

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **034414**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.02.05

(21) Номер заявки
201491352

(22) Дата подачи заявки
2013.01.09

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ ТРОЙНОГО НЕГАТИВНОГО РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

(31) **61/584,629**

(32) **2012.01.09**

(33) **US**

(43) **2015.01.30**

(86) **PCT/CA2013/000011**

(87) **WO 2013/104050 2013.07.18**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (СН)

(72) Изобретатель:
**Трембл Жилль Бернар, Морайтис
Анна Н., Филион Марио (СА)**

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) **WO-A1-2010060186**
WO-A1-2011054112
US-A1-20110223107
WO-A1-2012129668
WO-A1-2007147265

PILLAI, S.K.K. ET AL. "Triple-negative breast cancer is associated with EGFR, CK5/6 and c-KIT expression in Malaysian women", BMC Clinical Pathology 26 September 2012 (26-09-2012), 12(18), pages 12-18

SETON-ROGERS, S. ET AL. "On the origins of tumour subtypes", Nature Reviews Cancer October 2007 (10-2007), 7

(57) В изобретении на клетки рака молочной железы, у которых отсутствует экспрессия белка ER, экспрессия белка PgR и/или которые демонстрируют отсутствие избыточной экспрессии белка HER2 (т.е. клетки тройного негативного рака молочной железы, базальноподобные), может быть эффективно нацелено антитело к КААG1, причем указанные клетки уничтожаются вследствие доставки терапевтической частицы. Антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые специфически связываются с КААG1, таким образом могут быть применены для обнаружения и терапевтического лечения клеток рака молочной железы, являющихся негативными по меньшей мере для одного из этих маркеров. В изобретении раскрыто применение конъюгатов антитела в лечении тройного негативного рака молочной железы и/или базальноподобного рака молочной железы.

B1**034414****034414****B1**

Предпосылки изобретения

Ежегодно во всем мире диагноз "рак молочной железы" ставят более чем 1 млн женщин. Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой одно из самых гетерогенных заболеваний, состоящее из десятков различных типов рака, которые различают, используя гистологическую систему классификации. Обширный подтип и большинство случаев РМЖ гистологически определяются как люминальный А и люминальный В, которые в общем могут быть охарактеризованы наличием экспрессии рецептора эстрогена (ER) с низкой степенью или более высокой степенью гистологической злокачественности соответственно (Santana-Davila and Perez, 2010). Для измерения экспрессии рецептора прогестерона (PgR) используют иммуногистохимические способы, которые в сочетании с положительным статусом ER позволяют классифицировать опухоль как гормонозависимую. Кроме того, за избыточной экспрессией или усилением рецептора человеческого эпидермального фактора роста 2 (HER2) можно наблюдать либо с помощью иммуногистохимического анализа, либо методом флуоресцентной гибридизации *in situ* (FISH). Обычно экспрессию этих трех маркеров в опухолях молочной железы связывают с более благоприятным клиническим результатом, поскольку в данном случае для таких пациентов подходят несколько вариантов лечения, нацеленных на эти белки (de Ruijter et al., 2011), среди них тамоксифен, Arimidex™ (анастрозол), Aromasin™ (экземестан), Femara™ (летрозол), Faslodex™ (фулвестрант), Herceptin™ (трастузумаб) или Тукерб™ (лапатиниб).

Другой гистологический подтип РМЖ включает базальноподобные опухоли, которые характеризуются, среди прочего, более высокой степенью гистологической злокачественности, повышенным митотическим индексом и высокой экспрессией Ki67 (Santana-Davila and Perez, 2010). Подавляющее большинство базальноподобных опухолей состоят из тройного негативного РМЖ (ТНРМЖ), который составляет 15-20% от всех диагностируемых случаев РМЖ (Ismail-Khan and Bui, 2010). ТНРМЖ определяется по малому уровню экспрессии белка ER, PgR и отсутствию избыточной экспрессии белка HER2. Взаимосвязь между базальноподобными опухолями и ТНРМЖ просматривается не столь легко, поскольку не все ТНРМЖ являются базальноподобными, и не все базальноподобные опухоли представляют собой ТНРМЖ, но примерно 75% случаев в этих категориях разделяют признаки как тех, так и других. ТНРМЖ ассоциируется с плохим прогнозом в отношении 5-летней выживаемости и высокой вероятностью рецидива.

У пациентов с ТНРМЖ болезнь развивается в более раннем возрасте, чем в случае других подтипов РМЖ, и часто диагностируется в предклимактерическом периоде (Carey et al., 2006). Тройной отрицательный рак молочной железы демонстрирует повышенную склонность к рецидиву после лечения и, по-видимому, является более агрессивным, чем другие подтипы карциномы молочной железы (Nofech-Mozes et al., 2009), как и в случае подтипа базальноподобного рака молочной железы. Соответственно общая 5-летняя выживаемость пациентов с ТНРМЖ является значительно более низкой, чем у пациентов с установленными диагнозами других подтипов рака молочной железы. В настоящий момент не существует принятого специфического молекулярного маркера для ТНРМЖ. Несмотря на отсутствие такового, эти опухоли все же реагируют на химиотерапию (Kriege et al., 2009). Пациенты демонстрировали более хороший ответ на цитотоксические агенты при адьювантной терапии, как и при неоадьювантной терапии, при введении таких агентов, как 5-фторурацил, доксорубицин и циклофосфамид (Rouzier et al. 2005). Другие агенты, продемонстрировавшие определенную эффективность, включают соединения на основе платины, такие как соединения цисплатин и анти-губулин, например таксаны (Santana-Davila and Perez, 2010).

Как упоминалось ранее, специфические мишени для ТНРМЖ не существуют, но это не препятствовало испытанию нацеленных агентов, например ингибирования поли[АДФ-рибоза]полимеразы 1 (PARP1). PARP1 представляет собой фермент, который участвует в репарации одностаниевых разрывов ДНК путем ассоциации с поврежденными нитями и является посредником в вовлечении ферментов, необходимых для репарации одностаниевых разрывов (de Ruijter et al., 2011). Таким образом, стратегия состояла в том, чтобы ингибировать активность PARP1 как средства, позволяющего раковым клеткам накапливать все больше одностаниевых разрывов ДНК, которые в конечном итоге приводят к генетической нестабильности, остановке митотической активности и апоптозу. Перспективные клинические результаты были получены у пациентов, которые показали мутации в BRCA1 и/или BRCA2 - важных медиаторах поддержания стабильности генов и гомологичной рекомбинации, необходимых для правильного деления клеток. Действительно, пациенты с мутациями в BRCA1, которые скорее всего испытывают недостаточность в генетической стабильности метаболических путей, демонстрировали более сильную реакцию на ингибиторы PARP1 по сравнению с теми пациентами, для которых взаимосвязь с BRCA1 была дикого типа (Fong et al., 2009). Ясно, что нацеливание на PARP1 у пациентов с ТНРМЖ, которые являются носителями мутаций BRCA, представляет собой перспективную стратегию. Сочетание ER/PgR/HER2 статуса со статусом генетического профиля генов BRCA1/2 может предоставить наилучшую информацию для принятия решения в отношении соответствующих вариантов лечения пациентов с ТНРМЖ.

Другие стратегии также рассматривали применение ингибиторов EGFR либо в качестве моноклональных антител, либо как малых молекул или анти-ангиогенных соединений для нацеливания на VEGF.

Несколько клинических исследования произвели оценку действенности этих соединений, но ни одно из них не показало значительного ответа при введении исключительно только этих соединений. Однако небольшую действенность наблюдали у пациентов, получавших лечение этими ингибиторами в комбинации с другими цитотоксическими средствами (Santana-Davila and Perez, 2010).

Несмотря на последние достижения в понимании и лечении РМЖ, применение химиотерапии неизменно связано с тяжелыми нежелательными реакциями, которые ограничивают ее применение. В результате, необходимость в более специфических подходах, таких как сочетание антигенной тканевой специфичности с избирательностью моноклональных антител должно обеспечить значительное уменьшение побочных эффектов, связанных с нецелевым воздействием. Не существует антигенов, специфических для ТНРМЖ, которые на данный момент изучают в качестве терапевтических мишеней для моноклональных антител. Так, для пациентов с ТНРМЖ существует немного вариантов, поскольку нет возможности нацеливания на специфический маркер белка, который экспрессируется в этих опухолях. Существует срочная потребность в идентификации новых белков, экспрессируемых при ТНРМЖ для применения в качестве новых диагностических маркеров и новых направленных (таргетных) терапий.

Ассоциированный с почками антиген 1 (KAAG1), белковая последовательность которого приведена здесь как SEQ ID NO: 2, изначально клонировали из библиотеки кДНК, полученной из линии клеток гипернефромы с антигеном В7 главного комплекса гистосовместимости, в качестве антигенного пептида, презентруемого цитотоксическим Т-лимфоцитам (Van den Eynde et al., 1999; инвентарный номер в Genebank Q9UBP8, кДНК последовательность представлена нуклеотидами 738-992 последовательности SEQ ID NO: 1). Было обнаружено, что locus, содержащий KAAG1 кодирует два гена, транскрибируемые в обоих направлениях на противоположных цепях ДНК. Было обнаружено, что смысловая цепь кодирует транскрипт, который кодирует белок под названием DCDC2. При исследовании экспрессии авторами настоящего изобретения было обнаружено, что антисмысловой транскрипт KAAG1 был опухолевоспецифичным и демонстрировал очень небольшую экспрессию в нормальных тканях, тогда как смысловой транскрипт DCDC2 экспрессируется повсеместно (Van den Eynde et al., 1999). Экспрессия транскрипта KAAG1 при раке, в частности при карциноме яичников, раке почек, раке легких, раке толстой кишки, раке молочной железы и меланоме раскрыта в международной заявке № PCT/CA2007/001134, опубликованной 27 декабря 2007 г. под номером WO 2007/147265. Van den Eynde et al. также наблюдали экспрессию РНК при гипернефромах, колоректальных карциномах, меланом, саркомах, лейкозах, опухолях головного мозга, опухолях щитовидной железы, карциномах молочной железы, карциномах предстательной железы, карциномах пищевода, опухолях мочевого пузыря, карциномах легких и опухолях головы и шеи. Недавно, в результате исследований неравновесного сцепления было получено убедительное генетическое доказательство, демонстрирующее, что locus VMP/DCDC2/KAAG1 ассоциирован с дислексией (Schumacher et al., 2006; Core et al., 2005). Одно из этих сообщений было посвящено маркеру DCDC2 в качестве причины, вызывающей дислексию у пациентов, поскольку функция этого белка в миграции кортикальных нейронов согласовывалась с симптомами у этих пациентов, у которых часто проявлялись атипичная миграция и созревание нейронов (Schumacher et al., 2006).

Заявитель получил ряд антител и антиген-связывающий фрагмент, которые связываются с белком KAAG1. Было показано, что эти антитела или антиген-связывающие фрагменты нацелены на три участка белка: аминокислоты 1-35, аминокислоты 36-60 и аминокислоты 61-84. Заявитель обнаружил, что антитела, нацеленные на участок между аминокислотами 30-84, были наиболее полезными для терапевтических целей, поскольку они распознавали KAAG1, расположенный на поверхности клеток опухоли. Заявитель показал, что некоторые из этих антител и антиген-связывающих фрагментов могут служить посредниками при антитело-зависимой клеточной цитотоксичности и/или интернализуются в клетки опухоли, что делает их хорошими кандидатами для доставки полезного груза в клетки опухоли. Заявитель также получил химерные и гуманизированные антитела, основанные на отобранных антителах-кандидатах, и показал, что эти антитела могут ингибировать образование клеток опухоли и их инвазивность (см. PCT/CA2009/001586, опубликованную 3 июня 2010 г. под номером WO2010/060186, и PCT/CA2010/001785, опубликованную 12 мая 2011 г. под номером WO2011/054112). Наконец, заявитель обнаружил, что эти антитела могут быть применены для лечения и диагностики рака яичников, рака кожи, рака почек, колоректального рака, саркомы, лейкоза, опухоли головного мозга, опухоли щитовидной железы, рака молочной железы, рака простаты, опухоли пищевода, опухоли мочевого пузыря, опухоли легких и опухоли головы и шеи.

Заявитель сделал неожиданное открытие от том, что антитело или антиген-связывающий фрагмент, которые специфически связываются с KAAG1, могут быть эффективно нацелены на клетки рака молочной железы, у которых отсутствует экспрессия белка ER, экспрессия белка PgR и/или которые демонстрируют отсутствие избыточной экспрессии белка HER2 (т.е. клетки тройного негативного рака молочной железы, базальноподобные). Анти-KAAG1 антитела, таким образом, могут быть применены для обнаружения и терапевтического лечения клеток рака молочной железы, являющихся негативными для по меньшей мере одного из этих маркеров.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1а показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных доменов

3A4 мышинных и гуманизированных легких цепей. Легкая цепь имеет два гуманизированных варианта (Lh1 и Lh2). CDR показаны жирным и обозначены CDRL1, CDRL2 и CDRL3. Обратные мутации в каркасных участках человека, которые являются мышинными аминокислотами, подчеркнуты в гуманизированных последовательностях.

На фиг. 1b показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных доменов 3A4 мышинных и гуманизированных тяжелых цепей. Тяжелая цепь имеет четыре гуманизированных варианта (Nh1 - Nh4). CDR показаны жирным и обозначены CDRH1, CDRH2 и CDRH3. Обратные мутации в каркасных участках человека, которые являются мышинными аминокислотами, подчеркнуты в гуманизированных последовательностях.

На фиг. 2a показано выравнивание переменного участка легкой цепи 3A4 мыши (SEQ ID NO: 4) с вариантом переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 33) при помощи программы ClustalW2 (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW и ClustalX версия 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948), в которой "*" (звездочка) указывает на положения, которые имеют отдельный, полностью сохраненный остаток, где ":" (двоеточие) указывает на консервативность между группами с сильно схожими свойствами - подсчет >0,5 по матрице Gonnet PAM 250 и где "." (точка) обозначает консервативность между группами с мало схожими свойствами - подсчет = <0,5 по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 2b показано выравнивание переменного участка тяжелой цепи 3A4 мыши (SEQ ID NO: 2) с вариантом переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 38) при помощи программы ClustalW2 (Larkin M.A., et al., (2007) ClustalW и ClustalX версия 2. Bioinformatics 2007 23(21): 2947-2948), в которой "*" (звездочка) указывает на положения, которые имеют отдельный, полностью сохраненный остаток, где ":" (двоеточие) указывает на консервативность между группами с сильно схожими свойствами - подсчет >0,5 по матрице Gonnet PAM 250 и где "." (точка) обозначает консервативность между группами с мало схожими свойствами - подсчет = <0,5 по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 3a представлена карта плазмиды pKCR5-3A4-HC-Variant 1. Тяжелые цепи гуманизированных вариантов 3A4 клонировали таким же образом в сайт Hind III pK-CR5. Следовательно, полученные в результате плазмиды идентичны pKCR5-3A4-HC-Variant 1, за исключением последовательности переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 3b представлена карта плазмиды pKCR5-3A4-HC-Variant 1. Легкие цепи гуманизированных вариантов 1 и 2 антитела 3A4 клонировали таким же способом в сайт BamHI pMPG-CR5. Следовательно, полученная в результате плазида идентична pMPG-CR5-3A4-LC-Variant 1 за исключением последовательности переменного домена легкой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 4 представлен анализ получения антитела после временной трансфекции в клетках CHO. Надосадочная жидкость (13 дней после трансфекции) клеток CHOста, трансфицированных различными комбинациями легких или тяжелых цепей гуманизированного антитела 3A4, проанализировали при помощи вестерн-блоттинга. Количественный анализ антитела, полученного в супернатантах, определяли после сканирования пучков вестерн-блоттинга по сравнению с разбавлением известного стандарта (очищенного антитела IgG человека). Мг - маркер молекулярного веса (кДа).

На фиг. 5 представлен график результатов гель-фильтрации в Superdex G75 образца рекомбинантного КААG1. КААG1 впрыскивали над гель-фильтрацией и разделяли со скоростью 0,4 мл/мин. Наибольший пик находится между фракциями 15-19.

На фиг. 6 представлена таблица, в которой перечислены константы скорости и аффинности для мышинных и гуманизированных вариантов антитела 3A4.

На фиг. 7a изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости ассоциаций (K_a) гуманизированных антител.

На фиг. 7b изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости диссоциаций (K_d) гуманизированных антител.

На фиг. 7c изображена гистограмма, иллюстрирующая константы аффинности (K_D) гуманизированных антител.

