOG	KOG3594 , Eukaryota
InParanoid	P70407
PhylomeDB	P70407

Family and domain databases

Gene3D	4.10.900.10 , 1 hit
InterPro	View protein in InterPro IPR039808 , Cadherin IPR002126 , Cadherin-like_dom IPR015919 , Cadherin-like_sf IPR020894 , Cadherin_CS IPR000233 , Cadherin_cytoplasmic-dom IPR027397 , Catenin-bd_sf
PANTHER	PTHR24027 , PTHR24027, 1 hit
Pfam	View protein in Pfam PF00028 , Cadherin, 5 hits PF01049 , Cadherin_C, 1 hit
PRINTS	PR00205 , CADHERIN
SMART	View protein in SMART SM00112 , CA, 5 hits
SUPFAM	SSF49313 , SSF49313, 5 hits
PROSITE	View protein in PROSITE PS00232 , CADHERIN_1, 2 hits PS50268 , CADHERIN_2, 5 hits

Sequence (1+)

Sequence status: Complete.
Sequence processing: The displayed sequence is further processed into a mature form.
This entry has 1 described isoform and 1 potential isoform that is computationally mapped.

P70407-1 [[UniParc](#)]
[« Hide](#)

1020304050

MRTYSCLQLV IWTCIFHMDV NSTLQKGDSS HFLRRIVNLK KDEGKMLHRA

60708090100

KRGWMWQFF LLEEYTGTDI QYVGKLHTDQ DKGDGNLKYI LTGDGAGNLF

110120130140150

VIDENTGDIH AAKRLDREEK SLYILRAKAI DRKTGRQVEP ESEFIIKIHD

160170180190200

INDNEPKFTK DLYTASVPEM SGVGTSVIQV TATDADDANY GNSAKVVYSI

210220230240250

LQGQPYFSVD PESGIIKTAL PDMSRENKEQ YQVVIQAKDM GGQMGGLSGT

260270280290300

TTVNITLTDV NNNPPRFPQS TYQFNSLESA PLGTHLGRIK ANDPDMGENA

310320330340350

ELEYSIAEGE GSDMFDVITD KDTQEGIIIV KQNLDFEKKM LYTLRVDASN

360370380390400

THPDPRLHL GPFKDSAMVK ISVEDVDEPP VFSKLSYLME VDEDVKEGSI

410420430440450

IGQVTAYDPD AMNNIIKYSV DRHTDMDRV F SIHSENGSIF TLKPLDRESS

460470480490500

PWHNITITAT EINNPKQSSQ IPVFIIRLDI NDHAPEFATY YETFCENAK

510520530540550

SGQLIQTISV MDKDDPPRGH KFFFEPVPEF PLNPNTIVD NKDNTAGIVT

560570580590600

RKDGYSRNKM NTYLLPVLIF DNDYPIQSST GTLTIRVCAC DNLGNMQSCN

610620630640650

AEALMLAAGL STGALIAILL CVVILLTLIV LFAALKRQRK KEPLIISKDD

660670680690700

VRDNIVTYND EGGGEEDTQA FDIGTLRNPE AREDSKLRRD VMPETIFQIR

710720730740750

RTVPLWENID VQDFIHRRLK ENSDPSAPP YDSLATYAYE GNSDVANSLS

760770780

SLESLTADCN QDYDYLSDWG PRFKKLAEMY GGNDSD

Length: 786

Mass (Da): 88,301

Last modified: December 12, 2006 - v2

Checksum: D9B1CE63502F87C2

Computationally mapped potential isoform sequences

There is 1 potential isoform mapped to this entry.

☐	Entry	Entry name		Protein names	Gene names	Length	Annotation
☐	F8WHU6	F8WHU6_MOUSE		Cadherin-9	Cdh9	788	Annotation score: 

Experimental Info

Feature key	Position(s)	Description	Graphical view
Sequence conflict	681	A → AK in AAB87707 (PubMed: 8879495).  Curated	
Sequence conflict	692	M → S in AAB87707 (PubMed: 8879495).  Curated	
Sequence conflict	725 – 727	DPS → T in AAB87707 (PubMed: 8879495).  Curated	
Sequence conflict	786	D → DLN in AAB87707 (PubMed: 8879495).  Curated	

Sequence databases

Select the link destinations:	AC116724 Genomic DNA No translation available.
	U69136 mRNA Translation: AAB87707.1
	
	
	

Similar proteins

[100% Identity](#) [90% Identity](#) [50% Identity](#)

Cross-references

Sequence databases

Select the link [AC116724](#) Genomic DNA No translation available.

destinations: [U69136](#) mRNA Translation: [AAB87707.1](#)

 EMBL

 GenBank

 DDBJ

3D structure databases

SMR [P70407](#)

ModBase [Search...](#)

Protein-protein interaction databases

STRING [10090.ENSMUSP00000026432](#)

PTM databases

GlyConnect [2173](#), 2 N-Linked glycans (2 sites)

GlyGen [P70407](#), 5 sites, 2 N-linked glycans (2 sites)

iPTMnet [P70407](#)

PhosphoSitePlus [P70407](#)

Proteomic databases

PaxDb [P70407](#)

PRIDE [P70407](#)

ProteomicsDB [281745](#)

Organism-specific databases

MGI [MGI:107433](#), Cdh9

Phylogenomic databases

eggNOG [KOG3594](#), Eukaryota

InParanoid [P70407](#)

PhylomeDB [P70407](#)

Enzyme and pathway databases

Reactome [R-MMU-418990](#), Adherens junctions interactions

Miscellaneous databases

ChITaRS [Cdh9](#), mouse

PRO [PR:P70407](#)

RNAc [P70407](#), protein

SOURCE [Search...](#)

Family and domain databases

Gene3D [4.10.900.10](#), 1 hit

InterPro [View protein in InterPro](#)
[IPR039808](#), Cadherin
[IPR002126](#), Cadherin-like_dom
[IPR015919](#), Cadherin-like_sf
[IPR020894](#), Cadherin_CS
[IPR000233](#), Cadherin_cytoplasmic-dom
[IPR027397](#), Catenin-bd_sf

PANTHER [PTHR24027](#), PTHR24027, 1 hit

Pfam [View protein in Pfam](#)
[PF00028](#), Cadherin, 5 hits
[PF01049](#), Cadherin_C, 1 hit

PRINTS [PR00205](#), CADHERIN

SMART [View protein in SMART](#)
[SM00112](#), CA, 5 hits

SUPFAM	SSF49313 , SSF49313, 5 hits
PROSITE	View protein in PROSITE PS00232 , CADHERIN_1, 2 hits PS50268 , CADHERIN_2, 5 hits
MobiDB	Search...

Entry information

Entry name	CADH9_MOUSE
Accession	Primary (citable) accession number: P70407
Entry history	Integrated into UniProtKB/Swiss-Prot: November 25, 2002 Last sequence update: December 12, 2006 Last modified: September 29, 2021 This is version 142 of the entry and version 2 of the sequence. See complete history.
Entry status	Reviewed (UniProtKB/Swiss-Prot)
Annotation program	Chordata Protein Annotation Program

Miscellaneous

Keywords - Technical term

[Reference proteome](#)

Documents

- [MGD cross-references](#)
Mouse Genome Database (MGD) cross-references in UniProtKB/Swiss-Prot



UniProt is an ELIXIR core data resource

Main funding by:

[National Institutes of Health](#)

EMBL-EBI



State Secretariat for Education,
Research and Innovation SERI

Electronic Patent Application Fee Transmittal				
Application Number:		16613203		
Filing Date:		13-Nov-2019		
Title of Invention:		ANTI-CDH6 ANTIBODY AND METHOD OF PRODUCING AN ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE		
First Named Inventor/Applicant Name:		Atsuko SAITO		
Filer:		Benjamin A. Berkowitz/Rebecca Fincutter		
Attorney Docket Number:		098065-0249		
Filed as Large Entity				
Filing Fees for U.S. National Stage under 35 USC 371				
Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Basic Filing:				
Pages:				
Claims:				
Miscellaneous-Filing:				
Petition:				
Patent-Appeals-and-Interference:				
Post-Allowance-and-Post-Issuance:				
Extension-of-Time:				

Description	Fee Code	Quantity	Amount	Sub-Total in USD(\$)
Miscellaneous:				
SUBMISSION- INFORMATION DISCLOSURE STMT	1806	1	260	260
Total in USD (\$)				260

Electronic Acknowledgement Receipt	
EFS ID:	45759325
Application Number:	16613203
International Application Number:	
Confirmation Number:	6337
Title of Invention:	ANTI-CDH6 ANTIBODY AND METHOD OF PRODUCING AN ANTI-CDH6 ANTIBODY-DRUG CONJUGATE
First Named Inventor/Applicant Name:	Atsuko SAITO
Customer Number:	22428
Filer:	Benjamin A. Berkowitz/Rebecca Fincutter
Filer Authorized By:	Benjamin A. Berkowitz
Attorney Docket Number:	098065-0249
Receipt Date:	19-MAY-2022
Filing Date:	13-NOV-2019
Time Stamp:	18:17:54
Application Type:	U.S. National Stage under 35 USC 371

Payment information:

Submitted with Payment	yes
Payment Type	CARD
Payment was successfully received in RAM	\$260
RAM confirmation Number	E20225II19264647
Deposit Account	190741
Authorized User	Rebecca Fincutter
The Director of the USPTO is hereby authorized to charge indicated fees and credit any overpayment as follows: 37 CFR 1.21 (Miscellaneous fees and charges)	

File Listing:					
Document Number	Document Description	File Name	File Size(Bytes)/ Message Digest	Multi Part /.zip	Pages (if appl.)
1	Transmittal Letter	098065-0249_IDS_E_Transmittal.pdf	145658	no	3
			588301570761e56904ab1381848d99a6d58bc50		
Warnings:					
Information:					
2	Information Disclosure Statement (IDS) Form (SB08)	098065-0249_SB08_E.pdf	149513	no	1
			031db2999c04ba69851aa3a182b3b3e97c198af2		
Warnings:					
Information:					
This is not an USPTO supplied IDS fillable form					
3	Non Patent Literature	E1-- ALTSHULER_E_P_ET_AL____ Generation_of.pdf	7254516	no	79
			082ee4110d1b205252863dc31bea3de90063ec34		
Warnings:					
Information:					
4	Non Patent Literature	E2-- JARILIN_A_A____Fundamental s_of_Immunol.pdf	492827	no	10
			a212a6d8b6e244137f96dd562ee6522ed21cf0e5		
Warnings:					
Information:					
5	Other reference-Patent/Application/ Search Documents	E3-- Office_Action_issued_in_corres ponding_.pdf	632560	no	10
			722d44f845d5eb91d19f0934c2c9beb133e712e4		
Warnings:					
Information:					
6	Other reference-Patent/Application/ Search Documents	E4-- Office_Action_issued_in_corres ponding_.pdf	473093	no	10
			0963072f0a791f0a988b57ef435074126932b5aa		
Warnings:					

Information:					
7	Non Patent Literature	E5-- SINGER_M__and_BERG_P__ _Genes_and_Gen.pdf	2790311 dacf9809bc24dc2853d1f38a10fc95315f3a0975	no	7
Warnings:					
Information:					
8	Non Patent Literature	E6-- UNIPROT_locus_CADH9_MOU SE_access_P70.pdf	322592 1c0e7ce9364f8094a7382636b2daa38e9bd14259	no	7
Warnings:					
Information:					
9	Fee Worksheet (SB06)	fee-info.pdf	38610 2b72e58b969680a5d3aabe19686d06fe97e8b7022	no	2
Warnings:					
Information:					
Total Files Size (in bytes):			12299680		
<p>This Acknowledgement Receipt evidences receipt on the noted date by the USPTO of the indicated documents, characterized by the applicant, and including page counts, where applicable. It serves as evidence of receipt similar to a Post Card, as described in MPEP 503.</p> <p><u>New Applications Under 35 U.S.C. 111</u> If a new application is being filed and the application includes the necessary components for a filing date (see 37 CFR 1.53(b)-(d) and MPEP 506), a Filing Receipt (37 CFR 1.54) will be issued in due course and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the filing date of the application.</p> <p><u>National Stage of an International Application under 35 U.S.C. 371</u> If a timely submission to enter the national stage of an international application is compliant with the conditions of 35 U.S.C. 371 and other applicable requirements a Form PCT/DO/EO/903 indicating acceptance of the application as a national stage submission under 35 U.S.C. 371 will be issued in addition to the Filing Receipt, in due course.</p> <p><u>New International Application Filed with the USPTO as a Receiving Office</u> If a new international application is being filed and the international application includes the necessary components for an international filing date (see PCT Article 11 and MPEP 1810), a Notification of the International Application Number and of the International Filing Date (Form PCT/RO/105) will be issued in due course, subject to prescriptions concerning national security, and the date shown on this Acknowledgement Receipt will establish the international filing date of the application.</p>					

Atty. Dkt. No. 098065-0249

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

First Inventor Name: Atsuko SAITO

Title: ANTI-CDH6 ANTIBODY AND ANTI-CDH6 ANTIBODY-
DRUG CONJUGATE

Application No.: 16/613,203

International Filing Date: 5/14/2018

371(c) Date: 11/13/2019

Examiner: LANDSMAN, ROBERT S

Art Unit: 1647

Confirmation No.: 6337

SUPPLEMENTAL INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT
UNDER 37 CFR §1.56

Commissioner for Patents
P.O. Box 1450
Alexandria, VA 22313-1450

Commissioner:

Applicant submits herewith documents for the Examiner's consideration in accordance with 37 CFR §§1.56, 1.97 and 1.98.

Applicant respectfully requests that each listed document be considered by the Examiner and be made of record in the present application and that an initialed copy of Form PTO/SB/08 be returned in accordance with MPEP §609.

The submission of any document herewith is not an admission that such document constitutes prior art against the claims of the present application or that such document is considered material to patentability as defined in 37 CFR §1.56(b). Applicant does not waive

Atty. Dkt. No. 098065-0249

any rights to take any action, which would be appropriate to antedate or otherwise remove as a competent reference any document submitted herewith.

CONCISE EXPLANATION OF RELEVANCE

References E1, E2, E5, and E6 were cited in an Office Action dated February 22, 2022 issued in corresponding Russian Patent Application No. 2019141268. The Russian Office Action is also submitted as Reference E4, with its English-language machine translation.

Reference E3 is an Office Action dated March 4, 2022 issued in corresponding Mexican Patent Application No. MX/a/2019/013597. An English-language machine translation is provided.

Full English-language machine translations are provided for References E1, E2, and E5.

TIMING OF THE DISCLOSURE

The listed documents are being submitted in compliance with 37 CFR §1.97(d), on or before payment of the issue fee.

STATEMENT UNDER 37 CFR §1.97(e)

The undersigned hereby states in accordance with 37 CFR §1.97(e)(1) that each item of information contained in this supplemental information disclosure statement was first cited in any communication from a foreign patent office in a counterpart foreign application not more than three (3) months prior to filing of this Statement.

FEE

Fees in the amount of \$260.00 to cover the fee associated with an information disclosure statement are being paid by credit card via EFS-Web.

Atty. Dkt. No. 098065-0249

The Commissioner is hereby authorized to charge any additional fees which may be required for this application to Deposit Account Number 19-0741.

Respectfully submitted,

Date May 19, 2022_____

By /Benjamin Berkowitz/_____

FOLEY & LARDNER LLP
Customer Number: 22428
Telephone: (202) 672-5490
Facsimile: (202) 672-5399

Benjamin A. Berkowitz
Attorney for Applicant
Registration No. 59,349

PRINTER RUSH
(PTO ASSISTANCE)Application: 16613203Examiner: LandsmanGAU: 1647

From:

Location: RTFMCreation Date: 05/31/2022Week Date: 5/9/2022

<u>DOC CODE</u>	<u>DOC DATE</u>	<u>MISCELLANEOUS</u>
☐ 1449	<u>05/19/2022</u>	☐ Continuing Data
☒ IDS		☐ Foreign Priority
☐ CLM		☐ Document Legibility
☐ IIFW/FWCLM		☐ Fees
☐ SRFW		☐ Petition (TC)
☐ DRW		☐ Other
☐ OATH		
☐ 312		
☐ SPEC		

[RUSH] Message:

Please respond to the 05/19/22 IDS.

Thank you

[XRUSH] Response:

Initials: _____

Examiner: PUBS contact - James Leija, (703) 756-1197

NOTE: This form will be included as part of the official USPTO record with the response document coded as XRUSH.

REV: AUG 16



UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

UNITED STATES DEPARTMENT OF COMMERCE
United States Patent and Trademark Office
 Address: COMMISSIONER FOR PATENTS
 P.O. Box 1450
 Alexandria, Virginia 22313-1450
 www.uspto.gov

APPLICATION NO.	FILING DATE	FIRST NAMED INVENTOR	ATTORNEY DOCKET NO.	CONFIRMATION NO.
16/613,203	11/13/2019	Atsuko SAITO	098065-0249	6337
22428	7590	06/03/2022	EXAMINER	
FOLEY & LARDNER LLP			LANDSMAN, ROBERT S	
3000 K STREET N.W.			ART UNIT	
SUITE 600			PAPER NUMBER	
WASHINGTON, DC 20007-5109			1647	
			NOTIFICATION DATE	DELIVERY MODE
			06/03/2022	ELECTRONIC

Please find below and/or attached an Office communication concerning this application or proceeding.

The time period for reply, if any, is set in the attached communication.

Notice of the Office communication was sent electronically on above-indicated "Notification Date" to the following e-mail address(es):

ipdocketing@foley.com

Corrected Notice of Allowability	Application No. 16/613,203 Examiner ROBERT S LANDSMAN	Applicant(s) SAITO et al. Art Unit 1647 AIA (FITF) Status Yes
---	--	---

-- The MAILING DATE of this communication appears on the cover sheet with the correspondence address--

All claims being allowable, PROSECUTION ON THE MERITS IS (OR REMAINS) CLOSED in this application. If not included herewith (or previously mailed), a Notice of Allowance (PTOL-85) or other appropriate communication will be mailed in due course. **THIS NOTICE OF ALLOWABILITY IS NOT A GRANT OF PATENT RIGHTS.** This application is subject to withdrawal from issue at the initiative of the Office or upon petition by the applicant. See 37 CFR 1.313 and MPEP 1308.

1. ☒ This communication is responsive to the Notice of Allowability dated 5/11/22.
☐ A declaration(s)/affidavit(s) under **37 CFR 1.130(b)** was/were filed on _____.

2. ☐ An election was made by the applicant in response to a restriction requirement set forth during the interview on _____; the restriction requirement and election have been incorporated into this action.

3. ☒ The allowed claim(s) is/are 1-13 and 24-28 . As a result of the allowed claim(s), you may be eligible to benefit from the **Patent Prosecution Highway** program at a participating intellectual property office for the corresponding application. For more information, please see http://www.uspto.gov/patents/init_events/pph/index.jsp or send an inquiry to PPHfeedback@uspto.gov.

4. ☐ Acknowledgment is made of a claim for foreign priority under 35 U.S.C. § 119(a)-(d) or (f).

Certified copies:
 a) ☐ All b) ☐ Some* c) ☐ None of the:
 1. ☐ Certified copies of the priority documents have been received.
 2. ☐ Certified copies of the priority documents have been received in Application No. _____.
 3. ☐ Copies of the certified copies of the priority documents have been received in this national stage application from the International Bureau (PCT Rule 17.2(a)).

* Certified copies not received: _____.

Applicant has THREE MONTHS FROM THE "MAILING DATE" of this communication to file a reply complying with the requirements noted below. Failure to timely comply will result in ABANDONMENT of this application.
THIS THREE-MONTH PERIOD IS NOT EXTENDABLE.

5. ☐ CORRECTED DRAWINGS (as "replacement sheets") must be submitted.
☐ including changes required by the attached Examiner's Amendment / Comment or in the Office action of Paper No./Mail Date _____.

Identifying indicia such as the application number (see 37 CFR 1.84(c)) should be written on the drawings in the front (not the back) of each sheet. Replacement sheet(s) should be labeled as such in the header according to 37 CFR 1.121(d).

6. ☐ DEPOSIT OF and/or INFORMATION about the deposit of BIOLOGICAL MATERIAL must be submitted. Note the attached Examiner's comment regarding REQUIREMENT FOR THE DEPOSIT OF BIOLOGICAL MATERIAL.

Attachment(s)

1. ☐ Notice of References Cited (PTO-892) 2. ☒ Information Disclosure Statements (PTO/SB/08), Paper No./Mail Date 5/19/22. 3. ☐ Examiner's Comment Regarding Requirement for Deposit of Biological Material _____. 4. ☐ Interview Summary (PTO-413), Paper No./Mail Date. _____.	5. ☒ Examiner's Amendment/Comment 6. ☐ Examiner's Statement of Reasons for Allowance 7. ☐ Other _____.
---	--

	/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647
--	--

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 2

EXAMINER'S AMENDMENT

Notice of Pre-AIA or AIA Status

The present application, filed on or after March 16, 2013, is being examined under the first inventor to file provisions of the AIA.