На фиг. 8a проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с КААG1 в ИФА тесте (ELISA). Этот чертеж демонстрирует сравнительное связывание вариантов гуманизированного антитела 3A4 и мышинного 3A4. Графики связывания в зависимости от концентрации гуманизированных тяжелых цепей (Nh1, Nh2, Nh3 и Nh4), объединенных с вариантом легкой цепи Lh1.

На фиг. 8b проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с КААG1 в ИФА тесте. Этот чертеж демонстрирует сравнительное связывание вариантов гуманизированного антитела 3A4 и мышинного 3A4. Графики связывания в зависимости от концентрации гуманизированных тяжелых цепей (Nh1, Nh2, Nh3 и Nh4), объединенных с вариантом легкой цепи Lh2.

На фиг. 9 проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с КААG1 на поверхности раковых клеток. На данной иллюстрации продемонстрирована сравнительная связывающая активность гуманизированных и мышинных антител 3A4 на непрмеабилитированных клетках карциномы яичника SKOV-3.

На фиг. 10 показан результат сканирования микрочипа тканей, содержащий 139 образцов биопсии, полученных от пациентов с РМЖ. Образцы блоттировали, используя антитело 3A4 к КААG1, было пока-

зано, что огромное большинство опухолей молочной железы экспрессировали антиген КААG1 очень в большом количестве. Образцы с подтвержденным ТНPMЖ помечены звездочкой.

На фиг. 11 показаны результаты проточной цитометрии, проведенной с использованием клеточных линий MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20, BT-549, T47D, MCF-7 и 293-6E, инкубированных с антителом 3A4 к КААG1 (синие столбцы на гистограмме) в сравнении с контрольным образцом IgG (красные столбцы). Это представительные результаты эксперимента, который проводили сериями из трех. Клеточные линии ТНPMЖ помечены звездочкой.

На фиг. 12 представлено обнаружение антигена КААG1 на поверхности клеток MDA-MB-231 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к КААG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс КААG1/антитело интернализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 13 представлено обнаружение антигена КААG1 на поверхности клеток MDA-MB-436 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к КААG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс КААG1/антитело интернализовался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 14 представлено обнаружение антигена КААG1 на поверхности клеток MDA-MB-436 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к КААG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс КААG1/антитело интернализовался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 15 представлено обнаружение антигена КААG1 на поверхности клеток T47D при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к КААG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс КААG1/антитело интернализовался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 16 представлены иммунофлуоресцентные данные, полученные на живых клетках MDA-MB-231 с антителом 3A4 к КААG1 и антителом к LAMP1. Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к КААG1, показан на чертеже слева, иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к LAMP1, показан на чертеже в центре, и совмещенное изображение их обоих показано на чертеже справа. Эти данные иллюстрируют совместную локализацию КААG1 и LAMP1 рядом с околядерной областью.

На фиг. 17 представлены иммунофлуоресцентные данные, полученные на живых клетках MDA-MB-231 с антителом 3A4 к КААG1 и антителом к LAMP1. Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к КААG1, показан на чертеже слева, иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к LAMP1, показан на чертеже в центре, и совмещенное изображение их обоих показано на чертеже справа. Эти данные иллюстрируют локализацию КААG1 с LAMP1 - маркером поздних эндосом/лизосом.

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение предлагает способ лечения или обнаружения рака или раковых клеток (in vitro или in vivo) у субъектов, нуждающихся в этом.

В соответствии с настоящим изобретением способы лечения или обнаружения можно осуществлять с помощью антитела, способного связываться с КААG1, или связывающего фрагмента его антигена.

Нуждающееся лицо может представлять собой, например, лицо, у которого обнаружен рак или есть подозрение на рак. Рак или раковые клетки у такого лица могут происходить из карциномы молочной железы.

Рак или раковые клетки более конкретно могут происходить из карциномы молочной железы, охарактеризованной как тройная негативная или базальноподобная опухоль.

По этой причине лица, которые могут получить пользу от способов лечения или обнаружения данного документа, могут включать тех, у кого выявлена карцинома молочной железы.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потерю экспрессии рецептора прогестерона.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потерю экспрессии Her2.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2.

Более конкретно карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, демонстрирующие либо 1) уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена и рецептора прогестерона, 2) уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена и уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2, 3) уменьшение или потерю экспрессии рецептора прогестерона и уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2 или 4) уменьшение или потерю экспрессии рецептора эстрогена, уменьшение или потерю экспрессии рецептора прогестерона и уменьшение или потерю избыточной экспрессии Her2.

Еще более конкретно карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, де-

монстрирующие либо 1) потерю экспрессии рецептора эстрогена и рецептора прогестерона, 2) потерю экспрессии рецептора эстрогена и потерю экспрессии Her2, 3) потерю экспрессии рецептора прогестерона и потерю экспрессии Her2 или 4) потерю экспрессии рецептора эстрогена, потерю экспрессии рецептора прогестерона и потерю экспрессии Her2.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может иметь клетки РМЖ, которые охарактеризованы как тройные негативные, или может иметь опухоль, которая охарактеризована как тройной негативный РМЖ.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может иметь клетки РМЖ, которые охарактеризованы как базальноподобные, или может иметь опухоль, которая охарактеризована как базальноподобный РМЖ.

Другими лицами, которые получают пользу от лечения анти-КААГ1, являются те, у которых выявлена карцинома, содержащая клетки опухоли с переходным эпителиально-мезенхимальным (EMT) фенотипом.

Широко используемыми молекулярными маркерами EMT являются, например, сниженная экспрессия E-кадгерина, цитокератина и β -катенина (в мембране) и/или повышенная экспрессия Snail, Slug, Twist, ZEB1, ZEB2, N-кадгенира, виментина, α -актина гладких мышц, матричных металлопротеиназ и т.д. (см., например, Kalluri and Weinberg, *The Journal of Clinical Investigation*, 119(6), p. 1420-1428; 2009; Fassina et al., *Modern Pathology*, 25; p. 86-99; 2012; Lee et al., *JCB*; 172; p. 973-981; 2006). EMT фенотип можно также различить по его повышенной способности к миграции, инвазивности или по устойчивости к апоптозу/апоптозу. Клетки, находящиеся в процессе эпителиально-мезенхимального перехода, можно, таким образом, обнаружить благодаря уменьшению эпителиальных маркеров и появлению мезенхимальных маркеров или EMT фенотипа.

В соответствии с настоящим изобретением способ может включать, например, введение нуждающемуся в этом лицу антитела или антиген-связывающего фрагмента, который способен специфично связываться с КААГ1. Нуждающееся лицо предпочтительно отбирают на основании отсутствия у их опухоли экспрессии ER, экспрессии PgR и/или отсутствия избыточной экспрессии белка HER2. Клинические исследования этих маркеров обычно проводят, используя гистопатологические способы (иммуногистохимические, FISH и т.п.), и/или путем изучения экспрессии генов (см., например, Dent et al, 2007, Bernstein and Lacey, 2011). Нуждающимся лицом, таким образом, может быть лицо, у которого был установлен диагноз тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ. Нуждающееся лицо может быть лицом, у которого не наблюдается ответ на гормональную терапию и/или на лечение трастузумабом (или другими антителами к Her2). Альтернативно, нуждающееся лицо может быть лицом, имеющим клетки опухоли, которые способны к эпителиально-мезенхимальному переходу или которые приобрели мезенхимальный фенотип.

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает способ лечения тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ путем введения ингибитора активности или экспрессии КААГ1 нуждающемуся лицу.

В соответствии с настоящим изобретением ингибитор КААГ1 может, таким образом, включать антитело, описанное в данном документе, или его антиген-связывающий фрагмент.

Также в соответствии с настоящим изобретением ингибитор КААГ1 может включать нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Более конкретно ингибитор КААГ1 может включать нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Например, ингибитор может включать по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов (по меньшей мере 15, по меньшей мере 20), комплементарных последовательности SEQ ID NO: 1 или нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1. Более конкретно тип ингибитора КААГ1 включает мРНК, которая демонстрирует экспрессию последовательности SEQ ID NO: 1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны связываться с КААГ1 на поверхности клеток опухоли. Такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в КААГ1 в пределах аминокислот с 30 по 84 включительно.

Альтернативно, такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут связываться с эпитопом, расположенным в КААГ1 в пределах аминокислот 36-60 (включительно) или в пределах аминокислот 61-84 (включительно).

Эпитоп может быть, в частности, расположен или заключен в пределах аминокислот 50-70, 50-65, 51-65, 52-65, 53-65, 54-65, 54-64, 54-63, 54-62, 54-61, 54-60, 50-62; 50-61 или 50-60 (включительно или исключительно).

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в КААГ1 в пределах аминокислот 50-70.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-

связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в КААG1 в пределах аминокислот 50-62.

В еще одном дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в КААG1 в пределах аминокислот 54-65.

Подходящие антитела для терапевтического лечения включают, например, те, которые выступают посредниками в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности.

Другие даже более подходящие антитела для терапевтического лечения включают антитела с присоединенным к ним терапевтическим фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут быть, например, моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом, антителом человека или их антиген-связывающим фрагментом.

Подробное описание изобретения

Способ лечения.

Как указано в данном документе, настоящее изобретение включает введение антитела или антиген-связывающего фрагмента лицу, страдающему от РМЖ, который охарактеризован как "тройной негативный РМЖ" или "базальноподобный РМЖ".

Классификация подтипов РМЖ как "тройного негативного РМЖ" или "базальноподобного РМЖ" известна в уровне техники (см., например, Foulkes et al., N. Engl. J. Med., 2010; 363:1938-1948) и включает, например, следующие определения.

"Базальноподобный РМЖ" может включать, например, подтип РМЖ, заключающий в себе гетерогенную группу опухолей, характеризующихся отсутствием или низким уровнем экспрессии рецепторов эстрогена, очень низкой распространенностью избыточной экспрессии Her2 и экспрессией генов, которые обычно наблюдают в базальных или миоэпителиальных клетках молочной железы человека. Такую экспрессию можно определить с помощью микрочипового анализа.

"Тройной негативный РМЖ" может включать, например, опухоль, характеризующуюся отсутствием рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PR) и экспрессии Her2. Некоторые исследователи относят опухоли к негативным с точки зрения экспрессии ER или PR лишь при наличии менее чем 1% позитивных с точки зрения экспрессии ER или PR клеток; другие считают опухоли негативными с точки зрения экспрессии ER или PR, если вплоть до 10% клеток являются позитивными с точки зрения экспрессии. Другие определения были использованы для HER2-негативности. Два из наиболее часто применяемых включают опухоли с иммуногистохимической оценкой, равной 0/1 + или 2+, у которых отсутствует амплификация гена HER2 после гибридизации *in situ*. Такую экспрессию можно особенно определить с помощью иммуногистохимического окрашивания.

В соответствии с настоящим изобретением способ лечения включает введение ингибитора КААG1 нуждающемуся в этом лицу. Такой ингибитор КААG1 включает, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с КААG1.

Скорее всего, наиболее сильнодействующими антителами или антиген-связывающими фрагментами будут те, которые обладают высокой аффинностью к КААG1. Также скорее всего, что наиболее сильнодействующими антителами или антиген-связывающими фрагментами будут те, которые интернализуются в такие отделы клетки, как, например, лизосома или эндосома.

Как таковое, настоящее изобретение особенно охватывает антитела или антиген-связывающие фрагменты, которые обладают высокой аффинностью к КААG1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны связываться с КААG1 на поверхности клеток опухоли с высокой аффинностью. Такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в КААG1 в пределах аминокислот с 30 по 84 включительно.

Альтернативно, такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут связываться с эпитопом, расположенным в КААG1 в пределах аминокислот 36-60 (включительно) или в пределах аминокислот 61-84 (включительно).

Антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут связываться, например, с эпитопом, который может быть, в частности, расположен или заключен в пределах аминокислот 50-70, 50-65, 51-65, 52-65, 53-65, 54-65, 54-64, 54-63, 54-62, 54-61, 54-60, 50-62; 50-61 или 50-60 (включительно или исключительно).

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент с высокой аффинностью может связываться с эпитопом, содержащимся в КААG1 в пределах аминокислот 50-70.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент с высокой аффинностью может связываться с эпитопом, содержащимся в КААG1 в пределах аминокислот 50-62.

В еще одном дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент с высокой аффинностью может связываться с эпитопом, содержащимся в

КААG1 в пределах аминокислот 54-65.

Предпочтительными антителами, включая антитела с высокой афинностью, являются те антитела, которые могут интернализироваться в клетку или отделы клетки (например, лизосомы или эндосомы). Способность антител к интернализации можно определить с помощью такого известного в уровне техники способа, как, например, и без ограничения, исследования с помощью иммунофлюоресценции, аналогичные тем, которые выполняются в данном документе.

Антитела с CDRs, идентичными таковым антител 3A4, особым образом охвачены настоящим изобретением. Как таковые, антитела, имеющие консенсусные последовательности с переменным участком легкой цепи и/или переменным участком тяжелой цепи, приведенные в любой из SEQ ID NOs: 186-188 и 191-193, и специфические последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 46, 48, 189, 190 или 194-198, охвачены настоящим изобретением.

Среди них антитела, имеющие консенсусные последовательности с переменным участком легкой цепи и/или переменным участком тяжелой цепи, приведенные в любой из SEQ ID NO: 188 и 196, или специфические последовательности, приведенные в SEQ ID NO: 46, 48, 189, 190 или 194-198, представляют особый интерес.

К антителам или их антиген-связывающим фрагментам предпочтительно можно присоединять терапевтические фрагменты.

Антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут иметь константный участок человека. Предпочтительно антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут иметь константный участок IgG1 человека. Альтернативно, антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут иметь константный участок IgG2 человека.

Способ настоящего изобретения может также включать введение ингибитора КААG1, такого как антитело (например, с присоединенным терапевтическим фрагментом) или антиген-связывающий фрагмент в комбинации с противораковым средством, таким как, например, лекарство на основе малой молекулы, антитела или антиген-связывающего фрагмента, связывающегося с целью, отличной от КААG1, химиотерапевтического или цитотоксического агента. Пример противоракового средства, которое можно вводить с ингибитором КААG1, может включать, например, доксорубин, таксаны, антиангиогенные средства, соли платины, ингибиторы PARP.

Другие способы лечения, охваченные настоящим изобретением, включают введение других типов ингибиторов КААG1, таких как терапевтические средства на антисмысловой основе (миРНК, антисмысловые средства, рибозимы и т.п.).

Антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с КААG1.

Термин "антитело или антиген-связывающий фрагмент" или сходные с ним термины, такие как "антитела или антиген-связывающие фрагменты", охватывают, например, "вариантное антитело или антиген-связывающий фрагмент", такой как, например, "гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент".

Термин "антитело" относится к интактному антителу, моноклональным или поликлональным антителам. Термин "антитело" также охватывает мультиспецифические антитела, такие как биспецифические антитела. Антитела человека обычно состоят из двух легких цепей и двух тяжелых цепей, каждая из которых содержит переменные участки и константные участки. Переменный участок легкой цепи содержит 3 CDR, обозначенные в данном документе как CDRL1, CDRL2 и CDRL3, фланкированные каркасными участками. Переменный участок тяжелой цепи содержит 3 CDR, обозначенные в данном документе как CDRH1, CDRH2 и CDRH3, фланкированные каркасными участками.