An examiner's amendment to the record appears below. Should the changes and/or additions be unacceptable to applicant, an amendment may be filed as provided by 37 CFR 1.312. To ensure consideration of such an amendment, it MUST be submitted no later than the payment of the issue fee.

Authorization for this examiner's amendment was given in an interview with Michael Kaminski on 5/27/22.

In the claims:

Cancel claim 53

Application/Control Number: 16/613,203
Art Unit: 1647

Page 3

EXAMINER'S COMMENT

Claim 53 was inadvertently allowed in the Notice of Allowability dated 5/11/22. Otherwise, this Corrected Notice of Allowability is identical to that Notice.

Advisory information

Any inquiry concerning this communication or earlier communications from the examiner should be directed to ROBERT S LANDSMAN whose telephone number is 571-272-0888. The examiner can normally be reached M-F 8 AM – 6 PM (eastern).

Examiner interviews are available via telephone, in-person, and video conferencing using a USPTO supplied web-based collaboration tool. To schedule an interview, applicant is encouraged to use the USPTO Automated Interview Request (AIR) at <http://www.uspto.gov/interviewpractice>.

If attempts to reach the examiner by telephone are unsuccessful, the examiner's supervisor, Joanne Hama, can be reached at 571-272-2911. The fax phone number for the organization where this application or proceeding is assigned is 571-273-8300.

Information regarding the status of an application may be obtained from the Patent Application Information Retrieval (PAIR) system. Status information for published applications may be obtained from either Private PAIR or Public PAIR. Status information for unpublished applications is available through Private PAIR only. For more information about the PAIR system, see <http://pair-direct.uspto.gov>. Should you have questions on access to the Private PAIR system, contact the Electronic Business Center (EBC) at 866-217-9197 (toll-free).

/ROBERT S LANDSMAN/
Primary Examiner, Art Unit 1647

Issue Classification 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

CPC						
Symbol					Type	Version
A61K	/	47	/	6803	F	2017-08-01
A61K	/	47	/	6849	I	2017-08-01
A61P	/	35	/	00	I	2018-01-01
A61K	/	31	/	4745	I	2013-01-01
C07K	/	16	/	28	I	2013-01-01
C07K	/	2317	/	24	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	40	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	41	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	565	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	732	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	76	A	2013-01-01
C07K	/	2317	/	77	A	2013-01-01

CPC Combination Sets					
Symbol	Type	Set	Ranking	Version	
/		/			

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	18	
/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647	31 May 2022	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	none

<i>Issue Classification</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

INTERNATIONAL CLASSIFICATION			
CLAIMED			
A61K47/68	/	47	/ 68
C07K16/28	/	16	/ 28
NON-CLAIMED			
A61P35/00	/	35	/ 00
A61K31/4745	/	31	/ 4745

US ORIGINAL CLASSIFICATION	
CLASS	SUBCLASS

CROSS REFERENCES(S)						
CLASS	SUBCLASS (ONE SUBCLASS PER BLOCK)					

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	18	
/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647	31 May 2022	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	none

<i>Issue Classification</i> 	Application/Control No. 16/613,203	Applicant(s)/Patent Under Reexamination SAITO et al.
	Examiner ROBERT S LANDSMAN	Art Unit 1647

☒ Claims renumbered in the same order as presented by applicant ☐ CPA ☐ T.D. ☐ R.1.47															
CLAIMS															
Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original	Final	Original
	1		10												
	2		11												
	3		12												
	4		13												
	5		24												
	6		25												
	7		26												
	8		27												
	9		28												

NONE		Total Claims Allowed:	
(Assistant Examiner)	(Date)	18	
/ROBERT S LANDSMAN/ Primary Examiner, Art Unit 1647	31 May 2022	O.G. Print Claim(s)	O.G. Print Figure
(Primary Examiner)	(Date)	1	none

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: May 19, 2022 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	16/613,203
				Filing Date	5/14/2018
				First Named Inventor	Atsuko SAITO
				Art Unit	1647
				Examiner Name	LANDSMAN, ROBERT S
Sheet	1	of	1	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
		Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)				

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	E1	ALTSHULER, E.P. ET AL., "Generation of Recombinant Antibodies and Means for Increasing Their Affinity," Advances in Chemistry, vol. 50, pp.203-258.	✓
	E2	JARILIN, A.A., Fundamentals of Immunology: Textbook - Publishing House "Meditsina," 1999, 608c., p.171-173.	✓
	E3	Office Action issued in corresponding Mexican Patent Application No. MX/a/2019/013597 dated March 4, 2022.	✓
	E4	Office Action issued in corresponding Russian Patent Application No. 2019141268 dated February 22, 2022.	✓
	E5	SINGER, M. and BERG, P., Genes and Genomes: 2 volumes, vol 1, translation from English M.: Mir, 1998. - 373p., ill.; pp.63-64.	✓
	E6	UNIPROT: locus CADH9_MOUSE, access P70407, 25.11.2002, Accessed via the Internet at: https://www.uniprot.org/uniprot/P70407 .	

ALL REFERENCES CONSIDERED EXCEPT WHERE LINED THROUGH. /R.S.L./

Examiner Signature	/ROBERT S LANDSMAN/	Date Considered	05/31/2022
--------------------	---------------------	-----------------	------------

To: ipdocketing@foley.com,,
From: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Cc: PAIR_eOfficeAction@uspto.gov
Subject: Private PAIR Correspondence Notification for Customer Number 22428

Jun 03, 2022 04:44:19 AM

Dear PAIR Customer:

FOLEY & LARDNER LLP
3000 K STREET N.W.
SUITE 600
WASHINGTON, DC 20007-5109
UNITED STATES

The following USPTO patent application(s) associated with your Customer Number, 22428 , have new outgoing correspondence. This correspondence is now available for viewing in Private PAIR.

The official date of notification of the outgoing correspondence will be indicated on the form PTOL-90 accompanying the correspondence.

Disclaimer:

The list of documents shown below is provided as a courtesy and is not part of the official file wrapper. The content of the images shown in PAIR is the official record.

Application	Document	Mailroom Date	Attorney Docket No.
16613203	NOA	06/03/2022	098065-0249
	1449	06/03/2022	098065-0249

To view your correspondence online or update your email addresses, please visit us anytime at <https://sportal.uspto.gov/secure/myportal/privatepair>.

If you have any questions, please email the Electronic Business Center (EBC) at EBC@uspto.gov with 'e-Office Action' on the subject line or call 1-866-217-9197 during the following hours:

Monday - Friday 6:00 a.m. to 12:00 a.m.

Thank you for prompt attention to this notice,

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE
PATENT APPLICATION INFORMATION RETRIEVAL SYSTEM

PTO/SB/08 (modified)

Substitute for form 1449/PTO				Complete if Known	
INFORMATION DISCLOSURE STATEMENT BY APPLICANT Date Submitted: July 18, 2022 <i>(use as many sheets as necessary)</i>				Application Number	
				16/613,203	
				Filing Date	
				5/14/2018	
				First Named Inventor	
		Atsuko SAITO			
Art Unit		1647			
Examiner Name		LANDSMAN, ROBERT S			
Sheet	1	of	1	Attorney Docket Number	098065-0249

U.S. PATENT DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Document Number Number-Kind Code ² (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

UNPUBLISHED U.S. PATENT APPLICATION DOCUMENTS					
Examiner Initials*	Cite No. ¹	U.S. Patent Application Document Serial Number-Kind Code ² (if known)	Filing Date of Cited Document MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Document	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear

FOREIGN PATENT DOCUMENTS						
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Foreign Patent Document Country Code ³ Number ⁴ Kind Code ⁵ (if known)	Publication Date MM-DD-YYYY	Name of Patentee or Applicant of Cited Documents	Pages, Columns, Lines, Where Relevant Passages or Relevant Figures Appear	T ⁶
	F1	TW-201613643-A	04-16-2016	NOVARTIS AG	=WO 2016/024195A1	Abs.

NON PATENT LITERATURE DOCUMENTS			
Examiner Initials*	Cite No. ¹	Include name of the author (in CAPITAL LETTERS), title of the article (when appropriate), title of the item (book, magazine, journal, serial, symposium, catalog, etc.) date, page(s), volume-issue number(s), publisher, city and/or country where published.	T ⁶
	F2	Office Action and Search Report issued in corresponding Taiwanese Patent Application No. 107116035 dated May 10, 2022.	✓

Examiner Signature		Date Considered	
---------------------------	--	------------------------	--

201613643



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201613643 A

(43)公開日：中華民國 105 (2016) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：104126127

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 08 月 11 日

(51)Int. Cl. : A61K39/395 (2006.01)

A61K47/48 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/08/12 美國

62/036,382

(71)申請人：諾華公司 (瑞士) NOVARTIS AG (CH)

瑞士

(72)發明人：畢雅魯恰 卡爾 BIALUCHA, CARL (DE)；柯林斯 史考特 COLLINS, SCOTT (GB)；杜爾 克萊蒙斯 (DE)；美亞 馬修 約翰 MEYER, MATTHEW JOHN (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：15 共 401 頁

(54)名稱

抗 C D H 6 抗體藥結合物

ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

(57)摘要

本發明係關於抗 CDH6 抗體、抗體片段、抗體藥結合物及其用於治療癌症的用途。

The present invention relates to anti-CDH6 antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

指定代表圖：

201613643

TW 201613643 A

藉由FACS測定CDH6 IgG針對OVCAR3細胞的細胞結合EC50

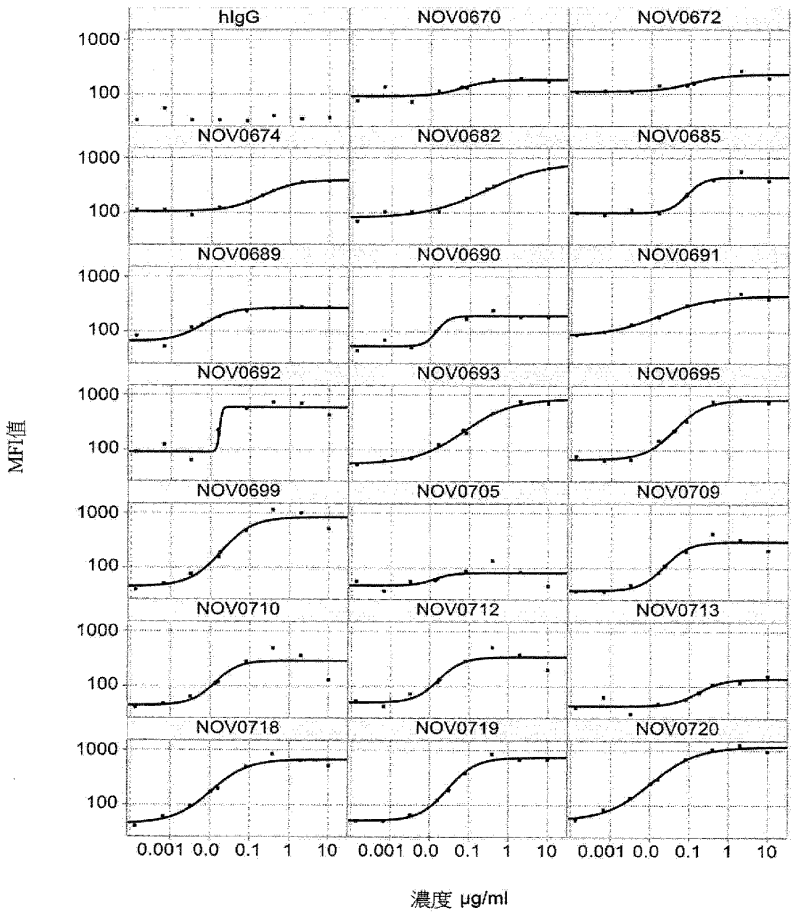


圖1

201613643

201613643**發明摘要**

※ 申請案號：104 126 127

※ 申請日：104. 8. 11.

※IPC 分類：

A61K 39/45 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

【發明名稱】

抗CDH6抗體藥結合物

ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【中文】

本發明係關於抗CDH6抗體、抗體片段、抗體藥結合物及其用於治療癌症的用途。

【英文】

The present invention relates to anti-CDH6 antibodies, antibody fragments, antibody drug conjugates, and their uses for the treatment of cancer.

201613643

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（1）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）

201613643

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

抗CDH6抗體藥結合物

ANTI-CDH6 ANTIBODY DRUG CONJUGATES

【技術領域】

本發明係關於抗CDH6抗體、抗體片段、抗體藥結合物及其用於治療癌症的用途。

【先前技術】

鈣黏素為涉及細胞-細胞接觸的細胞黏附分子家族。鈣黏素家族存在超過30種鈣黏素分子且由具有個別結合特異性的亞類組成。典型鈣黏素已經充分研究，諸如上皮(E)鈣黏素、神經(N)鈣黏素及胎盤(p)鈣黏素，其在諸如上皮之組織發育及維持方面起主要作用。鈣黏素家族亦已根據其胺基酸相似性加以分類，從而將鈣黏素分成兩類：I型及II型。於是存在組織特異性鈣黏素，諸如鈣黏素-6 (CDH6)。

CDH6首次選殖且表徵於1995年(Shimoyama等人, Cancer Res. 1995: 55 (10)2206-2211)。Shimoyama所分離之CDH6 cDNA為4315個核苷酸且編碼790個胺基酸之鈣黏素蛋白質且與大鼠K-鈣黏素展現97%同源性(Shimoyama, 同上)。CDH6為具有五個細胞外鈣黏素重複、跨膜域及細胞質域的II型鈣黏素。探測正常組織表現時，在腦、小腦及腎臟中偵測到CDH6，而在肺、胰臟及胃黏膜中之表現較弱。在神經系統中，發現CDH6可區分聽覺系統及軀體感覺系統(Inoue等人, Mol. Cell Neuro. 2008: (39) 95-104)。已證明CDH6由眼中之視網膜神經節細胞(RGC)亞群表現，此亞群負責諸如亮度、移動方向或邊緣之視力品質(Osterhout等人, Neuron 2011: 71(4)632-639)。在CDH6

201613643

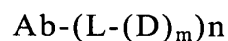
基因剔除小鼠中，CDH6之缺乏導致軸突靶向喪失。CDH6突變型軸突適當地拉長且適當地導向其標靶，但接著生長通過且超過其接點(Osterhout，同上)。在另一研究中，CDH6基因剔除小鼠在發聲方面展現缺陷(Nakagawa等人, PLOS 2012: 7(11) e49233)。

轉向其在癌症中之表現，選殖來自肝細胞癌細胞株的CDH6 cDNA，CDH6 cDNA為其可能涉及此類型癌症的早期指示(Shimoyama，同上)。早期工作發現CDH6表現於若干種肝癌細胞株中，但不表現於正常肝臟中。在後來工作中，研究組分析了216位腎細胞癌患者且發現CDH6表現與此類型癌症相關(Paul等人, J Urology 2004 (171): 97-101)。Shimazui發現，具有CDH6表現且缺乏E-鈣黏素表現的腎細胞癌患者具有不良預後(Shimazui等人, Clin. Cancer Res. 1998 (4): 2419-2424)。亦發現CDH6為TGF-B標靶且在甲狀腺癌中起作用(Sancisi等人, PLoS One 2013; 8(9): e75489)。最後，CDH6顯示為卵巢癌之生物標記(Kobel等人, PLoS One 2008 5(12): e232)。

抗體藥結合物(「ADC」)已用於局部遞送細胞毒性劑來治療癌症(參見例如Lambert, Curr. Opinion In Pharmacology 5:543-549, 2005)。ADC允許藥物部分實現靶向遞送，從而可達成最大功效、最小毒性。隨著更多ADC顯示有前景之臨床結果，開發新穎療法用於癌症療法的需求增加。

【發明內容】

本發明係關於下式之抗體藥結合物：



或其醫藥學上可接受之鹽；其中

Ab為特異性結合至人類CDH6抗原決定基的抗體或其抗原結合片段；

L為連接子；

201613643

D為藥物部分；

m為整數1至8；及

n為整數1至10。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該n為3或4。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或其抗原結合片段特異性結合CDH6之胞外域(SEQ ID NO: 4)。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或抗原結合片段特異性結合至人類CDH6之位於SEQ ID NO:443之抗原決定基。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

(i)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 164之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 165之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 166之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 167之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 168之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 169之HCDR3；

(ii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 154之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 155之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 156之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 157之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 158之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 159之HCDR3；

(iii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 14之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 15之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 16之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 17之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 18之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 19之HCDR3；

(iv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 24之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 25之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 26之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 27之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 28之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 29之HCDR3；

201613643

(v)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 34之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 35之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 36之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 37之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 38之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 39之HCDR3；

(vi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 44之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 45之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 46之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 47之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 48之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 49之HCDR3；

(vii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 54之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 55之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 56之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 57之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 58之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 59之HCDR3；

(viii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 64之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 65之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 66之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 67之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 68之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 69之HCDR3；

(ix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 74之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 75之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 76之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 77之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 78之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 79之HCDR3；

(x)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 84之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 85之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 86之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 87之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 88之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 89之HCDR3；

(xi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 94之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 95之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 96之

201613643

LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 97之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 98之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 99之HCDR3；

(xii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 104之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 105之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 106之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 107之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 108之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 109之HCDR3；

(xiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 114之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 115之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 116之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 117之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 118之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 119之HCDR3；

(xiv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 124之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 125之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 126之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 127之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 128之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 129之HCDR3；

(xv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 134之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 135之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 136之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 137之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 138之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 139之HCDR3；

(xvi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 144之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 145之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 146之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 147之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 148之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 149之HCDR3；

(xvii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 174之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 175之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 176之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 177之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 178之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 179之HCDR3；

201613643

(xviii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 184之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 185之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 186之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 187之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 188之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 189之HCDR3；

(xix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 194之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 195之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 196之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 197之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 198之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 199之HCDR3；

(xx)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 204之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 205之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 206之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 207之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 208之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 209之HCDR3；

(xxi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 214之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 215之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 216之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 217之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 218之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 219之HCDR3；

(xxii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 224之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 225之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 226之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 227之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 228之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 229之HCDR3；或

(xxiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 234之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 235之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 236之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 237之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 238之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 239之HCDR3。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中CDR內之至少一個胺基酸經表5及/或表6中之另一抗CDH6抗體之相應CDR的相應殘基取

201613643

代。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中CDR內之一或兩個胺基酸已經修飾、缺失或取代。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

(i)包含SEQ ID NO: 170之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 171之輕鏈可變區(vL)；

(ii)包含SEQ ID NO: 160之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 161之輕鏈可變區(vL)；

(iii)包含SEQ ID NO: 20之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區(vL)；

(iv)包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 31之輕鏈可變區(vL)；

(v)包含SEQ ID NO: 40之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 41之輕鏈可變區(vL)；

(vi)包含SEQ ID NO: 50之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 51之輕鏈可變區(vL)；

(vii)包含SEQ ID NO: 60之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 61之輕鏈可變區(vL)；

(viii)包含SEQ ID NO: 70之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 71之輕鏈可變區(vL)；

(ix)包含SEQ ID NO: 80之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 81之輕鏈可變區(vL)；

(x)包含SEQ ID NO: 90之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 91之輕鏈可變區(vL)；

(xi)包含SEQ ID NO: 100之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO:

201613643

101之輕鏈可變區(vL)；

(xii)包含SEQ ID NO: 110之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 111之輕鏈可變區(vL)；

(xiii)包含SEQ ID NO: 120之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 121之輕鏈可變區(vL)；

(xiv)包含SEQ ID NO: 130之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 131之輕鏈可變區(vL)；

(xv)包含SEQ ID NO: 140之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 141之輕鏈可變區(vL)；

(xvi)包含SEQ ID NO: 150之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 151之輕鏈可變區(vL)；

(xvii)包含SEQ ID NO: 180之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 181之輕鏈可變區(vL)；

(xviii)包含SEQ ID NO: 190之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 191之輕鏈可變區(vL)；

(xix)包含SEQ ID NO: 200之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 201之輕鏈可變區(vL)；

(xx)包含SEQ ID NO: 210之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 211之輕鏈可變區(vL)；

(xxi)包含SEQ ID NO: 220之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 221之輕鏈可變區(vL)；

(xxii)包含SEQ ID NO: 230之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 231之輕鏈可變區(vL)；或

(xxiii)包含SEQ ID NO: 240之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 241之輕鏈可變區(vL)；

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其在輕鏈可變區或重鏈

201613643

可變區上保持至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類工程化抗體、人類抗體、單鏈抗體(scFv)或抗體片段。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該連接子選自由以下組成之群：可裂解連接子、不可裂解連接子、親水性連接子、預帶電連接子及基於二羧酸之連接子。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該連接子衍生自選自由以下組成之群的交聯試劑：N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)、N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-丁二醯亞胺基碘乙酸酯(SIA)、N-丁二醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、N-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己甲酸酯(SMCC)、N-磺基丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(磺基-SMCC)或2,5-二側氧基吡咯啉-1-基17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸酯(CX1-1)。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該連接子衍生自N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該藥物部分(D)係選自由以下組成之群：類美登素(maytansinoid)、V-ATP酶抑制劑、促細胞凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧瑞他汀(auristatin)、海兔毒素(dolastatin)、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白CRM1

201613643

之抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷化劑、DNA嵌入劑、DNA小凹槽結合劑及DHFR抑制劑。