Термин "антиген-связывающий фрагмент", применяемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с антигеном (например, КААG1, секретлируемой формой КААG1 или его вариантами). Было показано, что антиген-связывающая функция антитела может осуществляться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела, включают (i) Fab фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) F(ab')₂ фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab фрагмента, соединенные дисульфидным мостиком в шарнирном участке; (iii) Fd фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) Fv фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) dAb фрагмент (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенный определяющий комплементарность участок (CDR), например V_H CDR3. Кроме того, несмотря на то что два домена Fv фрагмента, V_L и V_H , кодированы отдельными генами, они могут быть соединены с использованием рекомбинантных способов, при помощи синтетического линкера, который позволяет им быть сконструированными в качестве отдельной полипептидной цепи, в которой пара участков V_L и V_H соединяются с образованием моновалентных молекул (известных как отдельная цепь Fv (scFv); см., например, Bird et al. (1988) Science 242:423-426; и Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883). Предполагается, что такие одноцепочечные антитела также охватываются термином "антиген-связывающий фрагмент" антитела. Кроме того, антиген-связывающие фрагменты включают химерные белки иммуноглобулинов со связывающим доменом, содержащие (i) полипептид со связывающим доменом (как, например, переменный участок тяжелой цепи, переменный

ный участок легкой цепи или переменный участок тяжелой цепи, слитый с переменным участком легкой цепи посредством линкерного пептида), который слит с полипептидом с шарнирным участком иммуноглобулина, (ii) константный участок CH2 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитый с шарнирным участком, и (iii) константный участок CH3 тяжелой цепи иммуноглобулина, слитый с константным участком CH2. Шарнирный участок может быть модифицирован при помощи замены одного или нескольких цистеиновых остатков на сериновые остатки для предупреждения димеризации. Такие гибридные белки иммуноглобулинов со связывающим доменом дополнительно раскрыты в публикациях US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Эти фрагменты антител получают, используя традиционные методики, известные специалистам в данной области техники, и подвергают скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

Обычный сайт связывания антигена находится в составе переменных участков, сформированных путем спаривания иммуноглобулина легкой цепи и иммуноглобулина тяжелой цепи. Структура переменных участков антитела является очень устойчивой и демонстрирует очень сходные структуры. Такие переменные участки обычно содержат сравнительно гомологичные каркасные участки (FR), прерываемые тремя гиперпеременными участками, которые называются участками, определяющими комплементарность (CDR). Общая связывающая активность антиген-связывающего фрагмента часто обуславливается последовательностью CDR. FR часто играют некоторую роль в точном моделировании и выравнивании CDR по трем измерениям для оптимального связывания антигена.

Как используется в данном документе, термин "высокая аффинность" относится к аффинности, равной 10 нМ или менее.

Термин "высокая аффинность" в особенности включает антитела, обладающие аффинностью, равной 5 нМ или менее. Термин "высокая аффинность" еще более конкретно включает антитела, обладающие аффинностью, равной 1 нМ или менее или равной 0,1 нМ или менее.

Антитела и/или антиген-связывающие фрагменты настоящего изобретения могут происходить, например, от мыши, крысы или другого млекопитающего или от других источников, как, например, получаемые посредством методик рекомбинантной ДНК.

Антитела изначально были выделены из Fab-библиотек по их специфичности к представляющему интерес антигену. В данном документе приведены иллюстративные способы превращения Fab в полные иммуноглобулины.

Можно проводить слияние переменных участков антител, описанных в данном документе, с константными участками требуемых видов, таким образом делая возможным распознавание антитела эффекторными клетками требуемых видов. Константный участок может происходить, например, от подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Клонирование или синтез константного участка в рамке с переменным участком хорошо известны специалисту в данной области и могут быть осуществлены, например, при помощи методики рекомбинантной ДНК.

В некоторых вариантах осуществления настоящего изобретения связывающиеся с мКААГ1 антитела могут относиться к подтипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Более определенные варианты осуществления изобретения относятся к антителу подтипа IgG1 или особенно человеческого антитела подтипа IgG1. Другие определенные варианты осуществления изобретения относятся к антителу подтипа IgG2 или особенно человеческого антитела подтипа IgG2.

Антитело может быть гуманизированным антителом подтипа IgG1 или особенно человеческим антителом подтипа IgG1. Кроме того, антитело может быть гуманизированным антителом подтипа IgG2 или особенно человеческим антителом подтипа IgG2.

Антитело может быть, например, биологически активным, выступая посредником в антителозависимой клеточной цитотоксичности (опухолевых клеток, экспрессирующих), комплемент-опосредованной цитотоксичности (СМС) или ассоциированным с иммунными комплексами. Типичная АЗКЦ включает активизацию естественных клеток-киллеров (NK-клеток) и основывается на распознавании клеток, покрытых антителами, Fc рецепторами на поверхности NK-клеток. Fc рецепторы распознают Fc домен антител, например, такой как находится на IgG1, которые связываются с поверхностью клетки-мишени, в частности раковой клетки, которая экспрессирует антиген, такой как КААГ1. После связывания с Fc рецептором на IgG1 NK-клетка выделяет цитокины и цитотоксические гранулы, которые внедряются в клетку-мишень и, вызывая апоптоз, ускоряют гибель клетки.

Настоящее изобретение описывает набор антител, которые связываются с КААГ1 или вариантом КААГ1. В некоторых вариантах осуществления антитела можно выбирать из группы, состоящей из поликлональных антител, моноклональных антител, таких как химерные или гуманизированные антитела, фрагментов антител, таких как антиген-связывающие фрагменты, одноцепочечных антител, доменных антител и полипептидов с антиген-связывающим участком.

В одном аспекте данного изобретения изолированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут быть способны вызывать гибель (устранение, уничтожение, лизис) опухолевых клеток, экспрессирующих КААГ1, или опухолевых клеток, экспрессирующих вариант КААГ1 (например, путем механизма, основанного на АЗКЦ).

В дополнительном аспекте изобретения, выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент

настоящего изобретения могут быть специально охарактеризованы их способностью к уменьшению распространения опухолевых клеток, экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

В дополнительном аспекте изобретения, выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут быть специально охарактеризованы их способностью к уменьшению или затруднению образования опухолей, экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать аминокислоты константного участка, который может происходить, например, из антитела человека.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать каркасные аминокислоты антитела человека.

Безотносительно к иллюстративным вариантам осуществления, представленным в данном документе, заявитель выработал специфические антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые могут быть полезны для описанных в данном документе целей.

Нижеследующее представляет собой перечень полученных антител, которые демонстрировали специфическое связывание с КААG1; 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 и 3H3. Последовательности легкой цепи или тяжелой цепи антитела, переменные участки или участки, определяющие комплементарность (CDRs) можно найти в международной заявке № PCT/CA2009/001586, опубликованной 3 июня 2010 г. под номером WO2010/060186A8, в международной заявке № PCT/CA2010/001795, опубликованной 12 мая 2011 г. под номером WO2011/054112A1, или в международной заявке № PCT/CA2012/000296, опубликованной 4 октября 2012 г. под номером WO2012/129668A1.

В большинстве случаев последовательности CDRs приведены отдельно или показаны жирным шрифтом в данном документе.

Из этих антител 3D3, 3A4, 3G10 и 3C4 были выбраны для биологических испытаний *in vitro* и/или *in vivo*. Антитело 3A4 обладало наилучшими свойствами. На основании наших экспериментов антитело 3A4 более эффективно убивает раковые клетки, если к нему присоединить терапевтический фрагмент (например, цитотоксический агент), по сравнению с антителом без такого присоединения.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать любой отдельный CDR или комбинацию из CDR1, CDR2 и/или CDR3 переменного участка легкой цепи. CDR3 может быть выбран более конкретно. Комбинация может включать, например, CDRL1 и CDRL3; CDRL1 и CDRL2; CDRL2 и CDRL3 и CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать любой отдельный CDR или комбинацию из CDR1, CDR2 и/или CDR3 переменного участка тяжелой цепи. CDR3 может быть выбран более конкретно. Комбинация может включать, например, CDRH1 и CDRH3; CDRH1 и CDRH2; CDRH2 и CDRH3 и CDRH1, CDRH2 и CDRH3.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать по меньшей мере два CDR из CDRL1, CDRL2 или CDRL3.

Также в соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Дополнительно, в соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать:

- a) по меньшей мере два CDR из CDRL1, CDRL2 или CDRL3 и
- b) по меньшей мере два CDR из CDRH1, одного CDRH2 или одного CDRH3.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент могут более предпочтительно содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент могут более предпочтительно содержать один CDRH1, один CDRH2 и один CDRH3.

В тех случаях, когда доступен только один из переменных участков легкой цепи или переменных участков тяжелой цепи, антитело или антиген-связывающий фрагмент можно восстановить при помощи скрининга библиотеки комплементарных переменных участков с помощью способов, известных в данной области техники (Portolano et al. *The Journal of Immunology* (1993) 150:880-887, Clarkson et al., *Nature* (1991) 352:624-628).

Иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения охватывают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими CDRs легкой цепи и/или тяжелой цепи антител 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 или 3H3. Более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими CDR легкой цепи и/или тяжелой цепи антител 3D3, 3A4, 3C4 или 3G10. Еще более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими CDRs легкой цепи и/или тяжелой цепи антитела 3A4. Изобретение, таким образом, охватывает любые моноклональные, химерные, человеческие или гуманизированные антитела, содержащие один или несколько CDRs антитела 3A4.

Антитела или антиген-связывающие фрагменты, которые можно применять в способах настоящего изобретения, включают те, которые имеют CDRs антитела 3A4, и могут содержать, например, CDRH1, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 49, CDRH2, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 50 или в SEQ ID NO: 212, CDRH3, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 51, CDRL1, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 52, CDRL2, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 53, CDRL3, как приведено в последовательности SEQ ID NO: 54.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает антитела и антиген-связывающий фрагмент, который способен специфично связываться с КААG1, и который может содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- [illegible]

бельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

bb) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

cc) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 196,

dd) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 197,

ee) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

ff) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

gg) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 196, или

hh) 3CDRs варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или 3CDRs варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 197.

Другие иллюстративные варианты осуществления данного изобретения охватывают антитела или антигены, связывающиеся с фрагментами, имеющими легкую цепь и/или тяжелые цепи антител 3D3, 3A4, 3C4, 3G10, 3A2, 3F6, 3E8, 3E10, 3A9, 3B1, 3G5, 3B2, 3B8, 3G8, 3F7, 3E9, 3G12, 3C3, 3E12, 4A2, 3F10, 3F4, 3B11, 3D1, 3C2, 3E6 или 3H3. Более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими легкую цепь и/или тяжелые цепи антител 3D3, 3A4, 3C4 или 3G10. Еще более конкретные варианты осуществления данного изобретения включают антитела или антиген, связывающиеся с фрагментами, имеющими легкую цепь и/или тяжелые цепи антитела 3A4 (гуманизированного или не гуманизированного).

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает антитела и антиген-связывающий фрагмент, который способен специфично связываться с КААG1, и который может содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

a) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 16 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 15), и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 18 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 17),

b) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 20 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 19), и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 22 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 21),

c) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 24 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 23), и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 26 (кодируемого последовательностью SEQ ID NO: 25),

d) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 48, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 46,

e) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 103, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 126,

f) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 104, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 127,

g) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 105, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 128,

h) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 106, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 145,

i) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 107, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 129,

j) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 108, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 130,

k) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 109, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 141,

l) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 110, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 131,

m) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 111, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 134,

n) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 112, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 135,

o) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 113, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 140,

p) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 114, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 133,

q) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 115, и/или варибельного участка

тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 140,

г) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 116, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 137,

с) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 117, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 144,

т) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 118, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 139,

и) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 119, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 132,

в) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 120, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 142,

w) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 121, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 138,

х) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 122, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 146,

у) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 123, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 147,

з) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 124, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 144,

aa) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

bb) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 189, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

cc) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 194,

dd) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 195,

ee) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 196, или

ff) варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO: 190, и/или варибельного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO: 197.

Каркасный участок тяжелой и/или легкой цепей, описанных в данном документе, может быть получены от одного или нескольких каркасных участков, проиллюстрированных в антителях, описанных в данном документе. Антитело или антиген-связывающие фрагменты могут, таким образом, содержать один или несколько CDRs, описанных в данном документе (например, выбранных из специфичных CDRs или консенсусных CDRs последовательностей SEQ ID NO: 72-88 или CDR вариантов последовательностей SEQ ID NO: 89-102), и каркасных участков, взятых из описанных в данном документе. В последовательностях SEQ ID NO: 103-154 ожидаемые CDRs выделены жирным шрифтом, в то время как каркасные участки не выделены.

Табл. 1 относится к полным последовательностям легкой и тяжелой цепи некоторых из антител к КААG1, которые были отобраны для биологического испытания.

Таблица 1

Обозначение антитела	Тип цепи	Нуклеотидная последовательность (SEQ ID NO.:)	Аминокислотная последовательность (SEQ ID NO.:)
3D3	Легкая (L)	3	4
3D3	Тяжелая (H)	5	6
3G10	Легкая	7	8
3G10	Тяжелая	9	10
3C4	Легкая	11	12
3C4	Тяжелая	13	14
Гуманизированное 3D3	Легкая		166
Гуманизированное 3D3	Тяжелая		167
Гуманизированное 3C4	Легкая		170
Гуманизированное 3C4	Тяжелая		171
Гуманизированный 3A4 (Lh1)	Легкая		199
Гуманизированное 3A4 (Lh2)	Легкая		200
Гуманизированное 3A4 (Hh1)	Тяжелая		202
Гуманизированное 3A4 (Hh2)	Тяжелая		203
Гуманизированное 3A4 (Hh3)	Тяжелая		204
Гуманизированное 3A4 (Hh4)	Тяжелая		205

Исследования по картированию эпитопов выявили, что антитело 3D3 взаимодействует с эпитопом КААG1 на протяжении аминокислот 36-60, включительно. Антитела 3G10 и 3A4 взаимодействуют с эпитопом КААG1 на протяжении аминокислот 61-84, включительно, и антитело 3C4 взаимодействует с эпитопом КААG1 на протяжении аминокислот 1-35. Несмотря на то что 3G10 и 3A4 связывают похожие участки, антитело 3G10 не связывается с КААG1 столь же эффективно, как антитело 3A4.

Здесь следует понять, что вариабельный участок легкой цепи с определенной комбинацией, приведенной выше, может быть заменен на любой другой вариабельный участок легкой цепи. Сходным образом здесь следует понять, что вариабельный участок тяжелой цепи с определенной комбинацией, приведенной выше, может быть заменен на любой другой вариабельный участок тяжелой цепи.

Последовательности вариабельных участков легкой и тяжелой цепей выбранных антител, связывающихся с КААG1, раскрыты в табл. 2.

Таблица 2

Обозначение антитела	Тип вариабельного участка	Нуклеотид (SEQ ID NO.:)	Аминокислотн. посл-ть (SEQ ID NO.:)
3D3	Легкий (VL)	15	16
3D3	Тяжелый (VH)	17	18
3G10	Легкий	19	20
3G10	Тяжелый	21	22
3C4	Легкий	23	24
3C4	Тяжелый	25	26
3A2	Легкий		103
3A2	Тяжелый		126
3E10	Легкий		106
3E10	Тяжелый		145
3G12	Легкий		121
3G12	Тяжелый		138
3A4	Легкий	47	48
3A4	Тяжелый	45	46
Гуманизированное 3D3	Легкий		168
Гуманизированное 3D3	Тяжелый		169
Гуманизированное 3C4	Легкий		172
Гуманизированное 3C4	Тяжелый		173
Гуманизированный 3A4	Легкий (Lvhl)		189
Гуманизированный 3A4	Легкий (Lvhl2)		190
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvhl)		194
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvhl2)		195
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvhl3)		197
Гуманизированный 3A4	Тяжелый (Hvhl4)		198

Последовательности SEQ ID NO: 103-154 соответствуют вариабельным участкам легкой цепи и тяжелой цепи других антител, для которых было показано, что они связываются с КААГ1.

CDR последовательности вариабельных участков легкой и тяжелой цепей выбранных антител, связывающихся с КААГ1, раскрыты в табл. 3.