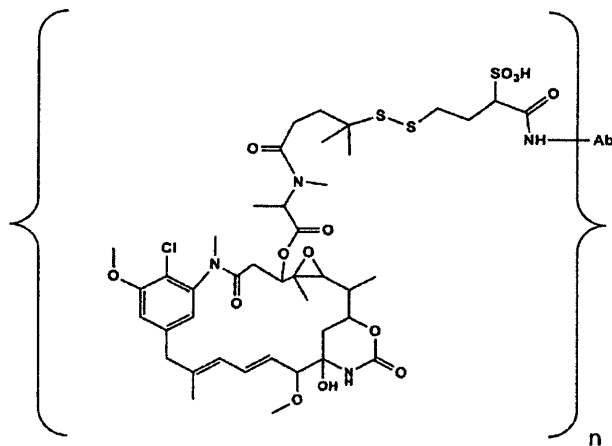
根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該藥物部分為類美登素。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該類美登素為N(2')-去乙醯基-N2-(4-巰基-4-甲基-1-側氧基戊基)-美登素(DM4)或N(2')-去乙醯基-N(2')-(3-巰基-1-側氧基丙基)-美登素(DM1)。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其與另一治療劑組合。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其與表18中所列之治療劑組合。

一種具有下式之抗體藥結合物：



Ab-磺基-SPDB-DM4

或其醫藥學上可接受之鹽，其中：

Ab為抗體或其抗原結合片段，其特異性結合至人類CDH6，及至少n數目個一級胺；且n為整數1至10。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或抗原結合

201613643

片段在(SEQ ID NO: 4)處特異性結合至人類CDH6之抗原決定基。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或其抗原結合片段在(SEQ ID NO: 443)處特異性結合人類CDH6。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該Ab為包含以下之抗體或其抗原結合片段：

(i)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 164之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 165之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 166之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 167之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 168之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 169之HCDR3；

(ii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 154之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 155之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 156之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 157之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 158之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 159之HCDR3；

(iii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 14之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 15之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 16之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 17之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 18之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 19之HCDR3；

(iv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 24之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 25之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 26之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 27之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 28之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 29之HCDR3；

(v)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 34之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 35之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 36之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 37之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 38之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 39之HCDR3；

(vi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 44之LCDR1 (CDR-互補

201613643

決定區)、(b) SEQ ID NO: 45之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 46之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 47之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 48之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 49之HCDR3；

(vii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 54之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 55之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 56之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 57之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 58之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 59之HCDR3；

(viii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 64之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 65之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 66之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 67之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 68之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 69之HCDR3；

(ix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 74之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 75之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 76之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 77之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 78之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 79之HCDR3；

(x)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 84之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 85之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 86之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 87之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 88之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 89之HCDR3；

(xi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 94之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 95之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 96之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 97之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 98之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 99之HCDR3；

(xii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 104之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 105之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 106之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 107之HCDR1、(e)

201613643

SEQ ID NO: 108之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 109之HCDR3；

(xiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 114之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 115之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 116之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 117之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 118之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 119之HCDR3；

(xiv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 124之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 125之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 126之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 127之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 128之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 129之HCDR3；

(xv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 134之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 135之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 136之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 137之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 138之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 139之HCDR3；

(xvi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 144之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 145之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 146之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 147之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 148之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 149之HCDR3；

(xvii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 174之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 175之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 176之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 177之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 178之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 179之HCDR3；

(xviii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 184之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 185之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 186之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 187之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 188之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 189之HCDR3；

(xix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 194之LCDR1 (CDR-互

201613643

補決定區)、(b) SEQ ID NO: 195之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 196之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 197之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 198之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 199之HCDR3；

(xx)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 204之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 205之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 206之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 207之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 208之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 209之HCDR3；

(xxi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 214之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 215之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 216之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 217之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 218之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 219之HCDR3；

(xxii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 224之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 225之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 226之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 227之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 228之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 229之HCDR3；或

(xxiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 234之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 235之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 236之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 237之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 238之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 239之HCDR3。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中CDR內之至少一個胺基酸經表5及/或表6中之另一抗CDH6抗體之相應CDR的相應殘基取代。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中CDR內之一或兩個胺基酸已經修飾、缺失或取代。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

201613643

(i)包含SEQ ID NO: 170之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 171之輕鏈可變區(vL)；

(ii)包含SEQ ID NO: 160之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 161之輕鏈可變區(vL)；

(iii)包含SEQ ID NO: 20之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區(vL)；

(iv)包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 31之輕鏈可變區(vL)；

(v)包含SEQ ID NO: 40之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 41之輕鏈可變區(vL)；

(vi)包含SEQ ID NO: 50之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 51之輕鏈可變區(vL)；

(vii)包含SEQ ID NO: 60之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 61之輕鏈可變區(vL)；

(viii)包含SEQ ID NO: 70之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 71之輕鏈可變區(vL)；

(ix)包含SEQ ID NO: 80之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 81之輕鏈可變區(vL)；

(x)包含SEQ ID NO: 90之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 91之輕鏈可變區(vL)；

(xi)包含SEQ ID NO: 100之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 101之輕鏈可變區(vL)；

(xii)包含SEQ ID NO: 110之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 111之輕鏈可變區(vL)；

(xiii)包含SEQ ID NO: 120之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 121之輕鏈可變區(vL)；

201613643

(xiv)包含SEQ ID NO: 130之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 131之輕鏈可變區(vL)；

(xv)包含SEQ ID NO: 140之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 141之輕鏈可變區(vL)；

(xvi)包含SEQ ID NO: 150之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 151之輕鏈可變區(vL)；

(xvii)包含SEQ ID NO: 180之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 181之輕鏈可變區(vL)；

(xviii)包含SEQ ID NO: 190之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 191之輕鏈可變區(vL)；

(xix)包含SEQ ID NO: 200之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 201之輕鏈可變區(vL)；

(xx)包含SEQ ID NO: 210之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 211之輕鏈可變區(vL)；

(xxi)包含SEQ ID NO: 220之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 221之輕鏈可變區(vL)；

(xxii)包含SEQ ID NO: 230之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 231之輕鏈可變區(vL)；或

(xxiii)包含SEQ ID NO: 240之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 241之輕鏈可變區(vL)。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其在輕鏈可變區或重鏈可變區上保持至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該抗體為單株抗體、嵌合抗體、人類化抗體、人類工程化抗體、人類抗體、單鏈抗體(scFv)或抗體片段。

201613643

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該 n 為整數2至8。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其中該 n 為整數3至4。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其與另一治療劑組合。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其與表18中所列之治療劑組合。

一種醫藥組合物，其包含根據任一前述實施例之抗體藥結合物及醫藥學上可接受之載劑。

根據任一前述實施例之醫藥組合物，其中該組合物係以凍乾物形式製備。

根據任一前述實施例之醫藥組合物，其中該凍乾物包含根據任一前述實施例之抗體藥結合物、丁二酸鈉及聚山梨醇酯20。

一種治療有需要之患者之CDH6陽性癌症的方法，包含向該患者投與根據任一前述實施例之抗體藥結合物，或根據任一前述實施例之醫藥組合物。

根據任一前述實施例之方法，其中該癌症選自由卵巢癌、腎癌、肝癌及甲狀腺癌組成之群。

根據任一前述實施例之方法，其中抗體藥結合物或醫藥組合物係與另一治療劑組合投與。

根據任一前述實施例之方法，其中抗體藥結合物或醫藥組合物係與表18中所列之治療劑組合投與。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其用作藥物。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，或根據任一前述實施例之醫藥組合物，其用於治療CDH6陽性癌症。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其與另一治療劑組合投與。

根據任一前述實施例之抗體藥結合物，其與表18中所列之治療

201613643

劑組合投與。

一種核酸，其編碼根據任一前述實施例之抗體或抗原結合片段。

一種載體，其包含根據任一前述實施例之核酸。

一種宿主細胞，其包含根據任一前述實施例之載體。

一種用於產生抗體或抗原結合片段的方法，包含培養根據任一前述實施例之宿主細胞及自培養物中回收該抗體。

一種用於產生抗CDH6抗體藥結合物的方法，該方法包含：

(a)以化學方式使N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)與藥物部分DM-4連接；

(b)使該連接子-藥物與自細胞培養物中回收之根據任一前述實施例之抗體結合；及

(c)純化該抗體藥結合物。

根據任一前述實施例製得的抗體藥結合物，其具有約3.5之平均類美登素與抗體比率(MAR)，如用UV分光光度計所量測。

一種抗體或其抗原結合片段，其包含：

(i)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 164之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 165之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 166之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 167之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 168之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 169之HCDR3；

(ii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 154之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 155之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 156之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 157之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 158之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 159之HCDR3；

(iii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 14之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 15之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 16之

201613643

LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 17之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 18之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 19之HCDR3；

(iv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 24之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 25之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 26之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 27之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 28之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 29之HCDR3；

(v)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 34之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 35之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 36之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 37之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 38之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 39之HCDR3；

(vi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 44之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 45之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 46之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 47之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 48之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 49之HCDR3；

(vii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 54之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 55之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 56之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 57之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 58之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 59之HCDR3；

(viii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 64之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 65之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 66之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 67之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 68之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 69之HCDR3；

(ix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 74之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 75之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 76之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 77之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 78之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 79之HCDR3；

201613643

(x)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 84之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 85之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 86之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 87之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 88之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 89之HCDR3；

(xi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 94之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 95之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 96之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 97之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 98之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 99之HCDR3；

(xii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 104之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 105之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 106之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 107之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 108之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 109之HCDR3；

(xiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 114之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 115之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 116之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 117之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 118之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 119之HCDR3；

(xiv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 124之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 125之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 126之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 127之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 128之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 129之HCDR3；

(xv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 134之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 135之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 136之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 137之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 138之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 139之HCDR3；

(xvi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 144之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 145之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 146之

201613643

LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 147之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 148之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 149之HCDR3；

(xvii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 174之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 175之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 176之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 177之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 178之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 179之HCDR3；

(xviii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 184之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 185之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 186之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 187之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 188之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 189之HCDR3；

(xix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 194之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 195之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 196之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 197之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 198之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 199之HCDR3；

(xx)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 204之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 205之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 206之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 207之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 208之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 209之HCDR3；

(xxi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 214之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 215之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 216之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 217之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 218之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 219之HCDR3；

(xxii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 224之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 225之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 226之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 227之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 228之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 229之HCDR3；或

201613643

(xxiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 234之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 235之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 236之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 237之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 238之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 239之HCDR3。

根據任一前述實施例之抗體或其抗原結合片段，其中CDR內之至少一個胺基酸經表5及/或表6中之另一抗CDH6抗體之相應CDR的相應殘基取代。

根據任一前述實施例之抗體或其抗原結合片段，其中該抗體或其抗原結合片段包含：

(i)包含SEQ ID NO: 170之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 171之輕鏈可變區(vL)；

(ii)包含SEQ ID NO: 160之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 161之輕鏈可變區(vL)；

(iii)包含SEQ ID NO: 20之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 21之輕鏈可變區(vL)；

(iv)包含SEQ ID NO: 30之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 31之輕鏈可變區(vL)；

(v)包含SEQ ID NO: 40之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 41之輕鏈可變區(vL)；

(vi)包含SEQ ID NO: 50之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 51之輕鏈可變區(vL)；

(vii)包含SEQ ID NO: 60之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 61之輕鏈可變區(vL)；

(viii)包含SEQ ID NO: 70之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 71之輕鏈可變區(vL)；

(ix)包含SEQ ID NO: 80之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 81

201613643

之輕鏈可變區(vL)；

(x)包含SEQ ID NO: 90之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 91之輕鏈可變區(vL)；

(xi)包含SEQ ID NO: 100之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 101之輕鏈可變區(vL)；

(xii)包含SEQ ID NO: 110之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 111之輕鏈可變區(vL)；

(xiii)包含SEQ ID NO: 120之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 121之輕鏈可變區(vL)；

(xiv)包含SEQ ID NO: 130之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 131之輕鏈可變區(vL)；

(xv)包含SEQ ID NO: 140之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 141之輕鏈可變區(vL)；

(xvi)包含SEQ ID NO: 150之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 151之輕鏈可變區(vL)；

(xvii)包含SEQ ID NO: 180之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 181之輕鏈可變區(vL)；

(xviii)包含SEQ ID NO: 190之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 191之輕鏈可變區(vL)；

(xix)包含SEQ ID NO: 200之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 201之輕鏈可變區(vL)；

(xx)包含SEQ ID NO: 210之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 211之輕鏈可變區(vL)；

(xxi)包含SEQ ID NO: 220之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 221之輕鏈可變區(vL)；

(xxii)包含SEQ ID NO: 230之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO:

201613643

231之輕鏈可變區(vL)；或

(xxiii)包含SEQ ID NO: 240之重鏈可變區(vH)及包含SEQ ID NO: 241之輕鏈可變區(vL)。

一種經標記之包含根據任一前述實施例之抗體或其抗原結合片段的診斷性試劑。

根據任一前述實施例之診斷性試劑，其中該標記選自由以下組成之群：放射性標記、螢光團、發色團、成像劑及金屬離子。

定義

除非另外說明，否則如本文中所用之以下術語及短語意欲具有以下含義：

術語「烷基」係指具有特定數目個碳原子的單價飽和烴鏈。舉例而言，C₁₋₆烷基係指具有1至6個碳原子的烷基。烷基可為直鏈或分支鏈。代表性分支鏈烷基具有一個、兩個或三個分支鏈。烷基之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基(正丙基及異丙基)、丁基(正丁基、異丁基、第二丁基及第三丁基)、戊基(正戊基、異戊基及新戊基)及己基。

如本文所用，術語「抗體」係指免疫球蛋白家族中之多肽，其能夠非共價、可逆地且以特異性方式結合相應抗原。舉例而言，天然存在之IgG抗體為包含至少兩條重(H)鏈及兩條輕(L)鏈經二硫鍵互連而成的四聚體。各重鏈包含重鏈可變區(本文縮寫為VH)及重鏈恆定區。重鏈恆定區包含三個域：CH1、CH2及CH3。各輕鏈包含輕鏈可變區(本文中縮寫為VL)及輕鏈恆定區。輕鏈恆定區包含一個域CL。VH及VL區可進一步再分成高變區，稱為互補決定區(CDR)，其中散置有更保守的區域，稱為構架區(FR)。各VH及VL由自胺基端至羧基端依以下順序排列之3個CDR及4個FR組成：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重鏈及輕鏈之可變區含有與抗原相互作用

201613643

用之結合域。抗體恆定區可介導免疫球蛋白結合至宿主組織或因子，包括免疫系統之多種細胞(例如效應細胞)及經典補體系統之第一組分(C1q)。

術語「抗體」包括(但不限於)單株抗體、人類抗體、人類化抗體、駱駝科抗體、嵌合抗體及抗個體基因型(抗Id)抗體(包括例如針對本發明抗體的抗Id抗體)。抗體可具有任何同型/類別(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及IgY)或子類(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1及IgA2)。

「互補決定域」或「互補決定區」(「CDR」)可互換地指VL及VH之高變區。CDR為具有針對此靶蛋白之特異性的抗體鏈之靶蛋白結合位點。各人類VL或VH中存在三個CDR (CDR1-3，自N末端依序編號)，佔可變域之約15-20%。CDR可藉由其區域及次序提及。舉例而言，「VHCDR1」或「HCDR1」均指重鏈可變區之第一CDR。CDR在結構上與靶蛋白之抗原決定基互補且因此直接促成結合特異性。VL或VH之剩餘區段(所謂的構架區)的胺基酸序列展現較少的變異(Kuby, Immunology, 第4版, 第4章. W.H. Freeman & Co., New York, 2000)。

CDR及構架區之位置可使用此項技術中熟知的各種定義確定，例如Kabat、Chothia及AbM (參見例如Johnson等人, Nucleic Acids Res., 29:205-206 (2001)；Chothia及Lesk, J. Mol. Biol., 196:901-917 (1987)；Chothia等人, Nature, 342:877-883 (1989)；Chothia等人, J. Mol. Biol., 227:799-817 (1992)；Al-Lazikani等人, J.Mol.Biol., 273:927-748 (1997))。抗原結合位點之定義亦描述於以下文獻中：Ruiz等人, Nucleic Acids Res., 28:219-221 (2000)；及Lefranc, M.P., Nucleic Acids Res., 29:207-209 (2001)；MacCallum等人, J. Mol. Biol., 262:732-745 (1996)；及Martin等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86:9268-9272 (1989)；Martin等人, Methods Enzymol., 203:121-153

201613643

(1991)；及 Rees 等人，In Sternberg M.J.E. (編)，Protein Structure Prediction, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996)。

輕鏈與重鏈均分成結構及功能同源的區域。術語「恆定」和「可變」係依功能使用。就此而言，應瞭解輕鏈(VL)與重鏈(VH)部分之可變域決定抗原識別及特異性。反之，輕鏈(CL)及重鏈(CH1、CH2或CH3)之恆定域賦予重要生物特性，諸如分泌、經胎盤遷移、Fc受體結合、補體結合及其類似特性。根據約定，恆定區域之編號隨著其距離抗體之抗原結合位點或胺基末端愈遠而增大。N末端為可變區且C末端為恆定區；CH3及CL域實際上分別包含重鏈及輕鏈之羧基末端域。

如本文所用，術語「抗原結合片段」係指保持與抗原之抗原決定基特異性相互作用(例如結合、空間位阻、穩定/去穩定化、空間分佈)之能力的抗體之一或多個部分。結合片段之實例包括(但不限於)單鏈Fvs (scFv)、二硫鏈連接之Fvs (sdFv)、Fab片段、F(ab')片段、由VL、VH、CL及CH1域組成之單價片段；F(ab)2片段、包含兩個Fab片段經位於鉸鏈區之二硫橋鍵連接而成的二價片段；由VH及CH1域組成的Fd片段；由抗體之單臂之VL及VH域組成的Fv片段；dAb片段(Ward等人, Nature 341: 544-546, 1989)，其由VH域組成；及經分離之互補決定區(CDR)，或抗體之其他抗原決定基結合片段。

此外，儘管Fv片段之兩個域(VL及VH)由各別基因編碼，然而其可使用重組方法、藉由合成連接子連接，該合成連接子能夠使其以單一蛋白質鏈形式產生，其中VL與VH區配對而形成單價分子(稱為單鏈Fv (「scFv」)；參見例如Bird等人, Science 242:423-426, 1988；及Huston等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 85:5879-5883, 1988)。亦希望此類單鏈抗體涵蓋於術語「抗原結合片段」內。此等抗原結合片段係使用熟習此項技術者已知之習知技術獲得，且以與完整抗體相同之方式來

201613643

篩選片段供使用。

抗原結合片段亦可併入單域抗體、最大抗體、微型抗體、奈米抗體、胞內抗體、雙功能抗體、三功能抗體、四功能抗體、v-NAR及雙-scFv中(參見例如Hollinger及Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136, 2005)。抗原結合片段可移植至基於多肽(諸如纖維結合蛋白III型(Fn3))之骨架中(參見美國專利第6,703,199號，其描述纖維結合蛋白多肽單功能抗體)。

抗原結合片段可併入包含一對串聯Fv片段(VH-CH1-VH-CH1)之單鏈分子中，該等Fv片段連同互補輕鏈多肽形成一對抗原結合區(Zapata等人, *Protein Eng.* 8:1057-1062, 1995；及美國專利第5,641,870號)。

如本文所用，術語「單株抗體」或「單株抗體組合物」係指多肽，包括具有實質上一致胺基酸序列或源於相同基因來源的抗體及抗原結合片段。此術語亦包括單一分子組成之抗體分子之製劑。單株抗體組合物對於特定抗原決定基顯示單一結合特異性及親和力。

如本文所用，術語「人類抗體」包括包括可變區中之構架與CDR區均源於人源序列的抗體。此外，若抗體含有恆定區，則該恆定區亦源於此等人類序列，例如人類生殖系序列，或人類生殖系序列或抗體之突變型，其含有源於人類構架序列分析之共同構架序列，例如如Knappik等人, *J. Mol. Biol.* 296: 57-86, 2000中所述)。

本發明之人類抗體可包括不由人類序列編碼的胺基酸殘基(例如藉由活體外隨機或位點特異性突變誘發或藉由活體內體細胞突變引入的突變，或促進穩定性或製造的保守性取代)。

如本文所用，術語「識別」係指抗體或其抗原結合片段尋找其抗原決定基且與其抗原決定基相互作用(例如結合)，不論該抗原決定基為線性或構形抗原決定基。術語「抗原決定基」係指抗原上之供本

201613643

發明之抗體或抗原結合片段特異性結合的位點。抗原決定基可由鄰接胺基酸或非鄰接胺基酸形成，此等胺基酸因蛋白質之三級摺疊而毗鄰。由鄰接胺基酸形成的抗原決定基在暴露於變性溶劑後典型地保留，而藉由三級摺疊形成的抗原決定基在變性溶劑處理後典型地消失。抗原決定基典型地以獨特的空間構形包括至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15個胺基酸。測定抗原決定基之空間構形的方法包括此項技術中之技藝，例如x射線結晶學及2維核磁共振(參見例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, 第66卷, G. E. Morris編(1996))。「互補位」為抗體之一部分，其識別抗原之抗原決定基。

片語「特異性結合」或「選擇性結合」當在描述抗原(例如蛋白質)與抗體、抗體片段或抗體源結合劑之間相互作用之上下文中使用時，係指一種結合反應，其決定了抗原在一群非均質蛋白質及其他生物製劑(例如生物樣品，例如血液、血清、血漿或組織樣品)中的存在。因此，在某些指定的免疫分析條件下，具有特定結合特異性的抗體或結合劑對特定抗原的結合為背景的至少兩倍且不以顯著量實質上結合至存在於樣品中的其他抗原。在一個態樣中，在指定的免疫分析條件下，具有特定結合特異性的抗體或結合劑對特定抗原的結合為背景的至少十(10)倍且不以顯著量實質上結合至存在於樣品中的其他抗原。在此等條件下特異性結合至抗體或結合劑可能需要根據針對特定蛋白質之特異性來選擇抗體或藥劑。需要或適當時，可藉由減除與來自其他物種(例如小鼠或大鼠)或其他亞型之分子交叉反應的抗體來達成此選擇。或者，在一些態樣中，選擇與某些所要分子交叉反應的抗體或抗體片段。

如本文所用，術語「親和力」係指抗體與抗原之間在單一抗原性位點處的相互作用力。在各抗原位點內，抗體「臂」之可變區經由

201613643

弱非共價力與抗原在多個位點處相互作用；相互作用愈大，親和力愈強。

術語「分離抗體」係指一種抗體，其實質上不含具有不同抗原特異性之其他抗體。然而，特異性結合至一種抗原的分離抗體可與其他抗原具有交叉反應性。另外，分離抗體可實質上不含其他細胞材料及/或化學物質。

術語「相應人類生殖系序列」係指相較於由人類生殖系免疫球蛋白可變區序列編碼的所有其他已知可變區胺基酸序列，編碼人類可變區胺基酸序列或子序列的核酸序列與參考可變區胺基酸序列或子序列共有所測定最高胺基酸序列一致性。相應人類生殖系序列亦可指，相較於所評估之所有其他可變區胺基酸序列，與參考可變區胺基酸序列或子序列具有最高胺基酸序列一致性的人類可變區胺基酸序列或子序列。相應人類生殖系序列可為單獨構架區、單獨互補決定區、構架及互補決定區、可變區段(如上文所定義)，或包含可變區之序列或子序列之其他組合。序列一致性可使用本文所述之方法測定，例如使用BLAST、ALIGN或此項技術中已知的另一種比對演算法比對兩個序列。相應人類生殖系核酸或胺基酸序列可與參考可變區核酸或胺基酸序列具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

多種免疫分析形式可用於選擇與特定蛋白質發生特異性免疫反應的抗體。舉例而言，固相ELISA免疫分析常規地用於選擇與蛋白質發生特異性免疫反應的抗體(關於可用於測定特異性免疫反應性的免疫分析形式及條件之說明，參見例如Harlow及Lane, *Using Antibodies, A Laboratory Manual* (1998))。典型地，特異性或選擇性結合反應產生的信號為背景信號的至少兩倍且更典型地，為背景信號的至少10至100倍。

201613643

術語「平衡解離常數(KD, M)」係指解離速率常數(kd, 時間⁻¹)除以結合速率常數(ka, 時間⁻¹, M⁻¹)。可使用此項技術中任何已知方法量測平衡解離常數。本發明抗體一般具有小於約10⁻⁷或10⁻⁸之平衡解離常數, 例如小於約10⁻⁹ M或10⁻¹⁰ M, 在一些態樣中, 小於約10⁻¹¹ M、10⁻¹² M或10⁻¹³ M。

術語「生物可用性」係指投與患者之指定量之藥物的全身可用性(亦即血液/血漿含量)。生物可用性為指示藥物自所投與劑型到達全身循環之時間(速率)及總量(範圍)之量度的絕對術語。

如本文所用, 片語「」主要由…組成」係指方法或組合物中所包括之活性醫藥劑的屬類或種類, 以及對於方法或組合物之預定目的而言無活性的任何賦形劑。在一些態樣中, 除本發明之抗體藥結合物之外, 片語「主要由…組成」明確地排除一或多種其他活性劑之包含。在一些態樣中, 除本發明之抗體藥結合物及共投與之第二藥劑之外, 片語「主要由…組成」明確地排除一或多種其他活性劑之包含。

術語「胺基酸」係指天然存在、合成及非天然之胺基酸, 以及以類似於天然存在之胺基酸的方式發揮功能的胺基酸類似物及胺基酸模擬物。天然存在之胺基酸為由遺傳密碼編碼之胺基酸, 以及後來經修飾之胺基酸, 例如羥基脯胺酸、 γ -羧基麩胺酸及O-磷絲胺酸。胺基酸類似物係指基本化學結構與天然存在之胺基酸相同(亦即 α 碳與氫、羧基、胺基及R基團結合)的化合物, 例如高絲胺酸、正白胺酸、甲硫胺酸亞砷、甲硫胺酸甲基銻。此等類似物具有經修飾之R基團(例如正白胺酸)或經修飾之肽主鏈, 然而保持與天然存在之胺基酸相同之基本化學結構。胺基酸模擬物係指具有與胺基酸之一般化學結構不同之結構, 然而以與天然存在之胺基酸類似之方式起作用的化合物。

術語「經保守修飾之變異體」適用於胺基酸與核酸序列。相對於特定核酸序列, 經保守修飾之變異體係指編碼一致或基本上一致胺

201613643

基酸序列之彼等核酸，或其中核酸不依照基本上一致序列來編碼胺基酸序列。由於遺傳密碼之簡併，因此許多在功能上相同之核酸編碼任何指定蛋白質。舉例而言，密碼子GCA、GCC、GCG及GCU皆編碼胺基酸丙胺酸。因此，在丙胺酸藉由密碼子說明之每一位置上，密碼子可在不改變所編碼之多肽的情況下改變成任一個所述對應密碼子。此類核酸變異為「靜默變異」，其為一種保守修飾型變異。本文中編碼多肽之每一核酸序列亦描述核酸之每一可能的靜默變異。熟習此項技術者將認識到核酸中之各密碼子(除通常為甲硫胺酸之唯一密碼子之AUG及通常為色胺酸之唯一密碼子之TGG之外)可經修飾以產生功能上相同之分子。因此，編碼多肽之核酸之各種靜默變異隱含於各所述序列中。

就多肽序列而言，「經保守修飾之變異體」包括使得胺基酸經化學上類似胺基酸取代的針對多肽序列之個別取代、缺失或添加。提供功能上類似之胺基酸的保守取代表在此項技術中已熟知。此等保守修飾型變異體另外為且不排除多形性變異體、種間同源物及對偶基因。以下八個群組含有彼此間為保守取代的胺基酸：1)丙胺酸(A)、甘胺酸(G)；2)天冬胺酸(D)、麩胺酸(E)；3)天冬醯胺(N)、麩醯胺酸(Q)；4)精胺酸(R)、離胺酸(K)；5)異白胺酸(I)、白胺酸(L)、甲硫胺酸(M)、纈胺酸(V)；6)苯丙胺酸(F)、酪胺酸(Y)、色胺酸(W)；7)絲胺酸(S)、蘇胺酸(T)；及8)半胱胺酸(C)、甲硫胺酸(M)(參見例如Creighton, *Proteins* (1984))。在一些態樣中，術語「保守序列修飾」用於指不顯著影響或改變含有胺基酸序列之抗體之結合特徵的胺基酸修飾。

如本文所用，術語「最佳化」係指編碼胺基酸序列的核苷酸序列已使用在生產細胞或生物體(一般為真核細胞，例如酵母細胞、畢赤酵母屬細胞(*Pichia cell*)、真菌細胞、木黴菌屬細胞(*Trichoderma cell*)、中國倉鼠卵巢細胞(CHO)或人類細胞)中較佳的密碼子改變。最

201613643

佳化核苷酸序列經工程改造可完全地或儘可能多地保留初始核苷酸序列最初所編碼之胺基酸序列，其亦稱為「親本」序列。

在兩個或兩個以上核酸或多肽序列之上下文中，術語「一致百分比」或「一致性百分比」係指兩個或兩個以上序列或子序列相同的程度。兩個序列若其在所比較區域上具有相同的胺基酸或核苷酸序列，則為「一致」。當在比較窗或指定區域上根據最大一致性比較及比對時，若兩個序列具有特定百分比的相同胺基酸殘基或核苷酸(亦即在特定區域上，或未說明時在整個序列上，60%一致、視情況65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或99%一致)，如使用以下序列比較算法之一或藉由人工比對及目視檢查所量測，則兩個序列為「實質上一致」。視情況，一致性存在於至少約30個核苷酸(或10個胺基酸)長度之區域上，或更佳存在於100至500或1000或超過1000個核苷酸(或20、50、200或超過200個胺基酸)長度之區域上。

序列比較時，典型地，一個序列充當與測試序列比較的參考序列。當使用序列比較演算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列座標，且指定序列演算法程式參數。可使用預設程式參數，或可指定替代參數。序列比較演算法接著基於程式參數來計算測試序列相對於參考序列的序列一致性百分比。

如本文所用，「比較窗」包括提及在兩個序列最佳對準之後，一個序列可與具有相同鄰接位置數目之參考序列比較的區段，該區段具有任一個選自由20至600、通常約50至約200、更通常約100至約150組成之群的鄰接位置數目。用於比較之序列比對方法在此項技術中已熟知。用於比較之最佳序列比對可藉由以下方法執行：例如Smith及Waterman, *Adv. Appl. Math.* 2:482c (1970)之局部同源演算法；Needleman及Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970)之同源比對演算法；Pearson及Lipman, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988)之相似性

201613643

搜尋方法；此等算法之電腦化實施方案(Wisconsin Genetics套裝軟體中的GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI)；或人工比對及目視檢查(參見例如Brent等人, Current Protocols in Molecular Biology, 2003)。

適用於測定序列一致性及序列相似性百分比之演算法之兩個實例為BLAST及BLAST 2.0演算法，其分別描述於Altschul等人, Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977；及Altschul等人, J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990中。進行BLAST分析之軟體可經由國家生物技術資訊中心(National Center for Biotechnology Information)公開獲得。此演算法包括藉由鑑別查詢序列中之長度W之短字來首先鑑別高評分序列對(HSP)，該等短字當與資料庫序列中相同長度之字對準時匹配或滿足一些正值臨限值分數T。T稱為鄰域字分數臨限值(Altschul等人，同上)。此等初始鄰域字匹配充當用於起始搜尋之種子以尋找含有其之較長HSP。字匹配沿各序列在兩個方向上延伸，只要累積對準分數增加即可。就核苷酸序列而言，累積分數係使用參數M（一對匹配殘基之獎勵分數；始終>0）及N（失配殘基之罰分；始終<0）計算。就胺基酸序列而言，使用計分矩陣計算累積分數。當累積比對分數自其達成之最大值降低量X；累積分數因一或多次負分殘基比對之累積而變成0或低於0；或到達任一序列之末端時，則中斷字匹配在各方向上的延伸。BLAST演算法參數W、T及X決定比對之靈敏度及速度。BLASTN程式(對於核苷酸序列)使用以下作為預設參數：字長(W)為11，期望值(E)為10，M=5，N=-4及雙股比較。對於胺基酸序列而言，BLASTP程式係使用以下作為預設參數：字長為3，及期望值(E)為10，及BLOSUM62計分矩陣(參見Henikoff及Henikoff, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915)比對數(B)為50，期望值為10，M=5，N=-4及雙股比較。

201613643

BLAST演算法亦對兩個序列之間的相似性進行統計學分析(參見例如 Karlin 及 Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787, 1993)。藉由BLAST演算法提供之一種相似性度量為最小總和機率(P(N))，其提供兩個核苷酸或胺基酸序列之間偶然出現匹配之機率的指示。舉例而言，若測試核酸與參考核酸比較時的最小總和機率小於約0.2，更佳小於約0.01，且最佳小於約0.001，則認為核酸與參考序列相似。

兩個胺基酸序列之間的一致性百分比亦可使用E. Meyers及W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.*, 4:11-17, 1988)之演算法(其已併入ALIGN程式(2.0版)中)、使用PAM120權重殘基表、空隙長度罰分12及空隙罰分4來測定。此外，兩個胺基酸序列之間的一致性百分比可使用Needleman及Wunsch, *J. Mol. Biol.* 48:444-453, 1970)演算法(其已併入GCG套裝軟體(可在www.gcg.com獲得)中之GAP程式中)，使用Blossom 62矩陣或PAM250矩陣，及空隙權重16、14、12、10、8、6或4及長度權重1、2、3、4、5或6來測定。

除以上提到之序列一致性百分比之外，兩個核酸序列或多肽實質上一致之另一指示為，由第一核酸編碼之多肽與針對由第二核酸編碼之多肽產生的抗體具免疫交叉反應性，如下文所述。因此，多肽典型地與第二多肽實質上一致，例如其中兩個肽不同之處僅為保守性取代。兩個核酸序列實質上一致之另一指示為，兩個分子或其補體在嚴格條件下彼此雜交，如下文所述。兩個核酸序列實質上一致之又一指示為，可使用相同引子擴增序列。

術語「核酸」在本文中可與術語「聚核苷酸」互換使用且係指呈單股或雙股形式之去氧核糖核苷酸或核糖核苷酸及其聚合物。該術語涵蓋含有已知核苷酸類似物或經修飾之主鏈殘基或鍵聯的核酸，該等核酸為合成的、天然存在的及非天然存在的，具有與參考核酸類似

201613643

之結合特性，且以類似於參考核苷酸之方式代謝。此類類似物之實例包括(但不限於)硫代磷酸酯、胺基磷酸酯、膦酸甲酯、對掌性膦酸甲酯、2-O-甲基核糖核苷酸、肽核酸(PNA)。

除非另外指明，否則特定核酸序列亦隱含地涵蓋其經保守修飾之變異體(例如簡併密碼子取代)及互補序列，以及明確指定之序列。特定言之，如下詳述，簡併密碼子取代可藉由產生其中一或多個所選(或所有)密碼子之第三位置經混合鹼基及/或脫氧肌苷殘基取代的序列來達成(Batzer等人, (1991) *Nucleic Acid Res.* 19:5081；Ohtsuka等人, (1985) *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608；及Rossolini等人, (1994) *Mol. Cell. Probes* 8:91-98)。

在核酸之上下文中，術語「可操作地連接」係指兩個或兩個以上聚核苷酸(例如DNA)區段之間的功能關係。典型地，其係指轉錄調節序列相對於所轉錄序列的功能關係。舉例而言，啟動子或增強子序列若其在適當宿主細胞或其他表現系統中刺激或調節編碼序列之轉錄，則可操作地連接於編碼序列。一般而言，可操作地連接於所轉錄序列之啟動子轉錄調節序列在實體上鄰接於所轉錄序列，亦即其為順式作用。然而，諸如增強子之一些轉錄調節序列無需在實體上鄰接於或緊鄰於其增強轉錄之編碼序列。

術語「多肽」或「蛋白質」在本文中可互換使用，且係指胺基酸殘基之聚合物。該術語適用於胺基酸聚合物，其中一或多個胺基酸殘基為天然存在之對應胺基酸之人工化學模擬物，且適用於天然存在之胺基酸聚合物及非天然存在之胺基酸聚合物。除非另外指明，否則特定多肽序列亦隱含地涵蓋其保守修飾型變異體。

如本文所用，術語「免疫結合物」或「抗體藥結合物」係指抗體或其抗原結合片段與另一藥劑(諸如化學治療劑、毒素、免疫治療劑、成像探針及類似物)鍵聯。鍵聯可為共價鍵，或非共價相互作用

201613643

用，諸如經由靜電力。可使用此項技術中已知的各種連接子以便形成免疫結合物。另外，免疫結合物可以融合蛋白形式提供，該融合蛋白可自編碼免疫結合物之聚核苷酸表現而成。如本文所用，「融合蛋白」係指兩個或兩個以上最初編碼各別蛋白質(包括肽及多肽)的基因或基因片段連接而產生的蛋白質。融合基因之轉譯產生功能特性源於各初始蛋白質的單一蛋白質。

術語「個體」包括人類及非人類動物。非人類動物包括所有脊椎動物，例如哺乳動物及非哺乳動物，諸如非人類靈長類動物、綿羊、狗、牛、雞、兩棲動物及爬行動物。除非提及，否則術語「患者」或「個體」在本文中互換使用。

如本文所用，術語「毒素」、「細胞毒素」或「細胞毒性劑」係指不利於細胞生長及增殖且可用於減少、抑制或摧毀細胞或惡性疾病的任何藥劑。

如本文所用，術語「抗癌劑」係指可用於治療細胞增殖性病症(諸如癌症)的任何藥劑，包括(但不限於)細胞毒性劑、化學治療劑、放射療法及放射治療劑、靶向抗癌劑及免疫治療劑。

如本文所用，術語「藥物部分」或「有效負載」係指與抗體或抗原結合片段結合的化學部分，且可包括任何治療劑或診斷劑，例如抗癌劑、消炎劑、抗感染劑(例如抗真菌劑、抗細菌劑、抗寄生蟲劑、抗病毒劑)，或麻醉劑。在某些態樣中，藥物部分係選自V-ATP酶抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧瑞他汀、海兔毒素、類美登素、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白質CRM1之抑制劑、DPPIV抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、蛋白酶體抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷化劑、DNA嵌入劑、DNA小凹槽結合

201613643

劑及DHFR抑制劑。使此等物中之每一者連接至與本發明之抗體及方法相容之連接子的方法在此項技術中已知。參見例如Singh等人, (2009) *Therapeutic Antibodies: Methods and Protocols*, 第525卷, 445-457。另外, 有效負載可為生物物理學探針、螢光團、旋轉標記、紅外探針、親和力探針、螯合劑、光譜學探針、放射性探針、脂質分子、聚乙二醇、聚合物、旋轉標記、DNA、RNA、蛋白質、肽、表面、抗體、抗體片段、奈米粒子、量子點、脂質體、PLGA顆粒、醣或多醣。

術語「類美登素藥物部分」意謂抗體-藥物結合物之子結構具有類美登素化合物之結構。美登素首次自東非灌木齒葉美登木 (*Maytenus serrata*) 分離而得(美國專利第3,896,111號)。隨後發現某些微生物亦產生類美登素, 諸如美登醇及C-3美登醇酯(美國專利第4,151,042號)。合成美登醇及美登醇類似物已有報導。參見美國專利第4,137,230號、第4,248,870號、第4,256,746號、第4,260,608號、第4,265,814號、第4,294,757號、第4,307,016號、第4,308,268號、第4,308,269號、第4,309,428號、第4,313,946號、第4,315,929號、第4,317,821號、第4,322,348號、第4,331,598號、第4,361,650號、第4,364,866號、第4,424,219號、第4,450,254號、第4,362,663號及第4,371,533號, 以及Kawai等人(1984) *Chem. Pharm. Bull.* 3441-3451), 各文獻以引用的方式明確地併入本文中。適用於結合之類美登素之特定實例包括DM1、DM3及DM4。

「腫瘤」係指贅生性細胞生長及增殖(不論惡性或良性), 及所有癌前及癌細胞及組織。

術語「抗腫瘤活性」意謂腫瘤細胞增殖速率、存活率或轉移活性降低。顯示抗腫瘤活性的一種可能方式為顯示腫瘤細胞生長速率、腫瘤大小停滯或腫瘤大小降低。此活性可使用所接受的活體外或活體

201613643

內腫瘤模型評估，包括(但不限於)異種移植模型、同種移植模型、MMTV模型及此項技術中已知研究抗腫瘤活性的其他已知模型。

術語「惡性疾病」係指非良性腫瘤或癌症。如本文所使用，術語「癌症」包括以細胞生長失調或不受控為特徵的惡性疾病。例示性癌症包括：癌瘤、肉瘤、白血病及淋巴瘤。

術語「癌症」包括原發惡性腫瘤(例如其細胞尚未遷移至個體體內之除初始腫瘤位點之外之位點的惡性腫瘤)及繼發惡性腫瘤(例如轉移(腫瘤細胞遷移至不同於初始腫瘤位點的第二位點)產生的惡性腫瘤)。

術語「CDH6」係指一種細胞黏附分子，其為細胞-細胞黏附分子之鈣黏素家族的成員。CDH6之核酸及胺基酸序列已知且已公開於GenBank寄存號AK291290 (蛋白質寄存編號BAF83979.1)。亦參見SEQ ID NO: 1 (對於人類CDH6 cDNA序列)及SEQ ID NO: 2 (對於人類CDH6蛋白質序列)。在結構上，CDH6受體為具有五個細胞外鈣黏素重複的II型鈣黏素且在其全長上與胺基酸序列SEQ ID NO: 2具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。在結構上，CDH6核酸序列在其全長上與核酸序列SEQ ID NO 1具有至少約90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%序列一致性。