Таблица 3

Обозначение антитела	Тип цепи	CDR	SEQ ID NO.:	а.а. последовательность
3D3	Легкая (L)	CDR L1	27	KSSQSLNSNFQKNFLA
3D3	Легкая	CDR L2	28	FASTRES
3D3	Легкая	CDR L3	29	QQHYSTPLT
3D3	Тяжелая (H)	CDR H1	30	GYIFTDYEIH
3D3	Тяжелая	CDR H2	31	VIDPETGNTA
3D3	Тяжелая	CDR H3	32	MGYS DY

3G10	Легкая	CDR L1	33	RSSQSLHSNGNTYLE
3G10	Легкая	CDR L2	34	KVSNRFS
3G10	Легкая	CDR L3	35	FQGSHPVPLT
3G10	Тяжелая	CDR H1	36	GYTFTDNYMN
3G10	Тяжелая	CDR H2	37	DINPYYGTTT
3G10	Тяжелая	CDR H3	38	ARDDWFDY
3C4	Легкая	CDR L1	39	KASQDIHNFLN
3C4	Легкая	CDR L2	40	RANRLVD
3C4	Легкая	CDR L3	41	LQYDEIPLT
3C4	Тяжелая	CDR H1	42	GFSITSGYGWH
3C4	Тяжелая	CDR H2	43	YINYDGHND
3C4	Тяжелая	CDR H3	44	ASSYDGLFAY
3A2	Легкая	CDR L1	148	KSSQSLHSDGKTYLN
3A2	Легкая	CDR L2	149	LVSKLDS
3A2	Легкая	CDR L3	150	WQGTHTFPRT
3A2	Тяжелая	CDR H1	151	GYTFTD YNMH
3A2	Тяжелая	CDR H2	152	YINPYNDVTE
3A2	Тяжелая	CDR H3	153	AWFGL RQ
3E10	Легкая	CDR L1	154	RSSKSLHSNGN TYLY
3E10	Легкая	CDR L2	155	RMSNLAS
3E10	Легкая	CDR L3	156	MQHLEYPYT
3E10	Тяжелая	CDR H1	157	GDTFTD YYMN
3E10	Тяжелая	CDR H2	158	DINPNYGGIT
3E10	Тяжелая	CDR H3	159	QAYYRNS DY
3G12	Легкая	CDR L1	160	KASQDVGTAVA
3G12	Легкая	CDR L2	161	WTSTRHT
3G12	Легкая	CDR L3	162	QQHYSIPLT
3G12	Тяжелая	CDR H1	163	GYIFTDYEIH
3G12	Тяжелая	CDR H2	164	VIDPETGNTA
3G12	Тяжелая	CDR H3	165	MGYS DY
3A4	Легкая	CDR L1	52	RSSQSLHSNGNTYLE
3A4	Легкая	CDR L2	53	TVSNRFS
3A4	Легкая	CDR L3	54	FQGSHPVPLT
3A4	Тяжелая	CDR H1	49	GYTFTDDYMS
3A4	Тяжелая	CDR H2	50 или 212	DINPYNGDTNYNQKFKG или DINPYNGDTN
3A4	Тяжелая	CDR H3	51	DPGAMDY

Вариантное антитело и антиген-связывающие фрагменты.

Настоящее изобретение также охватывает варианты антител или антиген-связывающих фрагментов, описанных в данном документе. Включенные варианты антител или антиген-связывающие фрагменты представляют собой те, которые имеют вариацию в аминокислотной последовательности. Например, включенные варианты антител или антиген-связывающие фрагменты представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере один вариантный CDR (два, три, четыре, пять или шесть вариантных CDR и т.д. или даже двенадцать вариантных CDR), варибельный участок вариантной легкой цепи, варибельный участок вариантной тяжелой цепи, вариантную легкую цепь и/или вариантную тяжелую цепь. Вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты, включенные в настоящее изобретение, являются такими, которые имеют, например, подобную или повышенную связывающую способность по сравнению с исходным антителом или антиген-связывающим фрагментом.

Как используется в данном документе термин "вариантный" применяют к любой последовательности, описанной в данном документе, и он включает, например, вариантный CDR (или CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3), варибельный участок вариантной легкой цепи, варибельный участок вариантной тяжелой цепи, вариантную легкую цепь, вариантную тяжелую цепь, вариантное ан-

титело, вариантный антиген-связывающий фрагмент и вариант КААG1.

Представляющие наибольший интерес сайты для замещающего мутагенеза включают гипервариабельные участки (CDR), но также предполагаются модификации в каркасном участке или даже в константном участке. Иллюстративные варианты осуществления вариантов CDR приведены в последовательностях SEQ ID NOs: 72-102.

Консервативные замены могут быть осуществлены при помощи обмена аминокислоты (из CDR, вариабельной цепи, антитела и т.д.) из одной из перечисленных ниже групп (группа 1-6) на другую аминокислоту этой же группы.

Другие иллюстративные варианты осуществления консервативных замен показаны в табл. 1А под заголовком "предпочтительные замены". Если результат такой замены придает нежелательное свойство, то могут быть произведены более существенные изменения, обозначенные как "иллюстративные замены" в табл. 1А, или как дополнительно описано ниже в отношении классов аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

В данной области техники известно, что варианты можно получать замещающим мутагенезом, сохраняя биологическую активность полипептидов настоящего изобретения. Такие варианты в своей аминокислотной последовательности имеют по меньшей мере один удаленный аминокислотный остаток и другой остаток, вставленный на его место. Например, один представляющий интерес сайт для замещающего мутагенеза может включать сайт, в котором определенные остатки, полученные из различных видов, являются идентичными. Примеры замен, обозначенных как "консервативные замены", показаны в табл. 1А. Если результат такой замены дает нежелательное изменение, то вводят другой тип замен, обозначенных как "иллюстративные замены" в табл. 1А, или как дополнительно описано в данном документе в отношении классов аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

Существенные модификации в функции или иммунологической идентичности выполняют путем отбора замен, которые значительно отличаются по их эффекту на поддержание (а) структуры полипептидного скелета в области замены, например в виде конформации пласта или спирали; (b) заряда или гидрофобности молекулы в целевом сайте или (с) основной части боковой цепи. Встречающиеся в природе остатки разделены на группы на основании общих свойств боковых цепей:

- (группа 1) норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile),
 - (группа 2) нейтральные гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr),
 - (группа 3) кислотные: аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu),
 - (группа 4) основные: аспарагин (Asn), глутамин (Gln), гистидин (His), лизин (Lys), аргинин (Arg),
 - (группа 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: глицин (Gly), пролин (Pro) и
 - (группа 6) ароматические: триптофан (Trp), тирозин (Tyr), фенилаланин (Phe).
- Неконсервативные замены повлекут обмен члена одного из таких классов на другой.

Таблица 1А

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

Изменения в аминокислотной последовательности вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента могут включать аминокислотную вставку, делецию, замену и т.п., одну или несколько модификаций основной цепи или боковой цепи одной или нескольких аминокислот, или присоединение группы или другой молекулы к одной или нескольким аминокислотам (боковым цепям или основной цепи).

Вариантное антитело или антиген-связывающий фрагмент может иметь существенное сходство последовательности и/или идентичность последовательности своей аминокислотной последовательности с таковой аминокислотной последовательности исходного антитела или антиген-связывающего фрагмента. Степень сходства между двумя последовательностями основана на доле идентичностей (идентичных аминокислот) и консервативной замены.

Как правило, степень сходства и идентичности между варьируемыми цепями определяли в данном документе при помощи программы для последовательностей Blast2 (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) при помощи настроек по умолчанию, т.е. программы blastp, матрицы BLOSUM62 (штраф за открытие разрыва 11 и штраф за удлинение разрыва 1; предельная длина разрыва 50, порог 10,0, размер слова 3) и активированных фильтров.

Процентная идентичность будет, таким образом, свидетельствовать об аминокислотах, которые идентичны аминокислотам исходного пептида и которые могут занимать такое же или сходное положение. Процентное сходство будет свидетельствовать об аминокислотах, которые идентичны, и аминокислотах, которые заменены консервативной аминокислотной заменой, по сравнению с исходным пептидом в таком же или сходном положении.

Варианты настоящего изобретения, таким образом, содержат такие, которые могут иметь по меньшей мере 70, 75, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% идентичность последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 81% идентичность последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство после-

довательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 82% идентичность последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 85% идентичность последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Дополнительные иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 95% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

Другие дополнительные иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые имеют по меньшей мере 97% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

В целях краткости заявитель приводит в данном документе табл. 1В, иллюстрирующую иллюстративные варианты осуществления отдельных вариантов, охватываемых настоящим изобретением и включающих указанный % идентичности последовательности и % сходства последовательности. Каждый "X" следует истолковывать как обозначающий заданный вариант.

Таблица 1В

		Процент (%) идентичности последовательности																				
Процент (%) сходства последовательности		80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
	80	x																				
	81	x	x																			
	82	x	x	x																		
	83	x	x	x	x																	
	84	x	x	x	x	x																
	85	x	x	x	x	x	x															
	86	x	x	x	x	x	x	x														
	87	x	x	x	x	x	x	x	x													
	88	x	x	x	x	x	x	x	x	x												
	89	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x											
	90	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
91	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x										
92	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x									
93	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x								
94	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x							
95	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x						
96	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x					
97	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x				
98	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x			
99	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		
100	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	

Настоящее изобретение охватывает CDR, вариабельные участки легкой цепи, вариабельные участки тяжелой цепи, легкие цепи, тяжелые цепи, антитела и/или антиген-связывающие фрагменты, которые имеют по меньшей мере 70% идентичность или по меньшей мере 80% идентичность с последовательностью, описанной в данном документе.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает антитела и антиген-связывающий фрагмент, которые способны специфично связываться с КААG1, и которые могут содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 16, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 18,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 20, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 22,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 24, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 26,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 48, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 46,
- вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последова-

z) вариабельного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 124, и вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 143.

В соответствии с настоящим изобретением варианты антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать CDRs, идентичные с таковыми соответствующего вариабельного участка легкой и/или тяжелой цепи. В другом случае варианты антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать варианты CDR(s).

Таким образом, иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения представляют собой такие, которые содержат вариабельный участок легкой цепи, содержащий последовательность по меньшей мере на 70, 75, 80% идентичную SEQ ID NO: 16, 20, 24, 103, 106 или 121. CDRs такого варианта могут быть идентичны таковым соответствующего не вариантного (последовательность дикого типа) антитела или антиген-связывающего фрагмента, или могут отличаться 1-3 аминокислотами.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 16 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 16. Вариант SEQ ID NO: 16 приведен в SEQ ID NO: 168.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 20 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 20.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 24 и имеет, например, 1-21 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 24. Вариант SEQ ID NO: 24 приведен в SEQ ID NO: 172.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 103 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 103.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 106 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 106.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка легкой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 121 и имеет, например, 1-21 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 121.

В отдельных случаях вариабельный участок легкой цепи вариантного антитела может содержать аминокислотные делеции или присоединения (в сочетании с аминокислотными заменами или без них). Зачастую, может быть допущено 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных делеций или присоединений.

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения представляют собой такие, которые содержат вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность по меньшей мере на 70, 75, 80% идентичную SEQ ID NO: 18, 22, 26, 126, 138 или 145. CDRs такого варианта могут быть идентичны таковым соответствующего не вариантного (последовательность дикого типа) антитела или антиген-связывающего фрагмента, или могут отличаться 1-3 аминокислотами.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 18 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 18. Вариант SEQ ID NO: 18 приведен в SEQ ID NO: 169.

Иллюстративный вариант осуществления вариабельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность

CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 22 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 22.

Иллюстративный вариант осуществления варибельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает варибельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 26 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 26. Вариант SEQ ID NO: 26 приведен в SEQ ID NO: 173.

Иллюстративный вариант осуществления варибельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает варибельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 126 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 126.

Иллюстративный вариант осуществления варибельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает варибельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 145 и имеет, например, 1-23 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 145.

Иллюстративный вариант осуществления варибельного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает варибельный участок тяжелой цепи, имеющий аминокислотную последовательность CDR, которая на 100% идентична аминокислотной последовательности CDR SEQ ID NO: 138 и имеет, например, 1-22 аминокислотных модификаций (например, консервативных или не консервативных аминокислотных замен) в своем каркасном участке по сравнению с каркасным участком SEQ ID NO: 138.

В отдельных случаях варибельный участок тяжелой цепи вариантного антитела может содержать аминокислотные делеции или присоединения (в сочетании с аминокислотными заменами или без них). Зачастую, может быть допущено 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотных делеций или присоединений.

Вариантные CDRs.

Также настоящим изобретением охвачены полипептиды или антитела, содержащие варибельные цепи по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой по меньшей мере в одном из описанных в данном документе CDRs (по сравнению с исходным CDR).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие варибельные цепи по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой по меньшей мере в двух из CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие варибельные цепи по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой в трех CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие варибельные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами по меньшей мере в одном из CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие варибельные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами по меньшей мере в двух из CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Настоящее изобретение также охватывает полипептиды, антитела или антиген-связывающие фрагменты, содержащие варибельные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами в трех CDRs (по сравнению с исходными CDRs).

Сравнение аминокислотных последовательностей варибельных участков легкой цепи или варибельных участков тяжелой цепи антител, демонстрирующих отличные свойства, позволило нам получать консенсусные последовательности с CDRs в пределах варибельных участков. Согласованность CDRs приведена в последовательностях SEQ ID Nos: 72-88.

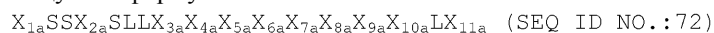
Настоящее изобретение, таким образом, предлагает в иллюстративном варианте осуществления выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, содержащий варибельный участок легкой цепи с:

- а) последовательностью CDRL1, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73;
- б) последовательностью CDRL2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; или
- с) последовательностью CDRL3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79.

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает в иллюстративном варианте осуществления выделенное антитело или антиген-связывающий фрагмент, содержащий варибельный участок тяжелой цепи с:

- а) последовательностью CDRH1, включающей SEQ ID NO: 80;
 б) последовательностью CDRH2, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85; или
 в) последовательностью CDRH3, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL1, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1a} может быть основной аминокислотой;

X_{2a} может быть основной аминокислотой;

X_{3a} может быть H, Y или N;

X_{4a} может быть S, T, N или R;

X_{5a} может отсутствовать, быть S или N;

X_{6a} может быть D, F или N;

X_{7a} может быть G или Q;

X_{8a} может быть K, L или N;

X_{9a} может быть T или N;

X_{10a} может быть ароматической аминокислотой и

X_{11a} может быть A, N, E или Y.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1a} может быть K или R.

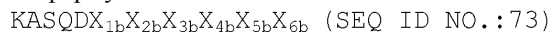
В дополнительном варианте осуществления изобретения X_{2a} может быть Q или K.

В еще одном дополнительном варианте осуществления изобретения X_{3a} может быть N или H.

В дополнительном варианте осуществления изобретения X_{10a} может быть Y или F.

Более конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL1 последовательности SEQ ID NO: 72, где X_{1a} представляет собой K; X_{2a} представляет собой Q; X_{3a} представляет собой N; X_{4a} представляет собой H; X_{5a} представляет собой S; X_{6a} представляет собой N; X_{7a} представляет собой Q; X_{8a} представляет собой K; X_{9a} представляет собой N; X_{10a} представляет собой Y или X_{11a} представляет собой A.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL1, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1b} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{2a} может быть G или H;

X_{3b} может быть T, N или R;

X_{4b} может быть F, Y или A;

X_{5b} может быть гидрофобной аминокислотой, и;

X_{6b} может быть N или A.

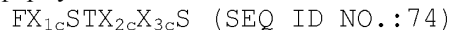
В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1b} может быть V или I.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5b} может быть V или L.

Более конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL1 последовательности SEQ ID NO: 73, где X_{1b} представляет собой I; X_{2b} представляет собой H; X_{3b} представляет собой T; X_{4b} представляет собой N; X_{5b} представляет собой L или X_{6b} представляет собой N.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRL1 приведены в SEQ ID NOs: 89 и 90.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL2, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1c} представляет собой A или G;

X_{2c} представляет собой R или T и

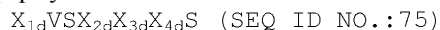
X_{3c} представляет собой E, K или A.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1c} может быть A, и X_{2c} может быть T.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1c} может быть A, и X_{2c} может быть R.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO: 74, где X_{1c} представляет собой A; X_{2c} представляет собой R или X_{3c} представляет собой E.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL2, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1d} может быть L или K;

X_{2d} может быть основной аминокислотой;

X_{3d} может быть L или R и

X_{4d} может быть D или F.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2d} может быть K или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO: 75, где X_{1d} представляет собой L; X_{2d} представляет собой K; X_{3d} представляет собой L или X_{4d} представляет собой D.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL2, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1e} может быть основной аминокислотой;

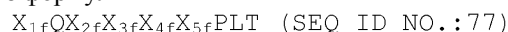
X_{2e} может быть D или A.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1e} может быть R или H.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO: 76, где X_{1e} представляет собой R или X_{2e} представляет собой D.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRL2 приведены в SEQ ID NOs: 91-93.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL3, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1f} может быть Q или L;

X_{2f} может быть ароматической аминокислотой;

X_{3f} может быть D, F или Y;

X_{4f} может быть E, A, N или S и

X_{5f} может быть I, F или T.

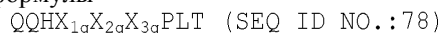
В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2f} может быть Y или H.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3f} может быть Y или D.

Еще в одном иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5f} может быть I или T.

Более конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL3 последовательности SEQ ID NO: 77, где X_{1f} представляет собой Q; X_{2f} представляет собой H; X_{3f} представляет собой D; X_{3f} представляет собой Y; X_{4f} представляет собой S; X_{4f} представляет собой E; X_{4f} представляет собой A; X_{5f} представляет собой T или X_{5f} представляет собой I.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL3, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1g} может быть ароматической аминокислотой;

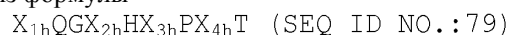
X_{2g} может быть N или S и

X_{3g} может быть I или T.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1g} может быть F или Y.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL3 последовательности SEQ ID NO: 78, где X_{2g} представляет собой S или X_{3g} представляет собой T.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRL3, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1h} может быть ароматической аминокислотой;

где X_{2h} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

где X_{3h} может быть F или V и

где X_{4h} может быть R или L.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1h} может быть W или F.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2h} может быть S или T.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL3 последовательности SEQ ID NO: 79, где X_{1h} представляет собой W; X_{2h} представляет собой T; X_{3h} представляет собой F или X_{4h} представляет собой R.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRL3 приведены в SEQ ID NOs: 94 и 95

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH1, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1i} может быть T, I или K;

X_{2i} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{3i} может быть кислой аминокислотой;

X_{4i} может быть E, N или D и

X_{5i} может быть гидрофобной аминокислотой.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2i} может быть T или S.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3i} может быть D или E.

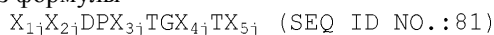
Еще в одном иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{4i} может быть N или E.

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5i} может быть M, I или v.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH1 последовательности SEQ ID NO: 80, где X_{2i} представляет собой T; X_{3i} представляет собой D; X_{4i} представляет собой I или X_{5i} представляет собой M.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRH1 приведены в SEQ ID NOs: 96 и 97.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1j} может быть V или G;

X_{2j} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{3j} может быть A, G или E;

X_{4j} может быть R, G, D, A, S, N или V и

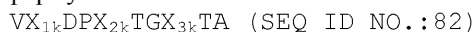
X_{5j} может быть гидрофобной аминокислотой.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2j} может быть I или L.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{5j} может быть A или V.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 81, где X_{1j} представляет собой V; X_{2j} представляет собой I; X_{3j} представляет собой E, X_{4j} представляет собой D, или X_{5j} представляет собой A.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1k} может быть гидрофобной аминокислотой;

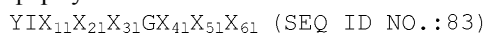
X_{2k} может быть A, E или G;

X_{3k} может быть R, G, D, A, S, N, V или D.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1k} может быть L или I.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 82, где X_{1k} представляет собой I; X_{2k} представляет собой E или X_{3k} представляет собой D.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы



где X_{11} может быть S или N;

X_{21} может быть ароматической аминокислотой

X_{31} может быть D, E или N;

X_{41} может быть D или H;

X_{51} может быть Y, S или N;

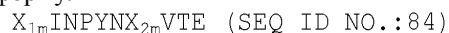
X_{61} может быть D, E или N.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{31} может быть D или N.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{61} может быть D или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 83, где X_{21} представляет собой F или Y; X_{31} представляет собой N, X_{41} представляет собой D, или X_{61} представляет собой N.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы



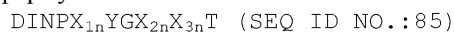
где X_{1m} может быть N или Y и

X_{2m} может быть E, D или N.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2m} может быть D или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH2 последовательности SEQ ID NO: 84, где X_{1m} представляет собой N или X_{2m} представляет собой D.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH2, содержащую или состоящую из формулы



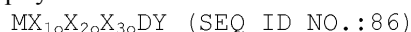
где X_{1n} может быть N или Y,

X_{2n} может быть G или T и

X_{3n} может быть I или T.

Другие иллюстративные варианты осуществления CDRH2 приведены в SEQ ID NOs: 98 и 99.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH3, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1o} может быть G или S;

X_{2o} может быть Y или H и

X_{30} может быть A или S.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO: 86, где X_{10} представляет собой G; X_{20} представляет собой Y или X_{30} представляет собой S.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH3, содержащую или состоящую из формулы

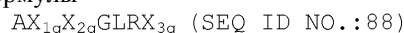


где X_{1p} может быть G или S и

X_{2p} может отсутствовать или быть M.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO: 87, где X_{1p} представляет собой S или X_{2p} представляет собой M.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут содержать последовательность CDRH3, содержащую или состоящую из формулы



где X_{1q} может быть R или W;

X_{2q} может быть ароматической аминокислотой и

X_{3q} может быть основной аминокислотой.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{2q} может быть W или F.

В другом иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{3q} может быть Q или N.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO: 88, где X_{1q} представляет собой R; X_{2q} представляет собой W или X_{3q} представляет собой N.

Вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты, охватываемые настоящим изобретением, включают те, которые могут содержать вставку, делецию или аминокислотную замену (консервативную или не консервативную). Такие варианты могут иметь по меньшей мере один удаленный аминокислотный остаток в своей аминокислотной последовательности и другой остаток, вставленный на его место.

Гуманизированные антитела.

Иллюстративные варианты осуществления вариантных антител и антиген-связывающих фрагментов настоящего изобретения представляют собой группу антител и антиген-связывающих фрагментов, способных связываться с КААГ1 и охарактеризованных в данном документе как гуманизированные.

Гуманизированные антитела и антиген-связывающие фрагменты настоящего изобретения более конкретно включают гуманизированные антитела 3D3, 3A4 или 3C4 и антиген-связывающие фрагменты. Гуманизированные антитела 3D3, 3A4 или 3C4 в каркасном участке содержат по меньшей мере одну аминокислоту, которая отличает их от моноклональных антител 3D3, 3A4 или 3C4.

Гуманизированные антитела 3A4, содержащие CDRs, идентичные таковым моноклонального антитела 3A4 (VL SEQ ID NO: 48, VH: SEQ ID NO: 46), были получены и исследованы. Эти гуманизированные антитела содержат вплоть до 11 аминокислотных замен (от одной до одиннадцати) в вариабельном каркасном участке легкой цепи и вплоть до 23 аминокислотных замен (от одной до двадцати трех) в вариабельном каркасном участке тяжелой цепи, отличающих их от моноклонального антитела 3A4. Заявитель показал, что эти гуманизированные антитела 3A4 связываются с КААГ1 столь же эффективно, как и моноклональное антитело 3A4.

Иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антиген-связывающих фрагментов включают такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 186

SEQ ID NO.: 186

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLYQKPGQSPXLLIHTVSN

RFGSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGYYCFQGSHPVPLTFGXGTXLXK,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48. Аминокислотной заменой может быть, например, аминокислота, находящаяся в соответствующем положении в естественном антителе человека или в консенсусной последовательности антитела человека. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 187

SEQ ID NO.: 187

DX_{e1}VTQTPLSLX_{e2}VX_{e3}X_{e4}GX_{e5}X_{e6}ASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLYQKPGQSPX

{e7}LLIHTVSNRFGSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX{e8}GYYCFQGSHPVPLTFGX_{e9}GTX_{e1}

₀LEX_{e11}K,

где X_{e1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{e2} может быть A или P;

X_{e3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{e4} может быть L или P;

X_{e5} может быть кислой аминокислотой;

X_{e6} может быть Q или P;

X_{e7} может быть основной аминокислотой;

X_{e8} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{e9} может быть A или Q;

X_{e10} может быть основной аминокислотой или

X_{e11} может быть гидрофобной аминокислотой,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

Дополнительный иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют переменный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 188

SEQ ID NO.: 188

DX_{E1}VMTQTPLSLX_{E2}VX_{E3}X_{E4}GX_{E5}X_{E6}ASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPX

{E7}LLIHTVSNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX{E8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{E9}GTX_{E1}

₀LEX_{E11}K

где X_{E1} может быть V или I;

X_{E2} может быть A или P;

X_{E3} может быть S или T;

X_{E4} может быть L или P;

X_{E5} может быть D или E;

X_{E6} может быть Q или P;

X_{E7} может быть K или Q;

X_{E8} может быть L или V;

X_{E9} может быть A или Q;

X_{E10} может быть R или K или

X_{E11} может быть L или I,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

В соответствии с вариантом осуществления вариант переменного домена легкой цепи может иметь последовательность, которая приведена в SEQ ID NO: 189 или 190

SEQ ID NO.: 189

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN

RFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

SEQ ID NO.: 190

DVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN

RFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

Иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антиген-связывающих фрагментов включают такие, которые имеют переменный участок тяжелой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 191

SEQ ID NO.: 191

QXQLVQSGXEXXKPGASVKX₅SCKASGYTFTDDYMSWVX₆QXXGX₇LEW₈GDINPYNGDT

₁NYNQKFKGXXXXTXDXSXSTAYMX₂LSLX₃SEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTVTVSS,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46. Аминокислотной заменой может быть, например, аминокислота, находящаяся в соответствующем положении в естественном антителе человека или в консенсусной последовательности антитела человека. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют переменный участок тяжелой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 192

SEQ ID NO.: 192

QX_{f1}QLVQSGX_{f2}EX_{f3}X_b_{f4}KPGASVKX_{f5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{f6}QX_{f7}X_{f8}GX_{f9}X_{f1}

₀LEW_X_{f11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{f12}X_{f13}X_b_{f14}X_{f15}TX_{f16}DX_{f17}SX_{f18}STAYMX_{f19}LX_{f20}SL

X_{f21}SEDX_{f22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXT_{f23}TVTVSS,

где X_{f1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{bf2} может быть Р или А;

X_{f3} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{f4} может быть V или K;

X_{f5} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{f6} может быть основной аминокислотой;

X_{f7} может быть S или A;

X_{f8} может быть H или R;

X_{f9} может быть основной аминокислотой;

X_{f10} может быть S или G;

X_{f11} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{f12} может быть основной аминокислотой;

X_{f13} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{f14} может быть I или T;

X_{f15} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{f16} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{f17} может быть K или T;

X_{f18} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{f19} может быть Q или E;

X_{f20} может быть N или S;

X_{f21} может быть T или R;

X_{f22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой или

X_{f23} может быть S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

Дополнительный иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антиген-связывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок тяжелой цепи, который приведен в SEQ ID NO: 193

SEQ ID NO.: 193

QX_{F1}QLVQSGX_{F2}EX_{F3}X_{F4}KPGASVKX_{F5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{F6}QX_{F7}X_{F8}GX_{F9}X_{F10}

LEWX_{F11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{F12}X_{F13}X_{F14}X_{F15}TX_{F16}DX_{F17}SX_{F18}STAYMX_{F19}LX_{F20}SLX

F₂₁SEDX_{F22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTX_{F23}VTVSS

где X_{F1} может быть I или V;

X_{F2} может быть Р или А;

X_{F3} может быть M или V;

X_{F4} может быть V или K;

X_{F5} может быть M или V;

X_{F6} может быть K или R;

X_{F7} может быть S или A;

X_{F8} может быть H или P;

X_{F9} может быть K или Q;

X_{F10} может быть S или G;

X_{F11} может быть I или M;

X_{F12} может быть K или R;

X_{F13} может быть A или V;

X_{F14} может быть I или T;

X_{F15} может быть L или I;

X_{F16} может быть V или A;

X_{F17} может быть K или T;

X_{F18} может быть S или T;

X_{F19} может быть Q или E;

X_{F20} может быть N или S;

X_{F21} может быть T или R;

X_{F22} может быть S или T или

X_{F23} является S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

В соответствии с вариантом осуществления вариант вариабельного домена тяжелой цепи может иметь последовательность, которая приведена в любой из SEQ ID NO: 194-197

SEQ ID NO.:194
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
 NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.
 SEQ ID NO.:195
 QIQILVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
 NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.
 SEQ ID NO.:196
 QIQILVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.
 SEQ ID NO.:197
 QIQILVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

В соответствии с вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMTQSPXSLAVSXGXXXTXNCKSSQSLNLSNFQKNFLAWYQQKPGQXPRLIIYFAS
 TRESSXPDRFXGSGSGTDFTLTISXQAEDXAXYXCQQHYSTPLTFGXGTXKLEK (SEQ ID
 NO.:174);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 16. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMTQSPX_{A1}SLAVSX_{A2}GX_{A3}X_{A4}X_{A5}TX_{A6}NCKSSQSLNLSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{A7}
 PKLLIYFASTRESSX_{A8}PDRFX_{A9}GSGSGTDFTLTISX_{A10}QAEDX_{A11}AX_{A12}YX_{A13}CQQHYSTP
 LTFGX_{A14}GTXKLEK_{A15}K (SEQ ID NO.:175);

где X_{A1} может быть, например, D или S;

X_{A2} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - L или I;

X_{A3} может быть, например, E или Q;

X_{A4} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - R или K;

X_{A5} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - A или V;

X_{A6} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или M;

X_{A7} может быть, например, P или S;

X_{A8} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или I;

X_{A9} может быть, например, S или I;

X_{A10} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - L или V;

X_{A11} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{A12} может быть, например, V или D;

X_{A13} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - Y или F;

X_{A14} может быть, например, Q или A и

X_{A15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или L.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMTQSPX_{a1}SLAVSX_{a2}GX_{a3}X_{a4}X_{a5}TX_{a6}NCKSSQSLNLSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{a7}
 PKLLIYFASTRESSX_{a8}PDRFX_{a9}GSGSGTDFTLTISX_{a10}QAEDX_{a11}AX_{a12}YX_{a13}CQQHYSTP
 LTFGX_{a14}GTXKLEK_{a15}K (SEQ ID NO.:176);

где X_{a1} может быть, например, D или S;

X_{a2} может быть, например, L или I;

X_{a3} может быть, например, E или Q;

X_{a4} может быть, например, R или K;

X_{a5} может быть, например, A или V;

X_{a6} может быть, например, I или M;

X_{a7} может быть, например, P или S;

X_{a8} может быть, например, V или I;

X_{a9} может быть, например, S или I;

X_{a10} может быть, например, L или V;

X_{a11} может быть, например, V или L;

X_{a12} может быть, например, V или D;

X_{a13} может быть, например, Y или F;

X_{a14} может быть, например, Q или A и

X_{a15} может быть, например, I или L.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLX_QSAEXX_{PGASVXX}SCKASGYIFTDYEIHWVX_QXPXXGLEW_XGVIDPETGNT
AFNQKFKGX_{XTXTADXSX}STAYMELSSLTSED_{XAVYYCMGYSDYWGQGTXX}TVSS (SEQ ID
NO.:177);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 18. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLX_{B1}Q_{SX}B2AEX_{B3}X_{B4}X_{B5}PGASVX_{B6}X_{B7}SCKASGYIFTDYEIHWVX_{B8}QX_{B9}PX_{B10}X_{B1}
1GLEW_XB12GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{B13}X_{B14}TX_{B15}TADX_{B16}SX_{B17}STAYMELSSLTSED_XB18
AVYYCMGYSDYWGQGT_XB19X_{B20}TVSS (SEQ ID NO.:178),

где X_{B1} может быть, например, V или Q;

X_{B2} может быть, например, G или V;

X_{B3} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{B4} может быть, например, K или V;

X_{B5} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - K или R;

X_{B6} может быть, например, K или T;

X_{B7} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{B8} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - R или K;

X_{B9} может быть, например, A или T;

X_{B10} может быть, например, G или V;

X_{B11} может быть, например, Q или H;

X_{B12} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - M или I;

X_{B13} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - R или K;

X_{B14} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или A;

X_{B15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или L;

X_{B16} может быть, например, T или I;

X_{B17} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{B18} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{B19} может быть, например, L или T и

X_{B20} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3D3 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLX_{b1}Q_{SX}b2AEX_{b3}X_{b4}X_{b5}PGASVX_{b6}X_{b7}SCKASGYIFTDYEIHWVX_{b8}QX_{b9}PX_{b10}X_{b1}
1GLEW_Xb12GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{b13}X_{b14}TX_{b15}TADX_{b16}SX_{b17}STAYMELSSLTSED_Xb18
AVYYCMGYSDYWGQGT_Xb19X_{b20}TVSS (SEQ ID NO.:179);

где X_{b1} может быть, например, V или Q;

X_{b2} может быть, например, G или V;

X_{b3} может быть, например, V или L;

X_{b4} может быть, например, K или V;

X_{b5} может быть, например, K или R;

X_{b6} может быть, например, K или T;

X_{b7} может быть, например, V или L;

X_{b8} может быть, например, R или K;

X_{b9} может быть, например, A или T;

X_{b10} может быть, например, G или V;

X_{b11} может быть, например, Q или H;

X_{b12} может быть, например, M или I;

X_{b13} может быть, например, R или K;

X_{b14} может быть, например, V или A;

X_{b15} может быть, например, I или L;

X_{b16} может быть, например, T или I;

X_{b17} может быть, например, T или S;

X_{b18} может быть, например, T или S;

X_{b19} может быть, например, L или T;

X_{b20} может быть, например, V или L.