術語「表現CDH6之癌症」或「CDH6陽性癌症」係指在癌細胞表面上表現CDH6及/或突變型CDH6的癌症。

如本文所使用，術語「治療」任何疾病或病症在一個態樣中係指改善疾病或病症(亦即，減緩或遏制或減少疾病或其至少一個臨床症狀之發展)。在另一態樣中，「治療」係指緩解或改善至少一種身體參數，包括患者可能辨別不出之身體參數。在又一態樣中，「治療」係指在身體上(例如可辨別症狀之穩定化)、生理上(例如身體參數之穩

201613643

定化)或在兩方面調節疾病或病症。在又一態樣中，「治療」係指預防或延遲疾病或病症之發作或發展或進展。

術語「治療上可接受之量」或「治療上有效之劑量」可互換地指足以實現所要結果(亦即降低腫瘤大小、抑制腫瘤生長、預防轉移、抑制或預防病毒、細菌、真菌或寄生蟲感染)的量。在一些態樣中，治療上可接受之量不誘導或導致不良副作用。治療上可接受之量可藉由首先投與低劑量、接著遞增地增加該劑量直至達成所要作用來確定。本發明分子之「預防有效劑量」及「治療有效劑量」可分別預防疾病症狀(包括與癌症相關的症狀)之發作或降低其嚴重程度。

術語「共投與」係指兩種活性劑同時存在於個體血液中。共投與的活性劑可同時或依序遞送。

【圖式簡單說明】

圖1為抗CDH6抗體針對OVCAR3細胞之細胞結合EC50的圖示。

圖2顯示抗CDH6抗體之抗原決定基分組。

圖3表示CDH6之五個EC域之氬定位。

圖4為結合至CDH6 EC5域之NOV0710之晶體結構，其與CDH2 ECD之已知結構重疊。

圖5描繪結合至CDH6之NOV0712之晶體結構。

圖6描繪結合至CDH6之NOV0710之晶體結構。

圖7顯示抗CDH6抗體當與DM1或DM4結合時針對卵巢癌細胞株的活體外活性。

圖8為FACS圖，其顯示卵巢癌細胞株(包括經CDH6轉染之細胞株及CDH6 siRNA基因表現經阻斷之細胞株)上之CDH6表現量。

圖9展示抗CDH6抗體當與DM1結合且在卵巢癌異種移植小鼠模型中測試時的功效。

圖10展示抗CDH6抗體當與DM1結合且在卵巢癌異種移植小鼠模

201613643

型中測試時的功效。

圖11顯示抗CDH6抗體當與SPDB-DM4結合且在卵巢癌異種移植小鼠模型中測試時的功效。

圖12比較NOV0712-SPDB-DM4及NOV0712-SMCC-DM1在卵巢癌異種移植小鼠模型中的功效。

圖13比較NOV0712與SPDB-DM4、磺基-SPDB-DM4及SMCC-DM1連接子/有效負載組合在卵巢癌患者源原發腫瘤異種移植小鼠模型中的功效。

圖14顯示不同劑量之NOV0712當與SPDB-DM4或磺基-SPDB-DM4結合時在卵巢癌異種移植小鼠模型中的功效。

圖15比較NOV0712與磺基-SPDB-DM4及SMCC-DM1連接子有效負載組合在患者源原發卵巢腫瘤異種移植小鼠模型中的功效。

【實施方式】

本發明提供結合至CDH6的抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及抗體藥結合物。特定言之，本發明係關於結合至CDH6且此結合後內化的抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)。本發明之抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)可用於產生抗體藥結合物。此外，本發明提供具有所要藥物動力學特徵及其他所要屬性且因此可用於治療表現CDH6之癌症(例如(但不限於)卵巢癌、腎癌、肝癌及甲狀腺癌)的抗體藥結合物。本發明進一步提供包含抗體藥結合物的醫藥組合物，以及製備及使用此等醫藥組合物治療癌症的方法。

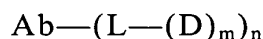
抗體藥結合物

本發明提供抗體藥結合物，其中特異性結合至CDH6的抗體、抗原結合片段或其功能等效物連接至藥物部分。在一個態樣中，抗體、抗原結合片段或其功能等效物經由共價連接、藉由連接子連接至作為抗癌劑的藥物部分。抗體藥結合物可選擇性地遞送有效劑量的抗癌劑

201613643

(例如細胞毒性劑)至表現CDH6之腫瘤組織，藉此可達成較大選擇性(及較低有效劑量)。

在一個態樣中，本發明提供式(I)之免疫結合物：



其中Ab表示本文所述之CDH6結合抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)；

L為連接子；

D為藥物部分；

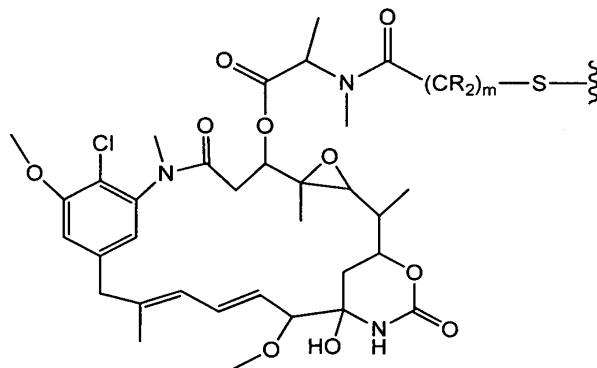
m為整數1至8；及

n為整數1至20。在一個態樣中，n為整數1至10、2至8，或2至5。在一個特定態樣中，n為3至4。在一些態樣中，m為1。在一些態樣中，m為2、3或4。

雖然特定結合物分子中的藥物與抗體比率具有確切整數值(例如式(I)中之n乘以m)，但應瞭解該值當用於描述含有多種分子的樣品時通常為平均值，原因在於典型地與結合步驟相關的一些非均質程度。免疫結合物樣品中的平均負載率在本文中稱為藥物與抗體比率，或「DAR」。在類美登素之態樣中，此可稱為類美登素與抗體比率或「MAR」。在一些態樣中，DAR在約1與約5之間，且典型地為約3、3.5、4、4.5或5。在一些態樣中，至少50重量%樣品為具有平均DAR加或減2之化合物，且較佳地，至少50%樣品為含有平均DAR加或減1的結合物。其他態樣包括其中DAR為約3.5的免疫結合物。在一些態樣中，'約n'之DAR意謂DAR之量測值在n之20%內。

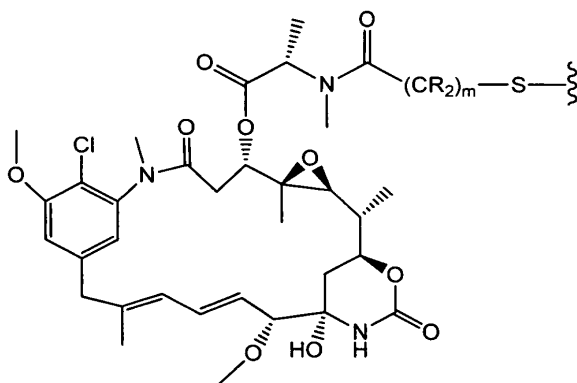
本發明提供包含如本文所揭示之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)及其功能等效物與藥物部分連接或結合的免疫結合物。在一個態樣中，藥物部分D為類美登素藥物部分，包括具有以下結構之彼等物：

201613643



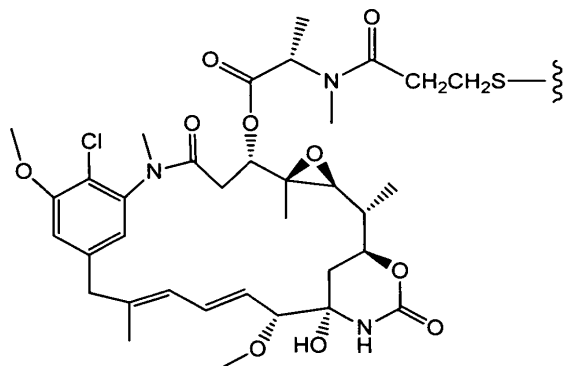
其中波浪線指示在抗體藥結合物中，類美登素中之硫原子共價連接至連接子。R在每次出現時獨立地為H或C₁-C₆烷基。將醯胺基連接至硫原子的伸烷基鏈可為甲基、乙基或丙基，亦即m為1、2或3。(美國專利第633,410號、美國專利第5,208,020號；Chari等人(1992) *Cancer Res.* 52:127-131；Lui等人(1996) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:8618-8623)。

涵蓋所公開之免疫結合物中的類美登素藥物部分之所有立體異構體，亦即類美登素之對掌性碳之R與S組態之任何組合。在一個態樣中，類美登素藥物部分具有以下立體化學結構。

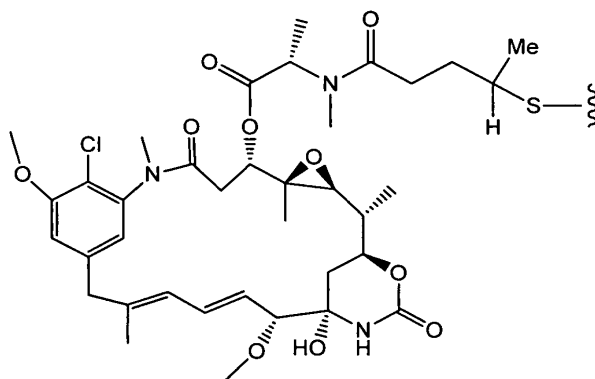


在一個態樣中，類美登素藥物部分為N^{2'}-去乙醯基-N^{2'}-(3-巯基-1-側氧基丙基)-美登素(亦稱為DM1)。DM1由以下結構式表示。

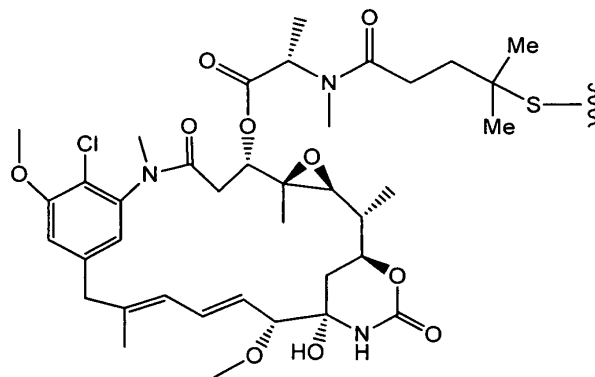
201613643

**DM1**

在另一態樣中，類美登素藥物部分為 $N^{2'}$ -去乙醯基- $N^{2'}$ -(4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素(亦稱為DM3)。DM3由以下結構式表示。

**DM3**

在另一態樣中，類美登素藥物部分為 $N^{2'}$ -去乙醯基- $N^{2'}$ -(4-甲基-4-巰基-1-側氧基戊基)-美登素(亦稱為DM4)。DM4由以下結構式表示。

**DM4**

201613643

藥物部分D可經由連接子L連接至抗體。L為能夠使抗體Ab連接至藥物部分D的任何化學部分。連接子L使抗體Ab經由共價鍵連接至藥物D。連接子試劑為雙官能或多官能部分，其可用於連接藥物部分D及抗體Ab而形成抗體藥結合物。抗體藥結合物可使用連接子製備，該連接子具有用於結合至藥物部分D及抗體Ab的反應性官能團。半胱胺酸、硫醇或胺(例如抗體之N末端或胺基酸側鏈，諸如離胺酸)可與連接子試劑之官能基形成一鍵。

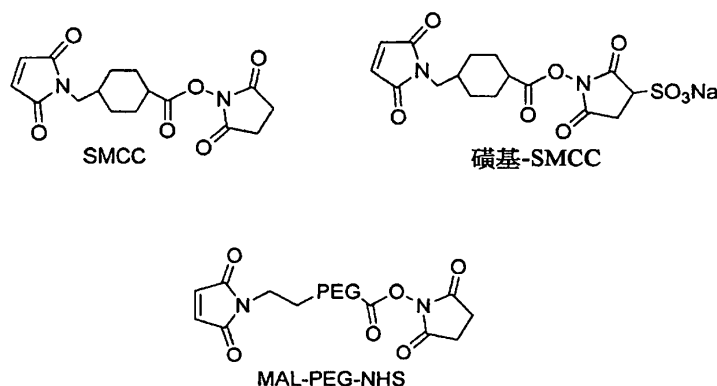
在一個態樣中，L為可裂解連接子。在另一態樣中，L為不可裂解連接子。在一些態樣中，L為酸不穩定性連接子、光不穩定性連接子、肽酶可裂解連接子、酯酶可裂解連接子、雙硫鍵可還原連接子、親水性連接子、預帶電連接子或基於二羧酸之連接子。

形成位於藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間之不可裂解連接子的適合交聯試劑在此項技術中已熟知且可形成包含硫原子(諸如SMCC)的不可裂解連接子或不含硫原子的彼等物。形成位於藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間之不可裂解連接子的較佳交聯試劑包含基於順丁烯二醯亞胺基或鹵乙醯基之部分。根據本發明，稱此等不可裂解連接子衍生自基於順丁烯二醯亞胺基或鹵乙醯基之部分。

包含基於順丁烯二醯亞胺基之部分的交聯試劑包括(但不限於)*N*-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(SMCC)、磺基丁二醯亞胺基4-(*N*-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)、*N*-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-羧基-(6-醯胺基己酸酯)(其為SMCC之「長鏈」類似物(LC-SMCC))、 κ -順丁烯二醯亞胺基十一烷酸*N*-丁二醯亞胺基酯(KMUA)、 γ -順丁烯二醯亞胺基丁酸*N*-丁二醯亞胺基酯(GMBS)、 ϵ -順丁烯二醯亞胺基己酸*N*-丁二醯亞胺基酯(EMCS)、間-順丁烯二醯亞胺基苯甲醯基-*N*-羥基丁二醯亞胺酯(MBS)、*N*-(α -順丁烯二醯亞胺基乙醯氧基)-丁二醯亞胺酯

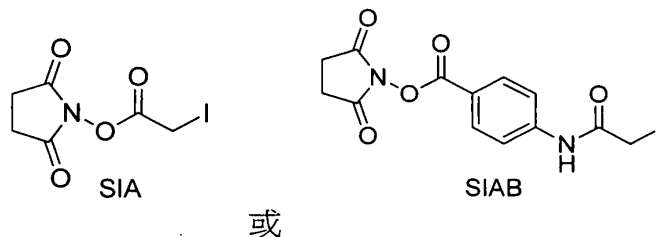
201613643

(AMSA)、丁二醯亞胺基 6-(β -順丁烯二醯亞胺基丙醯胺基)己酸酯 (SMPH)、*N*-丁二醯亞胺基 4-(對-順丁烯二醯亞胺基苯基)-丁酸酯 (SMPB)、*N*-(對順丁烯二醯亞胺基苯基)異氰酸酯(PMIP)，及基於順丁烯二醯亞胺基之交聯試劑，其含有聚乙二醇間隔子，諸如MAL-PEG-NHS。此等交聯試劑形成衍生自基於順丁烯二醯亞胺基之部分的不可裂解連接子。基於順丁烯二醯亞胺基之交聯試劑之代表性結構顯示如下。



在另一態樣中，連接子L衍生自*N*-丁二醯亞胺基 4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(SMCC)、磺基丁二醯亞胺基 4-(*N*-順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷-1-甲酸酯(磺基-SMCC)或MAL-PEG-NHS。

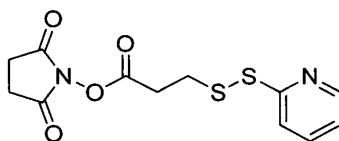
包含基於鹵乙醯基之部分的交聯試劑包括*N*-丁二醯亞胺基碘乙酸酯(SIA)、*N*-丁二醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)、*N*-丁二醯亞胺基溴乙酸酯(SBA)及*N*-丁二醯亞胺基 3-(溴乙醯胺基)丙酸酯(SBAP)。此等交聯試劑形成衍生自基於鹵乙醯基之部分的不可裂解連接子。基於鹵乙醯基之交聯試劑之代表性結構顯示如下。



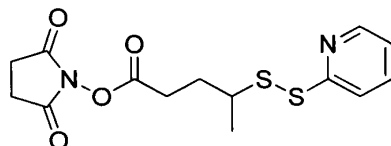
201613643

在一個態樣中，連接子L衍生自N-丁二醯亞胺基碘乙酸酯(SIA)或N-丁二醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)。

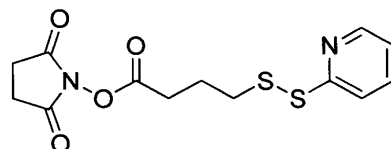
形成位於藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間之可裂解連接子的適合交聯試劑在此項技術中已熟知。含有二硫鍵的連接子為可經由二硫鍵交換而裂解的連接子，此可在生理學條件下發生。根據本發明，稱此等可裂解連接體衍生自基於二硫鍵之部分。適合的二硫鍵交聯試劑包括N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)及N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)，其結構顯示如下。此等二硫鍵交聯試劑形成衍生自基於二硫鍵之部分的可裂解連接子。



N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)，

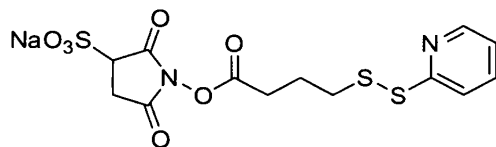


N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)，



N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)及

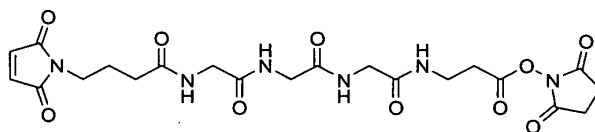
201613643



N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)

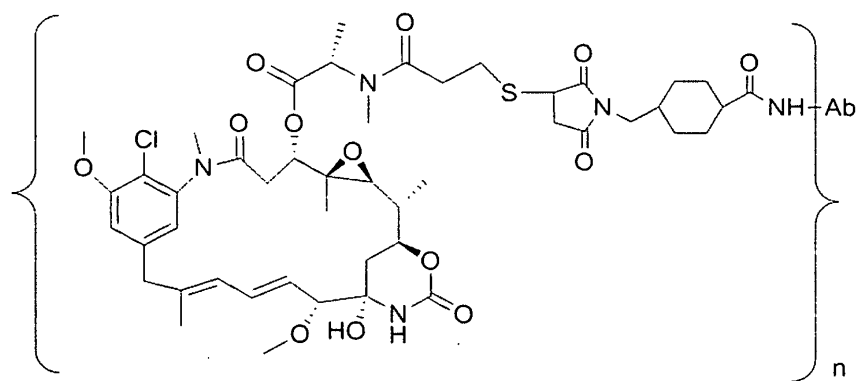
在一個態樣中，連接子L衍生自N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)。

形成位於藥物部分D (例如類美登素)與抗體Ab之間之帶電連接子的適合交聯試劑已知為預帶電交聯試劑。在一個態樣中，衍生自預帶電交聯試劑的連接子L為CX1-1。CX1-1之結構如下。



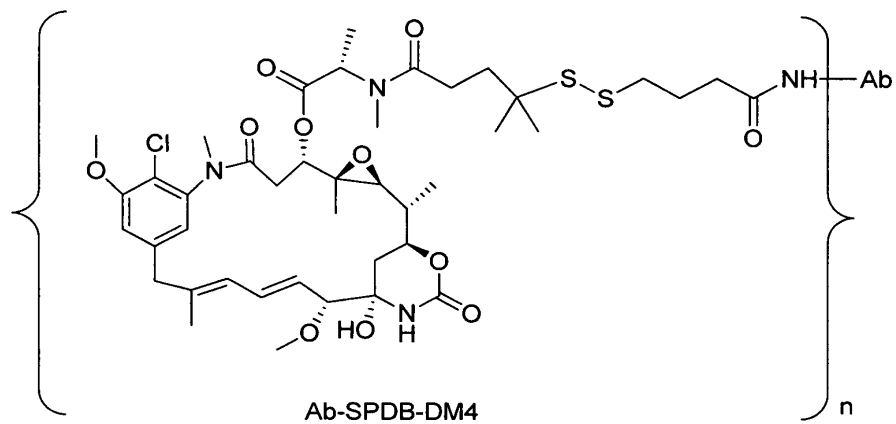
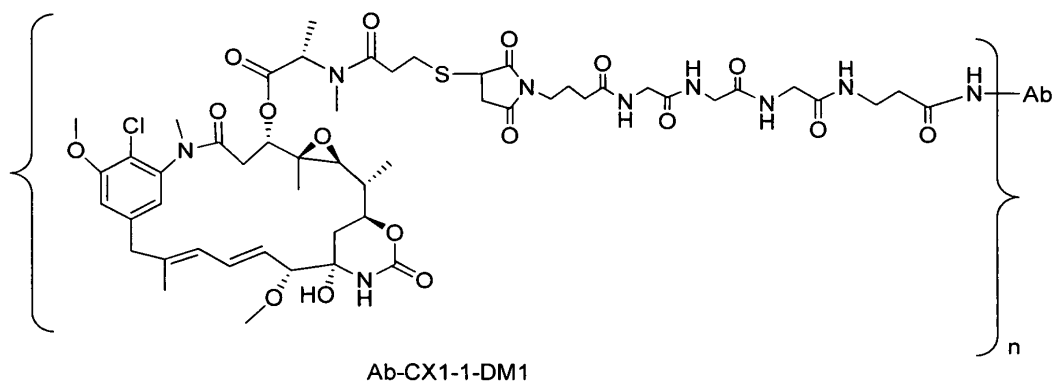
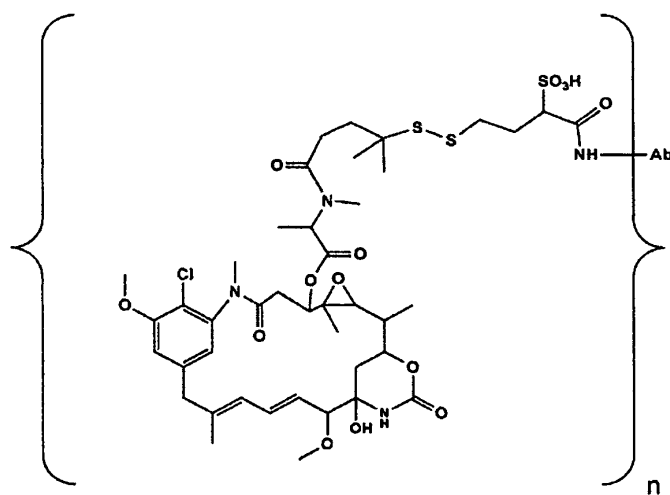
17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)