В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMX_{c1}QSPSSXXASXGXRVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKXPKTLIFRANRLVDGV
PSRFSGSGSGXDYXLTISLXXEDXXXYSCLQYDEIPLTFGXGTKLEXX (SEQ ID
NO.:180);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 24. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLIFR
ANRLVDGVPSRFSGSGSGX_{c7}DYX_{c8}LTISLX_{c9}X_{c10}EDX_{c11}X_{c12}X_{c13}YSCLQYDEIPLTFGX_{c1}
4GTKLEX_{c15}X_{c16} (SEQ ID NO.:181);

где X_{c1} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{c2} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - L или M;

X_{c3} может быть, например, S или Y;

X_{c4} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или L;

X_{c5} может быть, например, кислой аминокислотой или более конкретно - D или E;

X_{c6} может быть, например, A или S;

X_{c7} может быть, например, T или Q;

X_{c8} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{c9} может быть, например, Q или E;

X_{c10} может быть, например, P или F;

X_{c11} может быть, например, F или L;

X_{c12} может быть, например, A или G;

X_{c13} может быть, например, T или I;

X_{c14} может быть, например, Q или A;

X_{c15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или L и

X_{c16} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - K или R.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок легкой цепи формулы

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLIFR
ANRLVDGVPSRFSGSGSGX_{c7}DYX_{c8}LTISLX_{c9}X_{c10}EDX_{c11}X_{c12}X_{c13}YSCLQYDEIPLTFGX_{c1}
4GTKLEX_{c15}X_{c16} (SEQ ID NO.:182);

где X_{c1} может быть, например, T или S;

X_{c2} может быть, например, L или M;

X_{c3} может быть, например, S или Y;

X_{c4} может быть, например, V или L;

X_{c5} может быть, например, D или E;

X_{c6} может быть, например, A или S;

X_{c7} может быть, например, T или Q;

X_{c8} может быть, например, T или S;

X_{c9} может быть, например, Q или E;

X_{c10} может быть, например, P или F;

X_{c11} может быть, например, F или L;

X_{c12} может быть, например, A или G;

X_{c13} может быть, например, T или I;

X_{c14} может быть, например, Q или A;

X_{c15} может быть, например, I или L и

X_{c16} может быть, например, K или R.

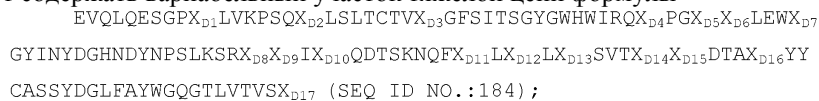
В соответствии с вариантом осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело 3C4 может содержать вариабельный участок тяжелой цепи формулы

EVQLQESGPX_{c1}LVKPSQX_{c2}LSLTCTVXGFSITSGYGWHWIRQXPGXXLEWXYINYDGHN
DYNPSLKRXXIXQDTSKNQFXLXLXSVTXXDTAXYYCASSYDGLFAYWGQGLTVTVSX
(SEQ ID NO.:183);

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в

полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 26. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизованное антитело 3C4 может содержать переменный участок тяжелой цепи формулы



где X_{D1} может быть, например, G или D;

X_{D2} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{D3} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - S или T;

X_{D4} может быть, например, H или F;

X_{D5} может быть, например, K или N;

X_{D6} может быть, например, G или K;

X_{D7} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - I или M;

X_{D8} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно - V или I;

X_{D8} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - T или S;

X_{D10} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - S или T;

X_{D11} может быть, например, нейтральной гидрофильной аминокислотой или более конкретно - S или F;

X_{D12} может быть, например, основной аминокислотой или более конкретно - K или Q;

X_{D13} может быть, например, S или N;

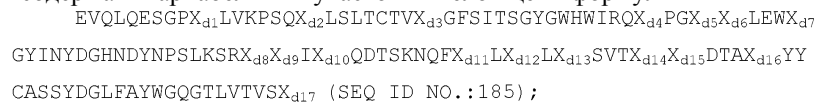
X_{D14} может быть, например, A или T;

X_{D15} может быть, например, A или E;

X_{D16} может быть, например, V или T и

X_{D17} может быть любой аминокислотой, A или отсутствовать.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления изобретения гуманизованное антитело 3C4 может содержать переменный участок тяжелой цепи формулы



где X_{d1} может быть, например, G или D;

X_{d2} может быть, например, T или S;

X_{d3} может быть, например, S или T;

X_{d4} может быть, например, H или F;

X_{d5} может быть, например, K или N;

X_{d6} может быть, например, G или K;

X_{d7} может быть, например, I или M;

X_{d8} может быть, например, V или I;

X_{d9} может быть, например, T или S;

X_{d10} может быть, например, S или T;

X_{d11} может быть, например, S или F;

X_{d12} может быть, например, K или Q;

X_{d13} может быть, например, S или N;

X_{d14} может быть, например, A или T;

X_{d15} может быть, например, A или E;

X_{d16} может быть, например, V или T и

X_{d17} представляет собой A или отсутствует;

Соответственно настоящее изобретение предлагает в одном аспекте антитело или его антиген-связывающий фрагмент, способный специфично связываться с ассоциированным с почками антигеном 1 (KAAG1), который может содержать переменный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 16, и/или переменный участок тяжелой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 18. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 18.

В другом аспекте настоящее изобретение также предлагает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который может содержать переменный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 24, и/или переменный участок тяжелой цепи, по меньшей мере

ре на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 26. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 24 или SEQ ID NO: 26.

В другом аспекте настоящее изобретение также предлагает антитело или его антиген-связывающий фрагмент, который может содержать вариабельный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 48, и/или вариабельный участок тяжелой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO: 46. Антитело или его антиген-связывающий фрагмент может также содержать по меньшей мере одну аминокислотную замену по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 48 или SEQ ID NO: 46.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения аминокислотная замена может быть вне участка, определяющего комплементарность (CDR). Антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющее такую аминокислотную последовательность, охватывает, например, гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент.

Как используется в данном документе, выражение "от одного до двадцати пяти" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 25; от 1 до 25; от 1 до 24, от 1 до 23, от 1 до 22, от 1 до 21, от 1 до 20, от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и т.д.; от 2 до 25, от 2 до 24, от 2 до 23, от 2 до 22, от 2 до 21, от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и т.д.; от 3 до 25, от 3 до 24, от 3 до 23, от 3 до 22, от 3 до 21, от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и т.д.; от 4 до 25, от 4 до 24, от 4 до 23, от 4 до 22, от 4 до 21, от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и т.д.; от 5 до 25, от 5 до 24, от 5 до 23, от 5 до 22, от 5 до 21, от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и т.д. и т.п.

Как используется в данном документе, выражение "от одного до двадцати трех" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 23; от 1 до 23, от 1 до 22, от 1 до 21, от 1 до 20, от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и т.д.; от 2 до 23, от 2 до 22, от 2 до 21, от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и т.д.; от 3 до 23, от 3 до 22, от 3 до 21, от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и т.д.; от 4 до 23, от 4 до 22, от 4 до 21, от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и т.д.; от 5 до 25, от 5 до 24, от 5 до 23, от 5 до 22, от 5 до 21, от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и т.д. и т.п.

Как используется в данном документе, выражение "от одного до двадцати" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 20; от 1 до 20, от 1 до 19; от 1 до 18; от 1 до 17; от 1 до 16; от 1 до 15 и т.д.; от 2 до 20; от 2 до 19; от 2 до 18; от 2 до 17 и т.д.; от 3 до 20; от 3 до 19; от 3 до 18 и т.д.; от 4 до 20; от 4 до 19; от 4 до 18; от 4 до 17; от 4 до 16 и т.д.; от 5 до 20; от 5 до 19; от 5 до 18; от 5 до 17 и т.д. и т.п.

Таким же образом выражение "от одного до пятнадцати" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 15; от 1 до 15, от 1 до 14; от 1 до 13; от 1 до 12; от 1 до 11; от 1 до 10 и т.д.; от 2 до 15; от 2 до 14; от 2 до 13; от 2 до 12 и т.д.; от 3 до 15; от 3 до 14; от 3 до 13 и т.д.; от 4 до 15; от 4 до 14; от 4 до 13; от 4 до 12; от 4 до 11 и т.д.; от 5 до 15; от 5 до 14; от 5 до 13; от 5 до 12 и т.д. и т.п.

Таким же образом выражение "от одного до одиннадцати" включает каждое индивидуальное значение и изменяется, как, например, от 1, 2, 3 и вплоть до 11; от 1 до 11, от 1 до 10; от 1 до 9; от 1 до 8; от 1 до 7 и т.д.; от 2 до 11; от 2 до 10; от 2 до 9; от 2 до 8 и т.д.; от 3 до 11; от 3 до 10; от 3 до 9 и т.д.; от 4 до 11; от 4 до 10; от 4 до 9; от 4 до 8; от 4 до 7 и т.д.; от 5 до 11; от 5 до 10; от 5 до 9; от 5 до 8 и т.д. и т.п.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке легкой цепи, полученном из SEQ ID NO: 16, может составлять, например, от 1 до 15 аминокислотных замен.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке тяжелой цепи, полученном из SEQ ID NO: 18, может составлять, например, от 1 до 20 аминокислотных замен. В некоторых случаях при рассмотрении гуманизированной версии последовательности SEQ ID NO: 18, может быть полезно иметь по меньшей мере три аминокислотные замены.

В последующем более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке легкой цепи, полученном из SEQ ID NO: 24, может составлять, например, от 1 до 16 аминокислотных замен.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке тяжелой цепи, полученном из SEQ ID NO: 26, может составлять, например, от 1 до 17 аминокислотных замен.

В последующем более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке легкой цепи, полученном из SEQ ID NO: 48, может составлять, например, от 1 до 11 аминокислотных замен.

В более конкретном варианте осуществления данного изобретения число аминокислотных замен, которые могут быть размещены в гуманизированном вариабельном участке тяжелой цепи, полученном из SEQ ID NO: 46, может составлять, например, от 1 до 23 аминокислотных замен.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения от одной до двадцати аминокис-

лотных замен может находиться, например, в вариабельном участке легкой цепи.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения от одной до двадцати аминокислотных замен может находиться, например, в вариабельном участке тяжелой цепи.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент может, таким образом, иметь вариабельный участок легкой цепи, содержащий вплоть до двадцати аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 16 или SEQ ID NO: 24, и может иметь вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий вплоть до двадцати аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 18 или SEQ ID NO: 26. Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент может, таким образом, иметь вариабельный участок легкой цепи, содержащий вплоть до двадцати пяти аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 48, и может иметь вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий вплоть до двадцати пяти аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO: 46.

Здесь следует понимать, что если гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент имеет два вариабельных участка в легкой цепи, то каждый из вариабельных участков легкой цепи может независимо содержать вплоть до двадцати пяти, двадцати четырех, двадцати трех, двадцати двух, двадцати одной, двадцати, девятнадцати, восемнадцати, семнадцати, шестнадцати, пятнадцати, четырнадцати, тринадцати, двенадцати, одиннадцати, десяти, девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех, трех, двух, одной аминокислотных замен, и каждый из вариабельных участков тяжелой цепи может независимо содержать вплоть до двадцати пяти, двадцати четырех, двадцати трех, двадцати двух, двадцати одной, двадцати, девятнадцати, восемнадцати, семнадцати, шестнадцати, пятнадцати, четырнадцати, тринадцати, двенадцати, одиннадцати, десяти, девяти, восьми, семи, шести, пяти, четырех, трех, двух, одной аминокислотных замен.

Как обсуждается в данном документе, аминокислотные замены могут быть консервативными или неконсервативными. В иллюстративном варианте осуществления аминокислотные замены могут быть консервативными.

Здесь следует понимать, что гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент данного изобретения может также иметь вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи, в котором есть делеция в отличие от последовательностей SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 189, SEQ ID NO: 190, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 24 и/или SEQ ID NO: 26. Такие делеции можно найти, например, в аминокислотном или карбоксиконце вариабельного участка легкой цепи и/или вариабельного участка тяжелой цепи.

Другой иллюстративный вариант осуществления гуманизированного антитела или антиген-связывающего фрагмента данного изобретения включает, например, антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющий вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 186, SEQ ID NO: 187, SEQ ID NO: 188, SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 190.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 186" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 или по меньшей мере 112 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 186" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 186, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 186, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 108, с 5 по 109, с 13 по 103, с 14 по 111 последовательности SEQ ID NO: 186, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 187" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111 или по меньшей мере 112 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 187" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 187, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 187, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 7 по 109, с 12 по 104, с 22 по 113, с 18 по 112 последовательности SEQ ID NO: 187, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 188", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 189" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 190" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 189 или 190.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содер-

жит (или дополнительно содержит), например, вариабельный участок тяжелой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 191, 192, 193, 194, 195, 196 или 197.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 191" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 191" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 191, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 191, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 1 по 106, с 2 по 112, с 11 по 113, с 7 по 102 последовательности SEQ ID NO: 191, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 192" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 192" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 192, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 192, например последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 109, с 8 по 113, с 1 по 102, с 2 по 105 последовательности SEQ ID NO: 192, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 193", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 194", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 195", "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 196" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 197" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариабельный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 194, 195, 196 или 197.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать, например:

а) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 186, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

б) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 187, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

с) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 188, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

д) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197; или

е) вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 190, и вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 191, SEQ ID NO: 192, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 189 или 190, и вариабельный участок тяжелой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 194, 195, 196 или 197.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариабельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариабельный участок тяжелой

цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 194.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 195.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 196.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 189, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 197.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 194.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 195.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 196.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения вариативный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 190, и вариативный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 197.

Другой иллюстративный вариант осуществления гуманизированного антитела или антиген-связывающего фрагмента данного изобретения включает, например, антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющий вариативный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой из последовательностей SEQ ID NO: 174, SEQ ID NO: 175, SEQ ID NO: 176 или SEQ ID NO: 168.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 174" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 174" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 174, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 174, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 108, с 5 по 109, с 13 по 103, с 14 по 111 последовательности SEQ ID NO: 174, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 175" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 175" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 175, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 175, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 7 по 109, с 12 по 104, с 22 по 113, с 18 по 112 последовательности SEQ ID NO: 175, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 176" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 168" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, вариативный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 168.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содержит (или дополнительно содержит), например, вариативный участок тяжелой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 177, 178, 179 или 169.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 177" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 177" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 177, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 177, такие

как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 1 по 106, с 2 по 112, с 11 по 113, с 7 по 102 последовательности SEQ ID NO: 177, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 178" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112 или по меньшей мере 113 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 178" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 178, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 178, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 109, с 8 по 113, с 1 по 102, с 2 по 105 последовательности SEQ ID NO: 178, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 179" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 169" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, переменный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 169.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать, например:

f) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 174, и переменный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169;

g) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 175, и переменный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169;

h) переменный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 176, и переменный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169;

i) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 168, и переменный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 177, SEQ ID NO: 178, SEQ ID NO: 179 или SEQ ID NO: 169.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления данного изобретения переменный участок легкой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 168, и переменный участок тяжелой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 169.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения переменный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 168, и переменный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 169.

Другие иллюстративные варианты осуществления гуманизированных антител или антиген-связывающих фрагментов настоящего изобретения представляют собой те, которые могут содержать переменный участок легкой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 180, 181, 182 или 172.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 180" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 или по меньшей мере 107 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 180" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 180, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 180, например последовательность, содержащая аминокислоты с 6 по 102, с 11 по 106, с 1 по 106, с 3 по 95, с 5 по 95 последовательности SEQ ID NO: 180, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 181" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106 или по меньшей мере 107 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 181" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 181, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 181, например последовательность, со-

держащая аминокислоты с 9 по 106, с 10 по 101, с 1 по 98, с 3 по 99, с 7 по 107 последовательности SEQ ID NO: 181, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 182" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 172" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, варибельный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 172.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содержит (или дополнительно содержит), например, варибельный участок тяжелой цепи, который может включать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NOs: 183, 184, 185 или 173.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 183" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 183" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 183, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 183, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 3 по 111, с 1 по 106, с 2 по 104, с 5 по 106, с 10 по 107 последовательности SEQ ID NO: 183, и т.д.

Как используется в данном документе, выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 185" также включает выражение "по меньшей мере 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 109, 110, 111, 112, 113, 114, 115 или по меньшей мере 116 последовательных аминокислот". Выражение "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 185" охватывает любую возможную последовательность по меньшей мере из 90 последовательных аминокислот, находящуюся в последовательности SEQ ID NO: 185, и особенно те последовательности, которые включают три CDRs последовательности SEQ ID NO: 185, такие как, например, последовательность, содержащая аминокислоты с 3 по 107, с 1 по 115, с 1 по 110, с 22 по 116, с 20 по 115 последовательности SEQ ID NO: 185, и т.д.

Выражения "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 184" или "по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 173" имеют сходное значение.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь, например, варибельный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO: 173.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или антиген-связывающий фрагмент могут содержать, например:

а) варибельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 180, и варибельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173;

б) варибельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 181, и варибельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173;

в) варибельный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 182, и варибельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173; или

д) варибельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 172, и варибельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 185 или SEQ ID NO: 173.

В соответствии с более конкретным вариантом осуществления данного изобретения варибельный участок легкой цепи может иметь по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO: 172, и варибельный участок тяжелой цепи может иметь по меньшей мере 90 последовательных аминокислот любой последовательности SEQ ID NO: 173.

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения варибельный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 172, и варибельный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO: 173.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может иметь варибельный

участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи, как описывалось выше, и может дополнительно содержать аминокислоты константного участка, такие как, например, аминокислоты константного участка человеческого антитела.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может содержать, например, константный участок IgG1 человека.

В соответствии с другим иллюстративным вариантом осуществления настоящего изобретения антиген-связывающим фрагментом может быть, например, scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

Продуцирование антител в клетках.

Антитела к КАAG1, которые раскрыты в данном документе, можно получить при помощи ряда способов, которые знакомы специалистам в данной области техники, как, например, методика с использованием гибридомы или способами рекомбинантной ДНК.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к КАAG1 можно получить с помощью традиционной методики с использованием гибридомы, в котором мышь иммунизируют антигеном, клетки селезенки выделяют и проводят слияние с миеломными клетками без экспрессии HGPRT, и проводят отбор гибридных клеток при помощи среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимин (HAT).

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к КАAG1 можно получать при помощи способов рекомбинантной ДНК.

Для экспрессии антител к КАAG1 нуклеотидные последовательности, которые могут кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, или любую другую, можно вставить в вектор экспрессии, т.е. вектор, который содержит элементы для управления транскрипцией и трансляцией вставленной кодирующей последовательности в конкретном хозяине. Эти элементы могут включать регуляторные последовательности, такие как энхансеры, конститутивные и индуцибельные промоторы и 5'- и 3'-нетранслируемые участки. Для построения таких векторов экспрессии можно применять способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти способы включают методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

Для экспрессии полипептида или РНК, полученной из нуклеотидных последовательностей, которые могут кодировать любую из описанных в данном документе легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, можно использовать ряд систем вектор экспрессии/хозяин, которые известны специалистам в данной области техники. Такие системы включают, без ограничения, микроорганизмы, как, например, бактерии, трансформированные векторами экспрессии ДНК на основе рекомбинантного бактериофага, плазмиды или космиды; дрожжи, трансформированные векторами экспрессии на основе дрожжей; системы клеток насекомых, инфицированные векторами на основе бакуловирусов, системы растительных клеток, трансформированные вирусными или бактериальными векторами экспрессии; или системы животных клеток. Для долгосрочного продуцирования рекомбинантных белков в системах млекопитающих можно выполнить стабильную экспрессию в клеточных линиях. Например, нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина, описанные в данном документе, могут быть трансформированы в клеточную линию при помощи векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные сайты начала репликации и/или эндогенные элементы экспрессии и селективный или видимый маркерный ген на одном и том же или на отдельном векторе. Настоящее изобретение не следует ограничивать используемым вектором или клеткой-хозяином. В конкретных вариантах осуществления настоящего изобретения нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно лигировать в отдельный вектор экспрессии и экспрессировать каждую цепь отдельно. В другом варианте осуществления как легкие, так и тяжелые цепи, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно лигировать в один вектор экспрессии и экспрессировать одновременно.

Альтернативно, РНК и/или полипептид можно экспрессировать с вектора, содержащего нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, с помощью системы транскрипции *in vitro* или системы сопряженной транскрипции/трансляции *in vitro* соответственно.

В целом, клетки-хозяева, которые содержат нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, и/или которые экспрессируют пептид, кодируемый нуклеотидными последовательностями, способными кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, или их части, могут быть определены при помощи ряда процедур, известных специалистам в данной области техники. Такие процедуры включают, без ограничения, гибридизации ДНК/ДНК или ДНК/РНК, ПЦР-амплификацию и биологические способы анализа белка или метод иммуноанализа белка, которые включают основанные на мембране, растворе или чипе методики определения и/или количественного анализа последовательностей нуклеиновых кислот или аминокислот. Иммунологические способы определения и измерения экспрессии полипептидов при помощи либо специфических поликлональных, либо монокло-

нальных антител, известны в данной области техники. Примеры таких методик включают твердофазные иммуноферментные анализы (ELISA), радиоиммуноанализы (RIA) и сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS).

Специалисты в данной области техники могут легко адаптировать такие методики для настоящего изобретения.

Клетки-хозяева, содержащие нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно, таким образом, культивировать в условиях для транскрипции соответствующей РНК (мРНК, миРНК, кмРНК и т.д.) и/или экспрессии полипептида из клеточной культуры. Продуцируемый клеткой полипептид может выделяться или может оставаться внутри клетки в зависимости от применяемой последовательности и/или вектора. В иллюстративном варианте осуществления векторы экспрессии, содержащие нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, могут быть сконструированы с содержанием сигнальных последовательностей, которые направляют секрецию полипептида через мембрану прокариотической или эукариотической клетки.

В связи с природной вырожденностью генетического кода, другие ДНК-последовательности, которые кодируют такую же, практически такую же или функционально эквивалентную аминокислотную последовательность, можно получить и применять, например, для экспрессии полипептида, кодируемого нуклеотидными последовательностями, способными кодировать любую из тяжелых и легких цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе. Нуклеотидные последовательности настоящего изобретения могут быть сконструированы при помощи способов, которые, как правило, известны в данной области техники для изменения нуклеотидных последовательностей для ряда целей, включая, без ограничения, модификацию клонирования, процессинга и/или экспрессии генетического продукта. Для конструирования нуклеотидных последовательностей можно применять перестановку ДНК при помощи рандомизированной фрагментации и вторичную сборку фрагментов гена и синтетических олигонуклеотидов при помощи ПЦР. Например, олигосахарид-опосредованный сайт-направленный мутагенез можно применять для введения мутаций, которые создают новые рестрикционные сайты, изменяют профили гликозилирования, изменяют предпочтение в использовании кодонов, производят сплайс-варианты и тому подобное.

Кроме того, штамм клеток-хозяев можно выбрать по его способности модулировать экспрессию вставленных последовательностей или перерабатывать экспрессированный полипептид требуемым образом. Такие модификации полипептида включают, без ограничения, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидизацию и ацилирование. В иллюстративном варианте осуществления могут быть желательны антитела к КАAG1, которые содержат специальные структуры или профили гликозилирования. Пост-трансляционный процессинг, который расщепляет "препро"-форму полипептида, также можно применять с тем, чтобы точно задать белковое нацеливание, фолдинг и/или активность. Различные клетки-хозяева, которые имеют специфическое клеточное устройство и характерные механизмы пост-трансляционных активностей (например, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 и W138), можно приобрести или получить из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и могут быть выбраны для обеспечения надлежащей модификации и переработки экспрессированного полипептида.

Специалисты в данной области техники легко поймут, что природные, модифицированные или рекомбинантные последовательности нуклеиновых кислот могут быть лигированы с гетерологичной последовательностью, что приведет к трансляции химерного полипептида, содержащего гетерологичные полипептидные фрагменты в любых вышеупомянутых системах хозяев. Такие гетерологичные полипептидные фрагменты могут облегчать очистку химерных полипептидов при помощи коммерчески доступных аффинных матриц. Такие фрагменты включают, без ограничения, глутатион-S-трансферазу (GST), белок, связывающий мальтозу, тиоредоксин, пептид, связывающий кальмодулин, 6-His (His), FLAG, с-тус, гемагглютинин (HA) и эпитопы антител, такие как эпитопы моноклональных антител.

В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к полинуклеотиду, который может содержать нуклеотидную последовательность, кодирующую химерный белок. Химерный белок может содержать партнера слияния (например, HA, Fc и т.д.), слитого с полипептидом (например, полной легкой цепью, полной тяжелой цепью, вариабельными участками, CDR и т.д.), описанным в данном документе.

Специалисты в данной области легко поймут, что последовательности нуклеиновых кислот и полипептидов могут быть синтезированы полностью или частично при помощи хорошо известных в данной области техники химических или ферментативных способов. Например, синтез пептидов можно осуществить при помощи ряда твердофазных методик и оборудования, так, например, для автоматического синтеза можно применять синтезатор пептидов ABI 431A (PE Biosystems). В случае необходимости, для получения вариантного белка аминокислотную последовательность можно изменить в ходе синтеза и/или объединить с последовательностями из других белков.

Конъюгаты антител.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может быть соединен с поддающимся обнаружению фрагментом (т.е. предназначенным для обнаружения или диагностики) или

с терапевтическим фрагментом (для терапевтических целей).

"Обнаруживаемый фрагмент" представляет собой фрагмент, обнаруживаемый при помощи спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических и/или других физических средств. Обнаруживаемый фрагмент может быть соединен либо напрямую и/либо опосредованно (например, посредством связи, как, например, без ограничений, DOTA- или NHS-связь) с антителами и их антиген-связывающими фрагментами настоящего изобретения при помощи способов, хорошо известных в данной области техники. Можно применять широкий спектр обнаруживаемых фрагментов, при этом выбор зависит от необходимой чувствительности, простоты конъюгации, требований к стабильности и доступного оборудования. Подходящий обнаруживаемый фрагмент включает, без ограничения, флуоресцентную метку, радиоактивную метку (например, без ограничения, ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} и включая позитронно-активные изотопы для ПЭТ-сканера и т.д.), активную метку для ядерного магнитного резонанса, люминесцентную метку, хемилюминесцентную метку, хромофорную метку, ферментную метку (например, и без ограничения, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т.д.), квантовые точки и/или наночастицу. Обнаруживаемый фрагмент может вызывать и/или производить детектируемый сигнал, таким образом, позволяя регистрировать сигнал от обнаруживаемого фрагмента.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антиген-связывающий фрагмент может быть соединен (модифицирован) с терапевтическим фрагментом (например, лекарственным средством, цитотоксическим фрагментом, противораковым средством).

В иллюстративном варианте осуществления антитела к КААG1 или антиген-связывающие фрагменты могут содержать ингибитор, химиотерапевтическое или цитотоксическое средство. Например, антитело или антиген-связывающие фрагменты можно конъюгировать с химиотерапевтическим или цитотоксическим средством. Такие химиотерапевтические или цитотоксические средства включают, без ограничения, иттрий-90, скандий-47, рений-186, йод-131, йод-125 и многие другие известные специалистам в данной области техники (например, лютеций (например, Lu^{177}), висмут (например, Bi^{213}), медь (например, Cu^{67})). В других случаях химиотерапевтическое или цитотоксическое средство могут содержать, без ограничения, 5-фторурацил, адриамицин, иринотекан, соединения на основе платины, такие как цисплатин и анти-тубулин или анти-миотические соединения, такие как таксаны, доксорубин и циклофосфамид, эндотоксин представителей рода *Pseudomonas*, рицин и другие токсины. Пригодные лекарственные конъюгаты антител выбирают из тех, которые находятся в интервале IC_{50} , равном 0,001-150 нМ, 0,001-100 нМ, 0,001-50 нМ, 0,001-20 нМ или 0,001-10 нМ (включительно). Цитотоксическое лекарственное средство, используемое для присоединения, таким образом, выбирают на основе этих критериев.

Кроме того, для осуществления способов настоящего изобретения и, как известно в данной области техники, антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения (конъюгированное или нет) можно применять в сочетании со второй молекулой (например, вторичным антителом и т.д.), которое способно специфично связываться с антителом или антиген-связывающим фрагментом настоящего изобретения, и которые могут нести необходимый обнаруживаемый, диагностический или терапевтический фрагменты.

Фармацевтические композиции антител и их применение

Также настоящим изобретением охватываются фармацевтические композиции антител к КААG1 или антиген-связывающих фрагментов (конъюгированных или нет). Фармацевтическая композиция может содержать антитело к КААG1 или антиген-связывающий фрагмент и может также включать фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к композиции, которая может содержать антитело или антиген-связывающий фрагмент, описанный в данном документе, и носитель.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая может содержать антитело или антиген-связывающий фрагмент, описанный в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнение к активным ингредиентам, фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители, включая воду, забуференный фосфатом физиологический раствор (PBS), солевые растворы, желатин, масла, спирты и другие наполнители и вспомогательные добавки, которые способствуют переработке активных соединений в препараты, которые можно применять в фармацевтических целях. В других случаях такие препараты могут быть простерилизованы.

Как используется в данном документе выражение "фармацевтическая композиция" означает терапевтически эффективные количества средства вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, растворителями, эмульгаторами, вспомогательным средством и/или носителями. Как используется в данном документе выражение "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект для данного состояния и схемы введения. Такие композиции представляют собой жидкости или лиофилизированные или иным образом высушенные составы и включают разбавители с различным содержанием буферных компонентов (например, Tris-HCl , ацетат, фосфат), pH и ионной силой, добавок, как, например, альбумин или желатин, для предупреждения абсорбции на поверхностях детергентов (например, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68,

соли желчной кислоты). Солюбилизирующие средства (например, глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, матабисульфит натрия), консерванты (например, тиме-росал, бензиловый спирт, парабены), вещества-наполнители или модификаторы концентрации (например, лактоза, маннит), ковалентное присоединение полимеров, как, например, полиэтиленгликоля с белком, комплексобразование с ионами металлов или внесение материала в препараты или на них в виде частиц полимерных соединений, как, например, полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, гидрогелей и т.д., или на липосомы, микроэмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, "тени" эритроцитов или сферопласты. Такие композиции будут оказывать действие на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*. Композиции с контролируемым или пролонгированным высвобождением включают состав в липофильном депо (например, жирные кислоты, виды воска, масла). Также настоящим изобретением охватываются композиции в виде частиц, покрытых полимерами (например, полксамерами или полксаминами). Другие варианты осуществления композиций настоящего изобретения включают защитные оболочки для форм в виде частиц, ингибиторы протеаз или усилители проникновения для различных путей введения, включая парентеральные, пульмональные, назальные, пероральные, вагинальные, ректальные пути. В одном варианте осуществления фармацевтическую композицию вводят парентерально, в район опухоли, транс-мукозально, трансдермально, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, подкожно, внутрибрюшинно, интравентрикулярно, интракраниально и в опухоль.

Дополнительно, как используется в данном документе выражения "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтический носитель" известны в данной области техники и включают, без ограничения, 0,01-0,1 или 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% физиологический раствор. Дополнительно, такие фармацевтически приемлемые носители могут быть водными или неводными растворами, суспензиями и эмульсиями. Примерами неводных растворов являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, как, например, оливковое масло, и инъекционные органические сложные эфиры, как, например, этилолеат. Водные носители включают воду, спирто/водные растворы, эмульсии или суспензии, включая солевой раствор и буферную среду. Парентеральные среды для лекарства включают раствор хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозу с хлоридом натрия, раствор Рингера с нелетучими маслами и лактатом. Внутривенные среды включают жидкие и питательные наполнители, электролитные наполнители, как, например, те, которые основаны на растворе Рингера с декстрозой, и т.д. Также могут присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, объединяющие средства, инертные газы и т.п.

Для любого соединения терапевтически эффективная доза может быть рассчитана изначально либо при анализах клеточных культур, либо в животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки или свиньи. Животную модель можно применять для определения диапазонов концентрации и пути введения. Такую информацию затем можно применять для определения пригодных доз и путей введения у людей. Такие методики хорошо известны специалисту в данной области техники, и терапевтически эффективная доза относится к количеству активного ингредиента, которое облегчит симптомы или состояние. Терапевтическую эффективность и токсичность можно определить при помощи стандартных фармацевтических процедур в культурах клеток или с экспериментальными животными, как, например, при помощи подсчета и установления различий статистических данных ED₅₀ (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD₅₀ (доза, летальная для 50% популяции). Любые описанные выше терапевтические композиции можно применять для любого нуждающегося в терапии подобного рода субъекта, включая, без ограничения, млекопитающих, таких как собаки, коты, коровы, лошади, кролики, обезьяны и люди.