在本發明提供的一個態樣中，結合物係由任一以下結構式表示：



Ab-MCC-DM1

201613643



其中：

Ab為特異性結合至人類CDH6的抗體或其抗原結合片段；

201613643

指示經由與Ab之一級胺形成醯胺鍵而連至Ab之D-L基團之數目的n為整數1至20。在一個態樣中，n為整數1至10、2至8或2至5。在一個特定態樣中，n為3或4。

在一個態樣中，藥物(例如DM1或DM4)與抗體在結合物中之平均莫耳比(亦即平均w值，亦稱為類美登素抗體比率(MAR))為約1至約10、約2至約8 (例如1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.1、3.2、3.3、3.4、3.5、3.6、3.7、3.8、3.9、4.0、4.1、4.2、4.3、4.4、4.5、4.6、4.7、4.8、4.9、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5、6.6、6.7、6.8、6.9、7.0、7.1、7.2、7.3、7.4、7.5、7.6、7.7、7.8、7.9、8.0或8.1)、約2.5至約7、約3至約5、約2.5至約4.5 (例如約2.5、約2.6、約2.7、約2.8、約2.9、約3.0、約3.1、約3.3、約3.4、約3.5、約3.6、約3.7、約3.8、約3.9、約4.0、約4.1、約4.2、約4.3、約4.4、約4.5)、約3.0至約4.0、約3.2至約4.2，或約4.5至5.5 (例如約4.5、約4.6、約4.7、約4.8、約4.9、約5.0、約5.1、約5.2、約5.3、約5.4或約5.5)。

在本發明提供的一個態樣中，結合物具有實質性高純度且具有一或多種以下特徵：(a)結合物物質中大於約90% (例如大於或等於約91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)、較佳大於約95%為單體；(b)結合物製劑中之未結合連接子含量小於約10% (例如小於或等於約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)(相對於總連接子)；(c)小於10%的結合物物質發生交聯(例如小於或等於約9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%)；(d)結合物製劑中的游離藥物(例如DM1或DM4)含量小於約2%(例如小於或等於約1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、0.1%或0%)(mol/mol，相對

201613643

於總細胞毒性劑)。

如本文所使用，術語「未結合的连接子」係指與衍生自交聯試劑之连接子(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)共價连接的抗體，其中該抗體與藥物(例如DM1或DM4)不經由连接子(亦即，「未結合的连接子」可由Ab-SMCC、Ab-SPDB、Ab-磺基-SPDB或Ab-CX1-1表示)偶合。

1. 藥物部分

本發明提供特異性結合至CDH6的免疫結合物。本發明之免疫結合物包含與藥物部分結合的抗CDH6抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物，藥物部分例如抗癌劑、抗血液病藥劑、自體免疫治療劑、消炎劑、抗真菌劑、抗細菌劑、抗寄生蟲劑、抗病毒劑或麻醉劑。抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可使用此項技術中已知之任何方法與若干種相同或不同藥物部分結合。

在某些態樣中，本發明免疫結合物中之藥物部分係選自由以下組成之群：V-ATP酶抑制劑、促細胞凋亡劑、Bcl2抑制劑、MCL1抑制劑、HSP90抑制劑、IAP抑制劑、mTor抑制劑、微管穩定劑、微管去穩定劑、奧瑞他汀、海兔毒素、類美登素、MetAP (甲硫胺酸胺基肽酶)、核輸出蛋白CRM1之抑制劑、DPPIV抑制劑、蛋白酶體抑制劑、粒線體中之磷醯基轉移反應之抑制劑、蛋白質合成抑制劑、激酶抑制劑、CDK2抑制劑、CDK9抑制劑、驅動蛋白抑制劑、HDAC抑制劑、DNA損傷劑、DNA烷化劑、DNA嵌入劑、DNA小凹槽結合劑及DHFR抑制劑。

在一個態樣中，本發明之免疫結合物中的藥物部分為類美登素藥物部分，諸如(但不限於) DM1、DM3或DM4。

另外，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可與調節指定生物學反應的藥物部分結合。藥物部分不理解為限於

201613643

經典化學治療劑。舉例而言，藥物部分可為具有所要生物活性之蛋白質、肽或多肽。此類蛋白質可包括例如毒素，諸如相思子毒素、蓖麻毒素A、綠膿桿菌外毒素、霍亂毒素或白喉毒素；蛋白質，諸如腫瘤壞死因子、 α 干擾素、 β 干擾素、神經生長因子、血小板衍生長因子、組織纖維蛋白溶酶原活化因子、細胞激素、細胞凋亡劑、抗血管生成劑，或生物反應調節劑，諸如淋巴激素。

在一個態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物係與藥物部分結合，藥物部分諸如細胞毒素、藥物(例如免疫抑制劑)或放射性毒素。細胞毒素之實例包括(但不限於)紫杉烷(參見例如國際(PCT)專利申請案第WO 01/38318號及PCT/US03/02675)、DNA烷基化劑(例如CC-1065類似物)、蔥環黴素、妥布賴森類似物(tubulysin analogs)、多卡米辛類似物(duocarmycin analogs)、奧瑞他汀E、奧瑞他汀F、類美登素，及包含反應性聚乙二醇部分的細胞毒性劑(參見例如Sasse等人, J. Antibiot. (Tokyo), 53, 879-85 (2000)；Suzawa等人, Bioorg. Med. Chem., 8, 2175-84 (2000)；Ichimura等人, J. Antibiot. (Tokyo), 44, 1045-53 (1991)；Francisco等人, Blood 2003 15;102(4):1458-65)；美國專利第5,475,092號、第6,340,701號、第6,372,738號及第6,436,931號；美國專利申請公開案第2001/0036923 A1號、申請中之美國專利申請案第10/024,290號及第10/116,053號，及國際(PCT)專利申請案第WO 01/49698號)、紫衫醇、細胞鬆弛素B (cytochalasin B)、短桿菌素D (gramicidin D)、溴化乙錠(ethidium bromide)、吐根素(emetine)、絲裂黴素(mitomycin)、依託泊苷(etoposide)、特諾波賽(tenoposide)、長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、秋水仙鹼(t. colchicin)、阿黴素(doxorubicin)、道諾黴素(daunorubicin)、二羥基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、光神黴素(mithramycin)、放線菌素D

201613643

(actinomycin D)、1-去氫睪固酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮質激素(glucocorticoids)、普魯卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛爾(propranolol)及嘌呤黴素(puromycin)，及其類似物或同源物。治療劑亦包括例如抗代謝物(例如甲胺喋呤(methotrexate)、6-巰基嘌呤(6-mercaptopurine)、6-硫鳥嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶達卡巴嗪(5-fluorouracil decarbazine))、消融劑(例如二氯甲二乙胺(mechlorethamine)、噻替派苯丁酸氮芥(thiotepa chlorambucil)、美法蘭(meiphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)及洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、環磷醯胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、鏈佐黴素(streptozotocin)、絲裂黴素C(mitomycin C)，及順-二氯二胺鉑(II)(DDP)順鉑、蔥環黴素(anthracyclines)(例如道諾黴素(daunorubicin)(先前為柔紅黴素(daunomycin))及阿黴素)、抗生素(例如放線菌素D(先前為放線菌素)、博萊黴素(bleomycin)、光神黴素及安黴黴素(anthramycin)(AMC))，及抗有絲分裂劑(例如長春新鹼及長春鹼)。(參見例如Seattle Genetics US20090304721)。

可與本發明之抗體、抗體片段(抗原結合片段)或功能等效物結合之細胞毒素之其他實例包括倍癌黴素(duocarmycins)、卡奇黴素(calicheamicins)、美登素及奧瑞他汀及其衍生物。

用於治療劑與抗體結合的各種類型之細胞毒素、連接子及方法在此項技術中已知，參見例如Saito等人，(2003) Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215；Trail等人，(2003) Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337；Payne，(2003) Cancer Cell 3:207-212；Allen，(2002) Nat. Rev. Cancer 2:750-763；Pastan及Kreitman，(2002) Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091；Senter及Springer，(2001) Adv. Drug Deliv. Rev.

201613643

53:247-264。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可與放射性同位素結合以產生細胞毒性放射性醫藥，稱為放射免疫結合物。可與抗體結合供診斷或治療上使用的放射性同位素實例包括(但不限於)碘-131、銇-111、釷-90，及鐳-177。製備放射免疫結合物之方法在此項技術中已確立。放射免疫結合物之實例可市購，包括 ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals) 及 BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals)，且可使用類似方法、使用本文所揭示之抗體製備放射免疫結合物。在某些態樣中，巨環螯合劑為1,4,7,10-四氮雜環十二烷-N,N',N'',N'''-四乙酸(DOTA)，其可經由連接子分子連接至抗體。此類連接子分子在此項技術中通常已知且描述於Denardo等人，(1998) Clin Cancer Res. 4(10):2483-90；Peterson等人，(1999) Bioconjug. Chem. 10(4):553-7；及Zimmerman等人，(1999) Nucl. Med. Biol. 26(8):943-50，各文獻以全文引用的方式併入本文中。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可與異質蛋白質或多肽(或其片段，較佳為至少10個、至少20個、至少30個、至少40個、至少50個、至少60個、至少70個、至少80個、至少90個或至少100個胺基酸之多肽)結合以產生融合蛋白。特定言之，本發明提供包含本文所述之抗體片段(例如抗原結合片段)(例如Fab片段、Fd片段、Fv片段、F(ab)2片段、VH域、VH CDR、VL域或VL CDR)及異質蛋白質、多肽或肽的融合蛋白。

其他融合蛋白可經由基因改組、基元改組、外顯子改組及/或密碼子改組(統稱為「DNA改組」)之技術產生。DNA改組可用於改變本發明抗體或其片段(例如具有較高親和力及較低離解速率之抗體或其片段)之活性。一般參見美國專利第5,605,793號、第5,811,238號、第5,830,721號、第5,834,252號及第5,837,458號；Patten等人，(1997)

201613643

Curr. Opin. Biotechnol. 8:724-33 ; Harayama, (1998) Trends Biotechnol. 16(2):76-82 ; Hansson等人, (1999) J. Mol. Biol. 287:265-76 ; 及Lorenzo及Blasco, (1998) Biotechniques 24(2):308- 313 (此等專利及公開案各以全文引用的方式併入本文中)。抗體或其片段，或所編碼之抗體或其片段可藉由在重組之前進行易錯PCR隨機突變誘發、隨機核苷酸插入或其他方法來改變。編碼特異性結合至抗原之抗體或其片段的聚核苷酸可與一或多種異質分子之一或多種組分、基元、區段、部分、域、片段等重組。

此外，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物可與諸如肽之標記序列結合，以促進純化。在較佳態樣中，標記胺基酸序列尤其為六組胺酸肽，諸如pQE載體(QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, CA, 91311)中所提供之標記，其中多者可市購。如Gentz等人, (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824中所述，例如六組胺酸為融合蛋白純化提供方便。適用於純化之其他肽標記包括(但不限於)紅血球凝集素(「HA」)標記，其相當於源於流感紅血球凝集素蛋白質之抗原決定基(Wilson等人, (1984) Cell 37:767)及「FLAG」標記(A. Einhauer等人, J. Biochem. Biophys. Methods 49:455-465, 2001)。如本發明中所述，抗體或抗原結合片段亦可與腫瘤滲透性肽結合以便增強其功效。

在其他態樣中，本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物係與診斷劑或偵測劑結合。此類免疫結合物可適用於監測或預後疾病或病症之發作、發展、進展及/或嚴重程度作為臨床測試程序之一部分，諸如測定特定療法之功效。此類診斷及偵測可藉由使抗體與可偵測物質偶合來完成，可偵測物質包括(但不限於)各種酶，諸如(但不限於)辣根過氧化酶、鹼性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙醯膽鹼酯酶；輔基，諸如(但不限於)抗生蛋白鏈菌素/生物素及抗生蛋白

201613643

/生物素；螢光物質，諸如(但不限於) Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 514、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 546、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 610、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、傘酮、螢光素、異硫氰酸螢光素、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺螢光素、丹磺醯氯(dansyl chloride)或藻紅素(phycoerythrin)；發光物質，諸如(但不限於)魯米諾(luminol)；生物發光物質，諸如(但不限於)螢光素酶、螢光素及水母素；放射性物質，諸如(但不限於)碘(^{131}I 、 ^{125}I 、 ^{123}I 及 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氫(^3H)、銦(^{115}In 、 ^{113}In 、 ^{112}In 及 ^{111}In)、鎳(^{99}Tc)、鈦(^{201}Ti)、鎳(^{68}Ga 、 ^{67}Ga)、鈮(^{103}Pd)、鉬(^{99}Mo)、氙(^{133}Xe)、氟(^{18}F)、 ^{153}Sm 、 ^{177}Lu 、 ^{159}Gd 、 ^{149}Pm 、 ^{140}La 、 ^{175}Yb 、 ^{166}Ho 、 ^{90}Y 、 ^{47}Sc 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{142}Pr 、 ^{105}Rh 、 ^{97}Ru 、 ^{68}Ge 、 ^{57}Co 、 ^{65}Zn 、 ^{85}Sr 、 ^{32}P 、 ^{153}Gd 、 ^{169}Yb 、 ^{51}Cr 、 ^{54}Mn 、 ^{75}Se 、 ^{64}Cu 、 ^{113}Sn 及 ^{117}Sn ；及正電子發射金屬(使用各種正電子發射斷層攝影術)，及非放射性順磁金屬離子。

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物亦可連接至固體載體，此特別適用於靶抗原之免疫分析或純化。此類固體載體包括(但不限於)玻璃、纖維素、聚丙烯醯胺、耐綸、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙烯。

2. 連接子

如本文所用，「連接子」為能夠使抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或功能等效物與另一部分(諸如藥物部分)連接的任何化學部分。連接子在使化合物或抗體保持活性之條件下可易發生裂解(可裂解連接子)，諸如酸誘導性裂解、光誘導性裂解、肽酶誘導性裂解、酯酶誘導性裂解及雙硫鍵裂解。或者，連接子可實質上抗裂解(例如穩定

201613643

性連接子或不可裂解連接子)。在一些態樣中，連接子為預帶電連接子、親水性連接子或基於二羧酸之連接子。

在一個態樣中，所用連接子衍生自交聯試劑，諸如N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)戊酸酯(SPP)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)丁酸酯(SPDB)、N-丁二醯亞胺基4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)、N-丁二醯亞胺基碘乙酸酯(SIA)、N-丁二醯亞胺基(4-碘乙醯基)胺基苯甲酸酯(SIAB)、順丁烯二醯亞胺PEG NHS、N-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(SMCC)、N-磺基丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(磺基-SMCC)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)。在另一態樣中，所用連接子衍生自交聯劑，諸如N-丁二醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、N-丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(SMCC)、N-磺基丁二醯亞胺基4-(順丁烯二醯亞胺基甲基)環己烷甲酸酯(磺基-SMCC)、N-丁二醯亞胺基-4-(2-吡啶基二硫基)-2-磺基-丁酸酯(磺基-SPDB)或17-(2,5-二側氧基-2,5-二氫-1H-吡咯-1-基)-5,8,11,14-四側氧基-4,7,10,13-四氮雜十七烷-1-酸2,5-二側氧基吡咯啉-1-基酯(CX1-1)。

不可裂解連接子為能夠使藥物(諸如類美登素)與抗體以穩定共價方式連接的任何化學部分且不偏離上文針對可裂解連接體所列之類別。因此，不可裂解連接子實質上耐受酸誘導性裂解、光誘導性裂解、肽酶誘導性裂解、酯酶誘導性裂解及雙硫鍵裂解。此外，不可裂解係指連接子中之化學鍵或鄰接連接子之化學鍵耐受由酸、光不穩定性裂解劑、肽酶、酯酶或化學或生理學化合物誘導之裂解的能力，該等化合物在藥物(諸如類美登素或抗體)不失去其活性的條件下使雙硫

201613643

鍵裂解。

酸不穩定連接子為在酸性pH下可裂解的連接子。舉例而言，某些細胞內隔室(諸如內體及溶酶體)具有酸性pH (pH 4-5)，且提供適於使酸不穩定連接子裂解的條件。

光不穩定連接子為在體表上及光可接近的多個體腔內使用的連接子。此外，紅外光可穿透組織。

一些連接子可藉由肽酶裂解，亦即肽酶可裂解連接子。某些肽僅容易在細胞內部或外部裂解，參見例如Trout等人，79 Proc. Natl. Acad.Sci. USA, 626-629 (1982)及Umemoto等人 43 Int. J. Cancer, 677-684 (1989)。此外，肽係由 α -胺基酸及肽鍵組成，肽鍵在化學上為一個胺基酸之甲酸酯與第二個胺基酸之胺基之間的醯胺鍵。應理解其他醯胺鍵(諸如離胺酸之甲酸酯與 ϵ -胺基之間的鍵)不為肽鍵且視為不可裂解。

一些連接子可藉由酯酶裂解，亦即酯酶可裂解連接子。又，某些酯僅可藉由存在於細胞內或外部的酯酶裂解。酯由羧酸與醇縮合而形成。簡單酯為使用簡單醇(諸如脂肪族醇)以及小環狀及小芳族醇產生的酯。

預帶電連接子係衍生自在併入抗體藥結合物中之後保持其電荷的帶電交聯試劑。預帶電連接子之實例可發現於US 2009/0274713中。

3. ADC之結合及製備

本發明之結合物可藉由此項技術中已知之任何方法製備，諸如美國專利第 7,811,572 號、第 6,411,163 號、第 7,368,565 號及第 8,163,888 號及美國申請公開案 2011/0003969、2011/0166319、2012/0253021及2012/0259100中所述之方法。此等專利及專利申請公開案之全部教示內容以引用的方式併入本文中。

201613643

一步法

在一個態樣中，本發明之結合物可藉由一步法製備。方法包含將抗體、藥物及交聯劑合併於適合pH之實質水性介質(視情況含有一或多種共溶劑)中。在一個態樣中，方法包含以下步驟：使本發明抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸而形成包含抗體及藥物的第一混合物，接著使包含抗體及藥物的第一混合物與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在具有約4至約9之pH的溶液中接觸以得到包含(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、磺基-SPDB-DM4，或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物的混合物。

在一個態樣中，一步法包含使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在溶液中接觸，該溶液具有約6或大於6(例如約6至約9、約6至約7、約7至約9、約7至約8.5、約7.5至約8.5、約7.5至約8.0、約8.0至約9.0，或約8.5至約9.0)之pH。舉例而言，方法包含使細胞結合劑與藥物(DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在溶液中接觸，該溶液之pH為約6.0、約6.1、約6.2、約6.3、約6.4、約6.5、約6.6、約6.7、約6.8、約6.9、約7.0、約7.1、約7.2、約7.3、約7.4、約7.5、約7.6、約7.7、約7.8、約7.9、約8.0、約8.1、約8.2、約8.3、約8.4、約8.5、約8.6、約8.7、約8.8、約8.9或約9.0。在另一態樣中，方法包含使細胞結合劑與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在溶液中接觸，該溶液具有約7.8之pH(例如7.6至8.0之pH或7.7至7.9之pH)。

一步法(亦即使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸)可在

201613643

此項技術中已知的任何適合溫度下進行。舉例而言，一步法可在約20°C或小於20°C (例如約-10°C (其限制條件為防止溶液冷凍，例如存在用於溶解細胞毒性劑及雙官能交聯試劑的有機溶劑)至約20°C、約0°C至約18°C、約4°C至約16°C)、在室溫(例如約20°C至約30°C或約20°C至約25°C)下或在高溫(例如約30°C至約37°C)下發生。在一個態樣中，一步法在約16°C至約24°C (例如約16°C、約17°C、約18°C、約19°C、約20°C、約21°C、約22°C、約23°C、約24°C或約25°C)之溫度下方法。在另一態樣中，一步法係在約15°C或小於15°C (例如約-10°C至約15°C，或約0°C至約15°C)之溫度下進行。舉例而言，方法包含在約15°C、約14°C、約13°C、約12°C、約11°C、約10°C、約9°C、約8°C、約7°C、約6°C、約5°C、約4°C、約3°C、約2°C、約1°C、約0°C、約-1°C、約-2°C、約-3°C、約-4°C、約-5°C、約-6°C、約-7°C、約-8°C、約-9°C或約-10°C (其限制條件為防止溶液冷凍，例如存在用於溶解交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、磺基-SPDB、SPDB或CX1-1)的有機溶劑)之溫度下使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸。在一個態樣中，方法包含在約-10°C至約15°C、約0°C至約15°C、約0°C至約10°C、約0°C至約5°C、約5°C至約15°C、約10°C至約15°C，或約5°C至約10°C之溫度下使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸。在另一態樣中，方法包含在約10°C之溫度(例如8°C至12°C之溫度或9°C至11°C之溫度)下使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸。

在一個態樣中，上述接觸如下實現：提供抗體，接著使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸而形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的第一混合物，接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的第一混合

201613643

物與交聯劑(例如 SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸。舉例而言，在一個態樣中，將抗體提供於反應容器中，向反應容器中添加藥物(例如DM1或DM4)(從而接觸抗體)，接著將交聯劑(例如 SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)添加至包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物中(從而接觸包含抗體及藥物的混合物)。在一個態樣中，將抗體提供於反應容器中，且在將抗體提供至容器中之後立即向反應容器中添加藥物(例如DM1或DM4)。在另一態樣中，將抗體提供於反應容器中，且在將抗體提供至容器後的時間間隔(例如細胞結合劑提供至空間之後的約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約40分鐘、約50分鐘、約1小時、約1天或長於1天)之後，向反應容器中添加藥物(例如DM1或DM4)。藥物(例如DM1或DM4)可快速(亦即在短時間間隔內，諸如約5分鐘、約10分鐘)或緩慢(諸如使用泵浦)添加。

接著，在抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後立即，或在抗體與藥物(例如DM1或DM4)之後的一些後續時點(例如約5分鐘至約8小時或長於8小時)，可使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如 SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸。舉例而言，在一個態樣中，在添加藥物(例如DM1或DM4)至包含抗體之反應容器中之後，立即將交聯劑(例如 SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)添加至包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物中。或者，在抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸之後的約5分鐘、約10分鐘、約20分鐘、約30分鐘、約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時或長於8小時，可使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如 SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸。

使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如

201613643

SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸之後，允許反應進行約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或長於24小時(例如約30小時、約35小時、約40小時、約45小時或約48小時)。

在一個態樣中，一步法進一步包含淬滅步驟以淬滅任何未反應之藥物(例如DM1或DM4)及/或未反應之交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)。淬滅步驟典型地在純化結合物之前進行。在一個態樣中，藉由使混合物與淬滅試劑接觸來淬滅混合物。如本文所用，「淬滅試劑」係指與游離藥物(例如DM1或DM4)及/或交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)反應的試劑。在一個態樣中，順丁烯二醯亞胺或鹵乙醯胺淬滅試劑(諸如4-順丁烯二醯亞胺基丁酸、3-順丁烯二醯亞胺基丙酸、N-乙基順丁烯二醯亞胺、碘乙醯胺或碘乙醯胺基丙酸)可用於確保藥物(例如DM1或DM4)中之任何未反應基團(諸如硫醇)淬滅。淬滅步驟可有助於防止藥物(例如DM1)發生二聚。二聚DM1可能難以移除。用極性帶電硫醇淬滅試劑(諸如4-順丁烯二醯亞胺基丁酸或3-順丁烯二醯亞胺基丙酸)淬滅後，未反應之過量DM1轉化成極性帶電水溶性加合物，在純化步驟期間，其可容易與共價連接的結合物分離。亦可使用非極性及中性硫醇淬滅試劑來淬滅。在一個態樣中，藉由使混合物與淬滅試劑接觸來淬滅混合物，該淬滅試劑與未反應之交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)反應。舉例而言，可將親核試劑添加至混合物中以便淬滅任何未反應之SMCC。親核試劑較佳為含有胺基的親核試劑，諸如離胺酸、牛磺酸及羥胺。

201613643

在另一態樣中，在混合物與淬滅試劑接觸之前，允許反應(亦即抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸且接著與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸)進行至完成。就此而言，在使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸之後的約1小時至約48小時(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或約25小時至約48小時)，向混合物中添加淬滅試劑。

或者，藉由將混合物pH降低至約5.0 (例如4.8、4.9、5.0、5.1或5.2)來淬滅混合物。在另一態樣中，藉由將pH降低至小於6.0、小於5.5、小於5.0、小於4.8、小於4.6、小於4.4、小於4.2、小於4.0來淬滅混合物。或者，將pH降低至約4.0 (例如3.8、3.9、4.0、4.1或4.2)至約6.0 (例如5.8、5.9、6.0、6.1或6.2)、約4.0至約5.0、約4.5 (例如4.3、4.4、4.5、4.6或4.7)至約5.0。在一個態樣中，藉由將混合物pH降低至4.8來淬滅混合物。在另一態樣中，藉由將混合物pH降低至5.5來淬滅混合物。

在一個態樣中，一步法進一步包含使未穩定結合之連接子自抗體釋放的保持步驟。保持步驟包含在純化結合物之前(例如在反應步驟之後，在反應步驟與淬滅步驟之間，或在淬滅步驟之後)保持混合物。舉例而言，方法包含(a)使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸以形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物；及接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在具有約4至約9之pH的溶液中接觸，以得到包含(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、磺基-SPDB-

201613643

DM4或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物的混合物；(b)保持步驟(a)中所製備之混合物以使未穩定結合的连接子自細胞結合劑釋放；及(c)純化該混合物以得到經純化之結合物。

在另一態樣中，方法包含(a)使抗體與藥物(例如DM1或DM4)接觸以形成包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物；及接著使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)在具有約4至約9之pH的溶液中接觸，以得到包含(i)結合物、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)及(iii)反應副產物的混合物；(b)淬滅步驟(a)中所製備的混合物以淬滅任何未反應之藥物(例如DM1或DM4)及/或未反應之交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)；(c)保持步驟(b)中所製備之混合物以使未穩定結合之连接子自細胞結合劑釋放；及(d)純化該混合物以得到經純化之結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、Ab-磺基-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)。

或者，可在純化結合物之後進行保持步驟，隨後進行另一純化步驟。

在另一態樣中，保持步驟之前，允許反應進行至完成。就此而言，在使包含抗體及藥物(例如DM1或DM4)的混合物與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸之後的約1小時至約48小時(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約11小時、約12小時、約13小時、約14小時、約15小時、約16小時、約17小時、約18小時、約19小時、約20小時、約21小時、約22小時、約23小時、約24小時或約24小時至約48小時)，可進行保持步驟。

保持步驟包含使溶液在適合溫度(例如約0°C至約37°C)維持適合

201613643

時間段(例如約1小時至約1週、約1小時至約24小時、約1小時至約8小時，或約1小時至約4小時)以使未穩定結合的连接子自抗體釋放，同時不使穩定結合的连接子自抗體實質性釋放。在一個態樣中，保持步驟包含使溶液在約20°C或低於20°C(例如約0°C至約18°C，約4°C至約16°C)、在室溫(例如約20°C至約30°C，或約20°C至約25°C)下，或在高溫(例如約30°C至約37°C)下維持。在一個態樣中，保持步驟包含使溶液在約16°C至約24°C(例如約15°C、約16°C、約17°C、約18°C、約19°C、約20°C、約21°C、約22°C、約23°C、約24°C或約25°C)之溫度下維持。在另一態樣中，保持步驟包含使溶液在約2°C至約8°C(例如約0°C、約1°C、約2°C、約3°C、約4°C、約5°C、約6°C、約7°C、約8°C、約9°C或約10°C)之溫度下維持。在另一態樣中，保持步驟包含使溶液在約37°C之溫度(例如約34°C、約35°C、約36°C、約37°C、約38°C、約39°C或約40°C)下維持。

保持步驟之持續時間視保持步驟所進行之溫度及pH而定。舉例而言，保持步驟之持續時間可藉由在高溫下進行保持步驟而實質性縮短，其最高溫度受到細胞結合劑-細胞毒性劑結合物的穩定性限制。保持步驟可包含使溶液維持約1小時至約1天(例如約1小時、約2小時、約3小時、約4小時、約5小時、約6小時、約7小時、約8小時、約9小時、約10小時、約12小時、約14小時、約16小時、約18小時、約20小時、約22小時或約24小時)、約10小時至約24小時、約12小時至約24小時、約14小時至約24小時、約16小時至約24小時、約18小時至約24小時、約20小時至約24小時、約5小時至約1週、約20小時至約1週、約12小時至約1週(例如約12小時、約16小時、約20小時、約24小時、約2天、約3天、約4天、約5天、約6天或約7天)，或約1天至約1週。

在一個態樣中，保持步驟包含使溶液在約2°C至約8°C之溫度下

201613643

維持至少約12小時之時段，最長一週。在另一態樣中，保持步驟包含使溶液在約2°C至約8°C之溫度下維持隔夜(例如約12至約24小時，較佳約20小時)。

保持步驟中之pH值較佳為約4至約10。在一個態樣中，保持步驟中之pH值為約4或大於4，但小於約6(例如4至5.9)，或約5或大於5，但小於約6(例如5至5.9)。在另一態樣中，保持步驟中之pH值在約6至約10之範圍內(例如約6.5至約9，約6至約8)。舉例而言，保持步驟中之pH值可為約6、約6.5、約7、約7.5、約8、約8.5、約9、約9.5或約10。

在其他態樣中，保持步驟可包含將混合物在25°C、在約6-7.5之pH下培育約12小時至約1週；將混合物在4°C、在約4.5-5.9之pH下培育約5小時至約5天；或將混合物在25°C、在約4.5-5.9之pH下培育約5小時至約1天。

一步法可視情況包括添加蔗糖至反應步驟中以增大結合物之溶解度及回收率。蔗糖宜以約0.1% (w/v)至約20% (w/v)(例如約0.1% (w/v)、1% (w/v)、5% (w/v)、10% (w/v)、15% (w/v)或20% (w/v))的濃度添加。蔗糖較佳以約1% (w/v)至約10% (w/v)(例如約0.5% (w/v)、約1% (w/v)、約1.5% (w/v)、約2% (w/v)、約3% (w/v)、約4% (w/v)、約5% (w/v)、約6% (w/v)、約7% (w/v)、約8% (w/v)、約9% (w/v)、約10% (w/v)或約11% (w/v))的濃度添加。另外，反應步驟亦可包含添加緩衝劑。可使用此項技術中已知的任何適合緩衝劑。適合緩衝劑包括例如檸檬酸鹽緩衝劑、乙酸鹽緩衝劑、丁二酸鹽緩衝劑及磷酸鹽緩衝劑。在一個態樣中，緩衝劑選自由以下組成之群：HEPPSO (N-(2-羥基乙基)哌嗪-N'-(2-羥基丙磺酸))、POPSO (哌嗪-1,4-雙(2-羥基-丙烷-磺酸)脫水物)、HEPES (4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-乙烷磺酸)、HEPPS (EPPS)(4-(2-羥基乙基)哌嗪-1-丙磺酸)、TES (N-[參(羥基甲基)甲基]-

201613643

2-胺基乙烷磺酸)，及其組合。

一步法可進一步包含純化混合物之步驟以得到經純化之結合物(例如 Ab MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、Ab-磺基-SPDB-DM4或 Ab-CX1-1-DM1)。此項技術中已知之任何純化方法可用於純化本發明之結合物。在一個態樣中，本發明之結合物係使用切向流過濾(TFF)、非吸附性層析、吸附性層析、吸附性過濾、選擇性沈澱，或任何其他適合的純化方法，以及其組合。在另一態樣中，在對結合物進行上述純化方法之前，首先使結合物經由一或多個PVDF膜過濾。或者，在對結合物進行上述純化方法之後，使結合物經由一或多個PVDF膜過濾。舉例而言，在一個態樣中，使結合物經由一或多個PVDF膜過濾且接著使用切向流過濾加以純化。或者，結合物使用切向流過濾加以純化且接著經由一或多個PVDF膜過濾。

純化可使用任何適合TFF系統，包括Pellicon®型系統(Millipore, Billerica, MA)、Sartocon®卡匣系統(Sartorius AG, Edgewood, NY)及Centrasette®型系統(Pall Corp., East Hills, NY)。

純化可使用任何適合的吸附性層析樹脂。較佳吸附性層析樹脂包括羥基磷灰石層析、疏水性電荷誘導層析(HCIC)、疏水性相互作用層析(HIC)、離子交換層析、混合模式離子交換層析、固著金屬親和層析(IMAC)、染料配位體層析、親和層析、逆相層析，及其組合。適合羥基磷灰石樹脂之實例包括陶瓷羥基磷灰石(CHT I型及II型，Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)、HA Ultrogel®羥基磷灰石(Pall Corp., East Hills, NY)及陶瓷氟磷灰石(CFT I型及II型，Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合HCIC樹脂之實例為MEP Hypercel®樹脂(Pall Corp., East Hills, NY)。適合HIC樹脂之實例包括丁基-瓊脂糖、己基-瓊脂糖、苯基-瓊脂糖及辛基瓊脂糖樹脂(皆得自GE Healthcare, Piscataway, NJ)，以及Macro-prep®甲基樹脂及Macro-

201613643

Prep®第三丁基樹脂(Biorad Laboratories, Hercules, CA)。適合離子交換樹脂之實例包括SP-Sepharose®、CM-Sepharose®及Q-Sepharose®樹脂(皆得自GE Healthcare, Piscataway, NJ)，以及Unosphere® S樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合的混合模式離子交換器之實例包括Bakerbond®ABx樹脂(JT Baker, Phillipsburg NJ)。適合IMAC樹脂之實例包括螯合型Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)及Profinity® IMAC樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合染料配位體樹脂之實例包括藍色瓊脂糖樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)及親和凝膠藍色樹脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA)。適合親和樹脂之實例包括蛋白質A瓊脂糖樹脂(例如MabSelect, GE Healthcare, Piscataway, NJ)及凝集素親和樹脂，例如扁豆凝集素Sepharose®樹脂(GE Healthcare, Piscataway, NJ)，其中抗體具有適當的凝集素結合位點。適合逆相樹脂之實例包括C4、C8及C18樹脂(Grace Vydac, Hesperia, CA)。

純化可使用任何適合的非吸附性層析樹脂。適合的非吸附性層析樹脂之實例包括(但不限於)SEPHADEX™ G-25、G-50、G-100；SEPHACRYL™樹脂(例如S-200及S-300)；SUPERDEX™樹脂(例如SUPERDEX™ 75及SUPERDEX™ 200)；BIO-GEL®樹脂(例如P-6、P-10、P-30、P-60及P-100)，及一般熟習此項技術者已知的其他樹脂。

兩步法及一鍋法

在一個態樣中，本發明之結合物可如美國專利7,811,572及美國專利申請公開案第2006/0182750號中所述製備。方法包含以下步驟：
(a)使本發明之抗體與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)接觸以使連接子(亦即Ab-SMCC、Ab-SPDB或Ab-CX1-1)共價連接至抗體且從而製備包含結合有連接子之抗體的第一混合物；
(b)視情況對第一混合物進行純化方法以製備結合有連接子之抗

201613643

體之經純化第一混合物；(c)使藥物(例如DM1或DM4)與第一混合物中之結合有連接子之抗體結合，此係藉由使結合有連接子之抗體與藥物(例如DM1或DM4)在具有約4至約9之pH的溶液中反應以製備第二混合物，該第二混合物包含(i)結合物(例如Ab-MCC-DM1、Ab-SPDB-DM4、Ab-磺基-SPDB-DM4或Ab-CX1-1-DM1)、(ii)游離藥物(例如DM1或DM4)；及(iii)反應副產物；及(d)對第二混合物進行純化方法以自第二混合物中之其他組分純化結合物。或者，可省略純化步驟(b)。本文所述之任何純化方法可用於步驟(b)及(d)。在一個實施例中，步驟(b)與(d)均使用TFF。在另一個實施例中，步驟(b)使用TFF且步驟(d)使用吸收性層析(例如CHT)。

一步法試劑及原位法

在一個態樣中，本發明之結合物可藉由使預形成之藥物-連接子化合物(例如SMCC-DM1、磺基-SMCC-DM1、SPDB-DM4、磺基-SPDB-DM4或CX1-1-DM1)與本發明抗體結合(如美國專利6,441,163及美國專利申請公開案第2011/0003969號及第2008/0145374號中所述)，隨後進行純化步驟來製備。可使用本文所述之任何純化方法。藥物-連接子化合物係由藥物(例如DM1或DM4)與交聯劑(例如SMCC、磺基-SMCC、SPDB、磺基-SPDB或CX1-1)反應而製備。藥物-連接子化合物(例如SMCC-DM1、磺基-SMCC-DM1、SPDB-DM4、磺基-SPDB-DM4或CX1-1-DM1)在與抗體結合之前，視情況進行純化。

4.所要抗體及抗體藥結合物之表徵及選擇

本發明之抗體、抗體片段(例如抗原結合片段)或抗體藥結合物可藉由此項技術中已知的各種分析、根據其物理/化學特性及/或生物學活性加以表徵及選擇。

舉例而言，本發明抗體可藉由已知方法(諸如ELISA、FACS、Biacore或西方墨點法)測試其抗原結合活性。

201613643

轉殖基因動物及細胞株特別適用於篩選具有預防性或治療性治療過度表現腫瘤相關抗原及細胞表面受體之癌症之潛力的抗體藥結合物(ADC)。篩選適用ADC可包括將一系列劑量的候選ADC投與轉殖基因動物及在不同時間點分析ADC對所評估疾病或病症的作用。或者或另外，適用時，可在暴露於疾病誘導物之前或同時投與藥物。候選ADC可在中或高處理量篩選形式下依序及個別地或並行篩選。

一個態樣為篩選方法，其包含(a)將源於表現CDH6之穩定癌細胞株或人類患者腫瘤的細胞(例如卵巢細胞株或腫瘤片段、腎細胞株或腫瘤片段、肝細胞株或腫瘤片段、甲狀腺細胞株或腫瘤片段、卵巢、腎、肝或甲狀腺初級細胞)移植入非人類動物中；(b)向非人類動物投與候選ADC藥物及(c)測定候選藥物抑制源於所移植細胞株之腫瘤生長的能力。本發明亦涵蓋一種篩選用於治療以CDH6之過度表現為特徵之疾病或病症之候選ADC的方法，包含(a)使源於表現CDH6之穩定癌細胞株之細胞與候選藥物接觸，及(b)評價候選ADC抑制穩定細胞株生長的能力。

另一態樣為一種篩選方法，包含(a)使源於表現CDH6之穩定癌細胞株的細胞與候選ADC藥物接觸及(b)評價候選ADC誘導細胞死亡的能力。在一個態樣中，評價候選ADC誘導細胞凋亡的能力。

可藉由投與轉殖基因動物一系列劑量及評價動物隨時間對化合物之生理反應來篩選候選ADC。在一些情況下，將化合物連同增強化合物功效之輔因子一起投與可為適當的。若源於個體轉殖基因動物之細胞株用於篩選適用於治療與CDH6之過度表現相關之各種病症的ADC，則在適當時間向細胞培養基中添加測試ADC，且使用適當生物化學及/或組織學分析，評價隨時間對ADC之細胞反應。

因此，本發明提供用於鑑別特異性靶向且結合至CDH6及腫瘤細胞上之CDH6過度表現之ADC的分析。

201613643

CDH6抗體

本發明提供特異性結合至人類CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)。本發明之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包括(但不限於)如下文實例中所述之人類單株抗體或其片段。

在某些態樣中，本發明提供特異性結合CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230或240的VH域(表5及6)。本發明亦提供特異性結合至CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有表5及6中所列之任一VH CDR之胺基酸序列的VH CDR。在特定態樣中，本發明提供特異性結合至CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體包含(或者，組成為)一個、兩個、三個、四個、五個或多於五個具有表5及6中所列之任一VH CDR之胺基酸序列的VH CDR。

本發明提供特異性結合至CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有胺基酸序列SEQ ID NO: 21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231或241的VL域(表5及6)。本發明亦提供特異性結合至CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含具有下文表1中所列之任一VL CDR之胺基酸序列的VL CDR。特定言之，本發明提供特異性結合至CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)，該等抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含(或者，組成為)一個、兩個、三個或多於三個具有表5及6中所列之任一VL CDR之胺基酸序列的VL CDR。

201613643

本發明之其他抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包括已突變、然而在CDR區域中具有與表5及6中所述之序列中所描繪之CDR區域至少60%、70%、80%、90%或95%一致性的胺基酸。在一些態樣中，其包括突變型胺基酸序列，其中相較於表5及6所述序列中所描繪之CDR區域，CDR區域中不超過1個、2個、3個、4個或5個胺基酸已突變。

本發明亦提供編碼特異性結合至CDH6之抗體之VH、VL、全長重鏈及全長輕鏈的核酸序列。此等核酸序列可根據在哺乳動物細胞中之表現加以最佳化。

本發明之其他抗體包括其中胺基酸或編碼胺基酸之核酸已發生突變、但與5及6中所述之序列具有至少60%、70%、80%、90%或95%一致性的抗體。在一些態樣中，其包括突變型胺基酸序列，其中相較於5及6中所述序列中所描繪之可變區，可變區中不超過1、2、3、4或5個胺基酸已發生突變，然而保持實質上相同治療活性。

由於此等抗體中之每一者可結合至CDH6，因此VH、VL、全長輕鏈及全長重鏈序列(胺基酸序列及編碼胺基酸序列之核苷酸序列)可經「混合及匹配」，以產生其他CDH6結合抗體。此類「經混合及匹配」之CDH6結合抗體可使用此項技術中已知之結合分析(例如ELISA及實例章節中所述之其他分析)來測試。當此等鏈混合及匹配時，來自特定VH/VL對之VH序列應經結構上類似之VH序列置換。同樣，來自特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長重鏈序列應經結構上類似之全長重鏈序列置換。同樣，來自特定VH/VL對之VL序列應經結構上類似之VL序列置換。同樣，來自特定全長重鏈/全長輕鏈對之全長輕鏈序列應經結構上類似之全長輕鏈序列置換。因此，在一個態樣中，本發明提供經分離之單株抗體或其抗原結合區，其具有：重鏈可變區，包含選自由SEQ ID NO: 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、

201613643

230或240組成之群的胺基酸序列(表5及6)；及輕鏈可變區，包含選自由SEQ ID NO: 21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231或241組成之群的胺基酸序列(表5及6)；其中該抗體特異性結合至CDH6。

在另一態樣中，本發明提供(i)經分離之單株抗體，其具有：全長重鏈，包含根據在哺乳動物細胞中之表現已最佳化的胺基酸序列，該胺基酸序列選自由SEQ ID NO: 20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240組成之群；及全長輕鏈，包含根據在哺乳動物細胞中之表現已最佳化的胺基酸序列，該胺基酸序列選自由SEQ ID NO: 21、31、41、51、61、71、81、91、101、111、121、131、141、151、161、171、181、191、201、211、221、231或241組成之群；或(ii)包含其抗原結合部分的功能蛋白。

在另一態樣中，本發明提供CDH6結合抗體，其包含如表5及6中所述的重鏈及輕鏈CDR1s、CDR2s及CDR3s，或其組合。抗體之VH CDR1s之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227及237中。抗體之VH CDR2s之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、118、128、138、148、158、168、178、188、198、208、218、228及238中。抗體之VH CDR3之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229及239中。抗體之VL CDR1s之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224及234中。抗體之VL CDR2s之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO 15、

201613643

25、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、135、145、155、165、175、185、195、205、215、225及235中。抗體之VL CDR3s之胺基酸序列顯示於SEQ ID NO: 16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226及236中。

鑒於此等抗體中之每一者可結合至CDH6且抗原結合特異性主要由CDR1、2及3區域提供，因此VH CDR1、2及3序列與VL CDR1、2及3序列可「混合及匹配」(亦即來自不同抗體的CDR可混合及匹配)，然而各抗體必須含有VH CDR1、2及3以及VL CDR1、2及3以產生其他C5結合分子。此類「經混合及匹配」之CDH6結合抗體可使用此項技術中已知之結合分析及實例中所述之分析(例如ELISA)來測試。當VH CDR序列混合及匹配時，來自特定VH序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應經結構上類似之CDR序列置換。同樣，當VL CDR序列混合及匹配時，來自特定VL序列之CDR1、CDR2及/或CDR3序列應經結構上類似之CDR序列置換。一般技術者顯而易知，新穎VH及VL序列可藉由用選自本文中針對本發明之單株抗體所示之CDR序列之結構類似序列取代一或多個VH及/或VL CDR區序列來產生。

因此，本發明提供經分離之單株抗體或其抗原結合區，其包含重鏈CDR1，包含選自由SEQ ID NO: 17、27、37、47、57、67、77、87、97、107、117、127、137、147、157、167、177、187、197、207、217、227及237組成之群的胺基酸序列；重鏈CDR2，包含選自由SEQ ID NO: 18、28、38、48、58、68、78、88、98、108、118、128、138、148、158、168、178、188、198、208、218、228及238組成之群的胺基酸序列；重鏈CDR3，包含選自由SEQ ID NO: 19、29、39、49、59、69、79、89、99、109、119、129、139、149、159、169、179、189、199、209、219、229及239組成之群的胺基酸序列；

201613643

輕鏈CDR1，包含選自由SEQ ID NO: 14、24、34、44、54、64、74、84、94、104、114、124、134、144、154、164、174、184、194、204、214、224及234組成之群的胺基酸序列；輕鏈CDR2，包含選自由SEQ ID NO: 15、25、35、45、55、65、75、85、95、105、115、125、135、145、155、165、175、185、195、205、215、225及235組成之群的胺基酸序列；及輕鏈CDR3，包含選自由SEQ ID NO: 16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146、156、166、176、186、196、206、216、226及236組成之群的胺基酸序列；其中該抗體特異性結合CDH6。

在一個特定態樣中，特異性結合至CDH6的抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)包含：

(i)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 164之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 165之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 166之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 167之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 168之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 169之HCDR3；

(ii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 154之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 155之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 156之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 157之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 158之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 159之HCDR3；

(iii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 14之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 15之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 16之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 17之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 18之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 19之HCDR3；

(iv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 24之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 25之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 26之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 27之HCDR1、(e)

201613643

SEQ ID NO: 28之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 29之HCDR3；

(v)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 34之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 35之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 36之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 37之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 38之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 39之HCDR3；

(vi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 44之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 45之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 46之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 47之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 48之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 49之HCDR3；

(vii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 54之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 55之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 56之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 57之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 58之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 59之HCDR3；

(viii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 64之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 65之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 66之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 67之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 68之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 69之HCDR3；

(ix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 74之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 75之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 76之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 77之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 78之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 79之HCDR3；

(x)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 84之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 85之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 86之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 87之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 88之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 89之HCDR3；

(xi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 94之LCDR1 (CDR-互補

201613643

決定區)、(b) SEQ ID NO: 95之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 96之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 97之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 98之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 99之HCDR3；

(xii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 104之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 105之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 106之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 107之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 108之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 109之HCDR3；

(xiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 114之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 115之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 116之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 117之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 118之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 119之HCDR3；

(xiv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 124之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 125之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 126之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 127之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 128之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 129之HCDR3；

(xv)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 134之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 135之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 136之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 137之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 138之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 139之HCDR3；

(xvi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 144之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 145之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 146之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 147之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 148之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 149之HCDR3；

(xvii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 174之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 175之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 176之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 177之HCDR1、(e)

201613643

SEQ ID NO: 178之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 179之HCDR3；

(xviii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 184之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 185之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 186之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 187之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 188之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 189之HCDR3；

(xix)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 194之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 195之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 196之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 197之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 198之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 199之HCDR3；

(xx)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 204之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 205之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 206之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 207之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 208之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 209之HCDR3；

(xxi)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 214之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 215之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 216之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 217之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 218之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 219之HCDR3；

(xxii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 224之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 225之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 226之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 227之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 228之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 229之HCDR3；或

(xxiii)輕鏈可變區，其包含(a) SEQ ID NO: 234之LCDR1 (CDR-互補決定區)、(b) SEQ ID NO: 235之LCDR2、(c) SEQ ID NO: 236之LCDR3；及重鏈可變區，其包含：(d) SEQ ID NO: 237之HCDR1、(e) SEQ ID NO: 238之HCDR2及(f) SEQ ID NO: 239之HCDR3。

在某些態樣中，特異性結合至CDH6的抗體為表5及/或6中所述之

201613643

抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)。

1. 鑑別抗原決定基及結合至相同抗原決定基的抗體

本發明提供結合至CDH6胞外域內之抗原決定基的抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)。在某些態樣中，抗體及抗體片段可結合至CDH6胞外域之域內的抗原決定基。

本發明亦提供與表5及6中所述之抗CDH6抗體結合至相同抗原決定基的抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)。其他抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)因此可在CDH6結合分析中根據其與其他抗體交叉競爭(例如以統計顯著方式競爭性地抑制結合)的能力來鑑別。測試抗體抑制本發明抗體及抗體片段(例如抗原結合片段)結合至CDH6蛋白質(例如人類CDH6)的能力表明，測試抗體可與該抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)競爭結合至CDH6；根據非限制性理論，此類抗體可與其所競爭之抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)結合至CDH6蛋白質上之相同或相關(例如結構上類似或空間上鄰近)的抗原決定基。在一個特定態樣中，與本發明抗體或抗體片段(例如抗原結合片段)結合至CDH6上之相同抗原決定基的抗體為人類或人類化單株抗體。此人類或人類化單株抗體可如本文所述製備及分離。

2. Fc區之構架之進一步改變

本發明提供經標記之位點特異性免疫結合物。此等免疫結合物可包含經修飾之抗體或其抗原結合片段，其進一步包含VH及/或VL內之構架殘基之修飾，例如以改良抗體特性。典型地進行此類構架修飾以降低抗體之免疫原性。舉例而言，一種方法為使一或多個構架殘基「回復突變」成相應生殖系序列。更特定言之，已經歷體細胞突變之抗體可含有不同於抗體所來源之生殖系序列的構架殘基。此類殘基可藉由比較抗體構架序列與抗體所來源之生殖系序列來鑑別。為了使構架區序列恢復其生殖系組態，體細胞突變可藉由例如定點突變誘發

201613643

「回復突變」為生殖系序列。亦希望涵蓋此「回復突變」抗體。

另一類型的構架修飾包括使構架區內或甚至一或多個CDR區內之一或多個殘基突變，以移除T細胞抗原決定基，以藉此降低抗體之潛在免疫原性。此方法亦稱為「去免疫」，且進一步詳細描述於Carr等人之美國專利公開案第2003/0153043號中。

除構架或CDR區域內發生之修飾之後或作為其替代方案，抗體可經工程改造以包括Fc區內之修飾，典型地以改變抗體之一或多種功能特性，諸如血清半衰期、補體結合、Fc受體結合及/或抗原依賴性細胞之細胞毒性。此外，抗體可經化學修飾(例如一或多個化學部分可連接至抗體)或經修飾以改變其糖基化，以再次改變抗體之一或多種功能特性。此等態樣中之每一者進一步詳細描述於下文中。

在一個態樣中，CH1之鉸鏈區經修飾，以使得鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數改變，例如增加或減少。此方法進一步描述於Bodmer等人之美國專利第5,677,425號中。CH1鉸鏈區中之半胱胺酸殘基數經改變以例如促進輕鏈與重鏈組裝或提高或降低抗體之穩定性。

在另一態樣中，抗體之Fc鉸鏈區經突變以縮短抗體之生物半衰期。更特定言之，將一或多個胺基酸突變引入Fc鉸鏈片段之CH2-CH3域界面區域中，使得抗體對葡萄球菌蛋白質A (SpA)的結合相對於原生Fc鉸鏈域SpA結合而言減弱。此方法進一步詳細描述於Ward等人之美國專利第6,165,745號中。

在又其他態樣中，Fc區藉由用不同胺基酸殘基置換至少一個胺基酸殘基來改變，以改變抗體之效應功能。舉例而言，一或多個胺基酸可經不同胺基酸殘基置換以使得該抗體具有改變之針對效應子配位體的親和力、但保留親本抗體之抗原結合能力。親和力改變之效應配位體可為例如Fc受體或補體之C1組分。此方法描述於例如Winter等人之美國專利第5,624,821號與第5,648,260號中。

201613643

在另一態樣中，選自胺基酸殘基之一或多個可經不同胺基酸殘基置換，以使得抗體具有改變之C1q結合及/或減弱或消除之補體依賴性細胞毒性(CDC)。此方法描述於例如Idusogie等人之美國專利第6,194,551號中。

在另一態樣中，一或多個胺基酸殘基經改變以藉此改變抗體固定補體之能力。此方法描述於例如Bodmer等人之PCT公開案WO 94/29351中。在一個特定態樣中，本發明之抗體或其抗原結合片段之一或多個胺基酸經IgG1子類及κ同型之一或多個異型胺基酸殘基置換。異型胺基酸殘基亦包括(但不限於) IgG1、IgG2及IgG3子類之重鏈之恆定區以及κ同型之輕鏈之恆定區，如Jefferis等人, MAbs. 1:332-338 (2009)所述。

在又一態樣中，Fc區經修飾以提高抗體介導抗體依賴性細胞之細胞毒性(ADCC)之能力及/或藉由修飾一或多個胺基酸來提高抗體對Fcγ受體之親和力。此方法描述於例如Presta之PCT公開案WO 00/42072中。此外，IgG1上之針對FcγR1、FcγR2、FcγR3及FcRn之結合位點已經定位且具有改良之結合的變異體已有描述(參見Shields等人, J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001)。

在另一態樣中，抗體之糖基化經修飾。舉例而言，可產生去糖基化抗體(亦即，缺乏糖基化之抗體)。糖基化可經改變以例如提高抗體對「抗原」之親和力。此類碳水化合物修飾可藉由例如改變抗體序列內之一或多個糖基化位點來實現。舉例而言，可進行一或多個胺基酸取代，從而排除一或多個可變區構架糖基化位點，以藉此消除該位點之糖基化。此類去糖基化可提高抗體對抗原之親和力。此類方法描述於例如Co等人之美國專利第5,714,350號及第6,350,861號中。

另外或可替代地，可產生糖基化類型改變之抗體，諸如海藻糖基殘基量減少之低海藻糖基化抗體或二分GlcNac結構增加之抗體。已

201613643

證明此類經改變之糖基化模式會提高抗體之ADCC能力。此類碳水化合物修飾可藉由例如在具有經改變之糖基化機構之宿主細胞中表現抗體來實現。具有經改變之糖基化機構之細胞已描述於此項技術中，且可用作表現本發明之重組抗體以藉此產生具有經改變之糖基化之抗體的宿主細胞。舉例而言，Hang等人之EP 1,176,195描述一種細胞株，其中編碼海藻糖基轉移酶之FUT8基因在功能上中斷，使得此細胞株中所表現之抗體展現低海藻糖基化。Presta之PCT公開案WO 03/035835描述一種變異型CHO細胞株(Lec13細胞)，其中海藻糖連接至Asn(297)連接型碳水化合物的能力降低，亦導致該宿主細胞中所表現之抗體產生低海藻糖基化(亦參見Shields等人, (2002) J. Biol. Chem. 277:26733-26740)。Umana等人之PCT公開案WO 99/54342描述經工程改造以表現醣蛋白修飾型醣基轉移酶(例如 $\beta(1,4)$ -N乙醯基葡萄糖胺轉移酶III (GnTIII))的細胞株，使得經工程改造之細胞株內所表現之抗體展現增加之二分GlcNac結構，從而提高抗體之ADCC活性(亦參見Umana等人，Nat. Biotech. 17:176-18, 19990)。

在另一態樣中，抗體經修飾以延長其生物半衰期。多種方法具可能性。舉例而言，可引入以下突變中之一或多者：T252L、T254S、T256F，如Ward之美國專利第6,277,375號中所述。或者，為了延長生物半衰期，抗體可在CH1或CL區內改變以含有獲自IgG之Fc區之CH2域之兩個環的救助受體結合抗原決定基，如Presta等人之美國專利第5,869,046號及第6,121,022號中所述。

為了使抗體之ADCC活性最小化，Fc區中之特定突變產生與效應細胞具有最小相互作用的「Fc靜默」抗體。一般而言，「IgG Fc區」用於定義免疫球蛋白重鏈之C末端區域，包括原生序列Fc區及變異型Fc區域。人類IgG重鏈Fc區一般定義為包含IgG抗體之位置C226或P230至羧基末端的胺基酸殘基。Fc區中之殘基編號為Kabat之EU索引

201613643

之編號。Fc區之C末端離胺酸(殘基K447)可例如在抗體產生或純化期間移除。

靜默之效應功能可藉由抗體Fc區中之突變來獲得且已描述於此項技術中：LALA及N297A (Strohl, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. 第20卷(6):685-691)；及D265A (Baudino等人, 2008, J. Immunol. 181: 6664-69)，亦參見Heusser等人，WO2012065950。靜默Fc IgG1抗體之實例為IgG1 Fc胺基酸序列中包含L234A及L235A突變的LALA突變體。靜默IgG1抗體之另一實例為DAPA (D265A，P329A)突變(US 6,737,056)。另一靜默IgG1抗體包含N297A突變，其產生去糖基化/非糖基化抗體。

Fc靜默抗體不產生ADCC活性或產生的ADCC活性低，此意謂Fc靜默抗體展現低於50%特異性細胞溶解之ADCC活性；無ADCC活性意謂Fc靜默抗體展現低於1%的ADCC活性(特異性細胞溶解)。

3. CDH6抗體之產生

抗CDH6抗體及其抗體片段(例如抗原結合片段)可藉由此項技術中已知之任何方式產生，包括(但不限於)重組表現、化學合成及抗體四聚體之酶促消化，而全長單株抗體可藉由例如融合瘤或重組產生來獲得。重組表現可獲自此項技術中已知的任何適當宿主細胞，例如哺乳動物宿主細胞、細菌宿主細胞、酵母宿主細胞、昆蟲宿主細胞等。

本發明進一步提供編碼本文所述抗體之聚核苷酸，例如編碼包含如本文所述之互補決定區之重鏈或輕鏈可變區或區段的聚核苷酸。在一些態樣中，編碼重鏈可變區之聚核苷酸與選自由SEQ ID NO: 22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232及242組成之群的聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。在一些態樣中，編

201613643

碼輕鏈可變區之聚核苷酸與選自由SEQ ID NO: 23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、153、163、173、183、193、203、213、223、233及243組成之群的聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。

在一些態樣中，編碼重鏈之聚核苷酸與SEQ ID NO: 22、32、42、52、62、72、82、92、102、112、122、132、142、152、162、172、182、192、202、212、222、232及242之聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。在一些態樣中，編碼輕鏈之聚核苷酸與SEQ ID NO: 23、33、43、53、63、73、83、93、103、113、123、133、143、153、163、173、183、193、203、213、223、233及243之聚核苷酸具有至少85%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%核酸序列一致性。

本發明之聚核苷酸僅可編碼抗CDH6抗體之可變區序列。其亦可編碼抗體之可變區與恆定區。一些聚核苷酸序列編碼包含例示性抗CDH6抗體之一之重鏈與輕鏈之可變區的多肽。一些其他聚核苷酸編碼與小鼠抗體之一之重鏈及輕鏈之可變區分別實質性一致的兩個多肽區段。

聚核苷酸序列可藉由重新固相DNA合成或藉由編碼抗CDH6抗體或其結合片段之現有序列(例如如下文實例中所述之序列)之PCR突變誘發來產生。核酸之直接化學合成可藉由此項技術中已知之方法實現，諸如Narang等人，Meth. Enzymol. 68:90, 1979之磷酸三酯法；Brown等人，Meth. Enzymol. 68:109, 1979之磷酸二酯法；Beaucage等人，Tetra. Lett., 22:1859, 1981之胺基磷酸二乙酯法；及美國專利第4,458,066號之固體載體法。藉由PCR將突變引入聚核苷酸序列中可如

201613643

以下文獻中所述進行：例如 PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, H.A. Erlich (編), Freeman Press, NY, NY, 1992；PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications, Innis等人(編), Academic Press, San Diego, CA, 1990；Mattila等人, Nucleic Acids Res. 19:967, 1991；及 Eckert等人, PCR Methods and Applications 1:17, 1991。

本發明亦提供用於產生上述抗CDH6抗體之表現載體及宿主細胞。不同表現載體可用於表現編碼抗CDH6抗體鏈或結合片段之聚核苷酸。基於病毒之表現載體與非病毒表現載體均可用於在哺乳動物宿主細胞中產生抗體。非病毒載體及系統包括質體、游離型載體，其典型地具有用於表現蛋白質或RNA及人類人工染色體的表現卡匣(參見例如 Harrington等人, Nat Genet 15:345, 1997)。舉例而言，適用於在哺乳動物(例如人類)細胞中表現抗CDH6聚核苷酸及多肽之非病毒載體包括 pThioHis A、B及C、pcDNA3.1/His、pEBVHis A、B及C (Invitrogen, San Diego, CA)、MPSV載體及此項技術中已知用於表現其他蛋白質之許多其他載體。適用的病毒載體包括基於逆轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒之載體；基於SV40、乳頭狀瘤病毒、HBP埃-巴二氏病毒(HBP Epstein Barr virus)、牛痘病毒載體及勝利基森林病毒(Semliki Forest virus；SFV)之載體。參見Brent等人，同上；Smith, Annu. Rev. Microbiol. 49:807, 1995；及 Rosenfeld等人, Cell 68:143, 1992。

表現載體之選擇視欲表現載體之預定宿主細胞而定。典型地，表現載體含有可操作地連接於編碼抗CDH6抗體鏈或片段之聚核苷酸的啟動子及其他調節序列(例如增強子)。在一些態樣中，除在誘導條件下之外，誘導性啟動子用於防止所插入序列表現。誘導性啟動子包括例如阿拉伯糖、lacZ、金屬硫蛋白啟動子或熱休克啟動子。經轉形