Используемые в настоящем изобретении фармацевтические композиции можно вводить посредством любого числа путей, включая, без ограничения, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедулярный, интратекальный, интравентрикулярный, трансдермальный, подкожный, интраперитонеальный, интраназальный, энтеральный, местный, подъязычный или ректальный способы.

Способы применения

Термин "лечение" в целях настоящего раскрытия относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, где преследуется цель предотвратить или замедлить (уменьшить) целевое патологическое состояние или расстройство. Нуждающиеся в лечении включают уже имеющих расстройство, а также тех, которые предрасположены к развитию расстройства, или тех, у кого расстройство необходимо предупредить.

Настоящее изобретение в одном своем аспекте предоставляет способ лечения лица, страдающего раком молочной железы, или с подозрением на него, с использованием антитела или антиген-связывающего фрагмента, который способен специфично связываться с KAAG1.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может страдать РМЖ с отрицательными экспрессией рецептора эстрагена, экспрессией рецептора прогестерона и/или экспрессией Her2 (или отсутствием избыточной экспрессии).

Также в соответствии с настоящим изобретением лицо может страдать РМЖ с низкой экспрессией

по меньшей мере одного из следующего: рецептора эстрагена, рецептора прогестерона и/или Her2.

Например, опухоль может быть негативной с точки зрения (или иметь низкую экспрессию) как экспрессии рецептора эстрагена, так и экспрессии рецептора прогестерона.

В соответствии с настоящим изобретением данное лицо может страдать РМЖ, который характеризуется как тройной негативный или базальноподобный.

В еще одном аспекте данное изобретение относится к применению выделенных антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе, в лечении или диагностике РМЖ, характеризуемого отсутствием экспрессии рецептора эстрогена, экспрессии рецептора прогестерона и/или избыточной экспрессии Her2, или низкой экспрессией по меньшей мере одного из этих трех маркеров.

В соответствии с настоящим изобретением способ может включать, например, введение нуждающемуся в этом лицу антитела или антиген-связывающего фрагмента, который способен специфично связываться с КААG1. Нуждающееся лицо предпочтительно отбирают на основании отсутствия экспрессии ER, экспрессии PgR и/или отсутствию избыточной экспрессии белка HER2. Клинические исследования этих маркеров обычно проводят, используя гистопатологические способы (иммуногистохимические, FISH и т.п.), и/или путем изучения экспрессии генов (см., например, Dent et al, 2007, Bernstein and Lacey, 2011). Нуждающимся лицом, таким образом, может быть лицо, у которого был установлен диагноз тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ.

Таким образом, настоящее изобретение в особенности относится к терапевтическому лечению лица, страдающего тройным негативным РМЖ или базальноподобным РМЖ с применением антитела к КААG1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны специфично связываться с КААG1 на поверхности клеток опухоли. Такие антитела могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в КААG1 в пределах аминокислот с 30 по 84, включительно (например, в КААG1 в пределах аминокислот с 36 по 60 (включительно) или в пределах аминокислот с 61 по 84 (включительно)).

Пригодными антителами могут быть те, которые выступают посредниками в антитело-зависимой клеточной цитотоксичности, и те, которые конъюгированы с терапевтическим фрагментом.

В соответствии с настоящим изобретением антитела могут быть, например, моноклональным антителом, химерным антителом, гуманизированным антителом или их антиген-связывающим фрагментом.

Способ настоящего изобретения может включать введение антитела или антиген-связывающегося фрагмента в комбинации с ингибитором, химиотерапевтическим или цитотоксическим средством.

Другие способы лечения, охваченные настоящим изобретением, включают введение других типов ингибиторов КААG1, таких как терапевтические средства на антисмысловой основе (миРНК, антисмысловые средства, рибозимы и т.п.).

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает способ лечения тройного негативного РМЖ или базальноподобного РМЖ путем введения ингибитора активности или экспрессии КААG1 нуждающемуся лицу.

Ингибитор может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Более конкретно ингибитор может содержать нуклеотидную последовательность, комплементарную нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1 или ее фрагменту. Например, ингибитор может содержать по меньшей мере 10 последовательных нуклеотидов (по меньшей мере 15, по меньшей мере 20), комплементарных последовательности SEQ ID NO: 1 или нуклеотидам 738-992 (включительно) последовательности SEQ ID NO: 1.

В некоторых случаях антитела к КААG1 или их фрагменты могут взаимодействовать с раковыми клетками, экспрессирующими КААG1, и вызывать иммунную реакцию, выступая посредником в АЗКЦ. В других случаях антитела и фрагменты к КААG1 могут блокировать взаимодействие КААG1 с его белковыми партнерами.

В конкретных случаях, антитела к КААG1 и их антиген-связывающие фрагменты можно вводить одновременно с другими лечебными средствами, предназначенными для такого же состояния (ингибитор, химиотерапевтические или цитотоксические средства). В связи с этим, антитела можно вводить с ингибитором PARP1, ингибитором EGFR, антимиотическими средствами (например, таксанами), средствами на основе платины (например, цисплатин), ДНК-разрушающими средствами (например, доксорубицин) и другими противораковыми терапевтическими средствами, которые известны специалистам в данной области техники. В других случаях, антитела к КААG1 и их антиген-связывающие фрагменты можно вводить с другими терапевтическими антителами. Они включают, без ограничения, антитела, которые нацелены на EGFR, CD-20 и Her2.

Настоящее изобретение относится в своем дополнительном аспекте к способу ингибирования роста клеток, экспрессирующих КААG1, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные), причем способ может включать приведение в контакт клетки с эффективным количеством антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе.

Настоящее изобретение также охватывает способ лечения рака или ингибирования роста клеток,

экспрессирующих КААG1, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные), у млекопитающих, причем способ может включать введение антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом млекопитающему.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение предлагает способ лечения, диагностические способы и способ обнаружения при помощи антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения и применение таких антител или антиген-связывающего фрагмента в производстве фармацевтической композиции или лекарственного средства для таких целей.

Способ лечения, охваченный настоящим изобретением, включает введение антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанного в данном документе, нуждающемуся в этом млекопитающему, и особенно пациенту, имеющему рак, или с подозрением на рак, характеризующийся как эстроген-негативный (ER-негативный), прогестерон-негативный (PgR-негативный) и/или при котором отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативный).

Изобретение в других аспектах также предоставляет способы для уменьшения распространения опухоли, инвазивности опухоли или вызывает лизис опухоли, которые могут включать введение выделенного антитела или антиген-связывающего фрагмента нуждающемуся в этом млекопитающему.

Изобретение, таким образом, относится к применению выделенного антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанного в данном документе, для (производстве фармацевтической композиции для) лечения рака, уменьшения распространения опухоли, инвазивности опухоли, образования опухоли или вызова лизиса опухоли, состоящей из экспрессирующих КААG1 опухолевых клеток, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или в которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные).

Антитело или антиген-связывающий фрагмент, конкретнее, можно применять при злокачественной опухоли, включая, например, злокачественную опухоль, обладающую способностью к метастазированию, и/или опухолевые клетки, которые характеризуются "безъякорным" ростом. Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения также можно применять для диагностики рака. Диагностику рака можно осуществлять *in vivo* при помощи введения антитела или антиген-связывающего фрагмента настоящего изобретения млекопитающему, которое страдает от рака, или у него подозревают наличие рака. Диагностику также можно осуществлять *ex vivo* путем приведения в контакт образца, полученного от млекопитающего, с антителом или антиген-связывающим фрагментом и выявления присутствия или отсутствия клеток (опухолевых клеток), экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

Настоящее изобретение также охватывает способ выявления рака или определения клеток, экспрессирующих КААG1, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными), и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные), у млекопитающих, причем способ может включать введение антитела или антиген-связывающего фрагмента, описанных в данном документе, нуждающемуся в этом млекопитающему.

Настоящее изобретение в другом своем аспекте относится к способу обнаружения клеток, экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1, при этом способ может включать приведение в контакт клетки с антителом или антиген-связывающим фрагментом, описанным в данном документе, и обнаружение комплекса, образованного антителом и клеткой, экспрессирующей КААG1 или вариант КААG1. Иллюстративные варианты осуществления антител или антиген-связывающих фрагментов, применяемых в способах обнаружения, являются такими, которые могут связываться с внеклеточным участком КААG1.

Другими иллюстративными вариантами осуществления антител или антиген-связывающего фрагмента, применяемого в способах обнаружения, являются те, которые связываются с КААG1 или вариантом КААG1, экспрессированным на поверхности опухолевых клеток, которые являются эстроген-негативными (ER-негативными), прогестерон-негативными (PgR-негативными) и/или у которых отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативные).

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу обнаружения КААG1 (SEQ ID NO: 2), варианта КААG1, имеющего по меньшей мере 80% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO: 2, или секретированной формы или циркулирующей формы КААG1 или варианта КААG1, при этом способ может включать приведение в контакт клетки, экспрессирующей КААG1 или вариант КААG1, или образца (биопсии, сыворотки, плазмы, мочи и т.д.)/содержащего или с подозрением на содержание КААG1 или варианта КААG1, с описанными в данном документе антителом или антиген-связывающими фрагментами, и количественного измерения связывания. Образец может быть взят у млекопитающего (например, человека), у которого может наблюдаться рак (например, раком молочной железы, который характеризуется как эстроген-негативный (ER-негативный), прогестерон-негативный (PgR-негативный) и/или у которого отсутствует избыточная экспрессия Her2 (Her2-негативный), такой как базальноподобный РМЖ или тройной негативный РМЖ) или у которого подозревают рак. Образец может представлять собой образец ткани, полученный от млекопитающего, или надосадочную жидкость клеточной культуры.

В соответствии с настоящим изобретением образец может быть образцом сыворотки, образцом плазмы, образцом крови или асцитической жидкостью, полученной от млекопитающего. Описанное в

данном документе антитело или антиген-связывающий фрагмент может преимущественно обнаруживать секретируемую или циркулирующую форму (циркулирующую в крови) КААG1.

Способ может включать количественное определение комплекса, образованного антителом или антиген-связывающим фрагментом, связанным с КААG1 или с вариантом КААG1.

Связывание антитела с антигеном будет приводить к повышению предполагаемой молекулярной массы антигена. Таким образом, при специфическом связывании антитела или антиген-связывающего фрагмента с антигеном происходит физическое изменение.

Такие изменения можно обнаружить при помощи, например, электрофореза с последующим вестерн-блоттингом и окрашиванием геля или блотта, масс-спектрометрии, ВЭЖХ в сочетании с компьютерной обработкой или др. Устройства, способные рассчитывать сдвиг молекулярной массы, известны в данной области техники и включают, например, Phosphorimager™.

Если антитело включает, например, обнаруживаемую метку, то комплекс антиген-антитело можно обнаружить по флуоресценции, излучаемой меткой, радиационному излучению метки, ферментативной активности метки со своим субстратом, или др.

Обнаружение и/или измерение связывания антитела или антиген-связывающего фрагмента с антигеном может быть осуществлено при помощи ряда способов, известных в данной области техники. Связывание антитела или антиген-связывающего фрагмента с антигеном можно отслеживать при помощи устройства, способного выявлять сигнал, излучаемый обнаруживаемой меткой (радиационное излучение, флуоресценция, изменение цвета и т.д.). Такое устройство предоставляет данные, которые указывают на произошедшее связывание, и может также предоставлять указание на количество антитела, связанного с антигеном. Устройство (обычно, соединенное с компьютером) может также быть способно рассчитывать разницу между фоновым сигналом (например, сигналом, получаемым при отсутствии связывания антиген-антитела) или фоновым шумом и сигналом, получаемым при специфическом связывании антитело-антиген. Такие устройства, таким образом, могут предоставлять пользователю показатели и выводы относительно того, был ли выявлен антиген или нет.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к наборам, которые могут включать один или несколько контейнеров, содержащих одно или несколько описанных в данном документе антител или антиген-связывающих фрагментов.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки.

Антитела обычно получают в клетках, допускающих экспрессию легкой цепи и тяжелой цепи, экспрессируемых с вектора(ов), содержащего(их) последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь.

Настоящее изобретение, таким образом, охватывает нуклеиновые кислоты, способные кодировать любые из описанных в данном документе CDRs, вариабельные участки легкой цепи, вариабельные участки тяжелой цепи, легкие цепи, тяжелые цепи.

Настоящее изобретение, таким образом, в дополнительном аспекте относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое способно специфически связываться с КААG1.

Иллюстративные варианты осуществления нуклеиновых кислот, охваченные настоящим изобретением, включают нуклеиновую кислоту, выбранную из группы, состоящей из нуклеиновой кислоты, имеющей по меньшей мере 70% идентичность последовательности (т.е. по меньшей мере 75%, по меньшей мере 80% идентичность последовательности) с любой одной из последовательностей SEQ ID NOs: 3, 5, 7, 9, 11, 13, 15, 17, 19, 21, 23, 25, 45 и 47, фрагментов (например, по меньшей мере 10, по меньшей мере 15, по меньшей мере 20 последовательных нуклеотидов) и комплементарных им последовательностей.

В соответствии с вариантом осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота может в особенности кодировать вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое может быть способно вызывать гибель (устранение, уничтожение, лизис) опухолевых клеток, экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

В соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота может в особенности кодировать вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое может быть способно снижать распространение опухолевых клеток, экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

В соответствии с другим вариантом осуществления данного изобретения нуклеиновая кислота может, в частности, кодировать вариабельный участок легкой цепи и/или вариабельный участок тяжелой цепи антитела, которое может быть способно уменьшать или затруднять образование опухолей, экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

Иллюстративные варианты осуществления нуклеиновых кислот настоящего изобретения включают нуклеиновые кислоты, кодирующие вариабельный участок легкой цепи, содержащий:

а) последовательность CDRL1, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 72 и SEQ ID NO: 73;

б) последовательность CDRL2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 74 и SEQ ID NO: 75 и SEQ ID NO: 76; или

с) последовательность CDRL3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78 и SEQ ID NO: 79.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере два CDRs из CDRL1, CDRL2 или CDRL3.

Также в соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок легкой цепи, который может содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Настоящее изобретение также относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий:

- а) последовательность CDRH1, включающей SEQ ID NO: 80;
- б) последовательность CDRH2, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 84 и SEQ ID NO: 85; или
- с) последовательность CDRH3, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 87 и SEQ ID NO: 88.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать по меньшей мере два CDRs из CDRH1, CDRH2 или CDRH3.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать вариабельный участок тяжелой цепи, который может содержать один CDRH1, один CDRH2 и один CDRH3.

Также настоящим изобретением охватываются нуклеиновые кислоты, кодирующие варианты антигена по меньшей мере с одной консервативной аминокислотной заменой.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену по меньшей мере в двух из CDRs.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере одну консервативную аминокислотную замену в 3 CDR.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере две консервативные аминокислотные замены по меньшей мере в одном из CDRs.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере две консервативные аминокислотные замены по меньшей мере в двух из CDRs.

В соответствии с настоящим изобретением нуклеиновая кислота может кодировать CDR, содержащий по меньшей мере две консервативные аминокислотные замены в трех CDRs.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок легкой цепи, имеющей по меньшей мере 70, 75, 80% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 105, SEQ ID NO: 106, SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 109, SEQ ID NO: 110, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 115, SEQ ID NO: 116, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 121, SEQ ID NO: 122, SEQ ID NO: 123, SEQ ID NO: 124 и SEQ ID NO: 125.

Другие аспекты настоящего изобретения помимо этого относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей вариабельный участок тяжелой цепи, имеющий по меньшей мере 70, 75, 80% идентичность последовательности с последовательностью, выбранной из группы, состоящей из SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 126, SEQ ID NO: 127, SEQ ID NO: 128, SEQ ID NO: 129, SEQ ID NO: 130, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 139, SEQ ID NO: 140, SEQ ID NO: 141, SEQ ID NO: 142, SEQ ID NO: 143, SEQ ID NO: 144, SEQ ID NO: 145, SEQ ID NO: 146 и SEQ ID NO: 147.

В еще другом аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему описанные в данном документе нуклеиновые кислоты.

В соответствии с настоящим изобретением вектор может представлять собой вектор экспрессии.

Вектор, который содержит элементы для управления транскрипцией и трансляцией вставленной кодирующей последовательности у конкретного хозяина, известны в данной области техники. Эти элементы могут включать регуляторные последовательности, такие как энхансеры, конститутивные и индуцибельные промоторы и 5'- и 3'-нетранслируемые участки. Для построения таких векторов экспрессии можно применять способы, которые хорошо известны специалистам в данной области техники. Эти способы включают методики рекомбинантной ДНК *in vitro*, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке, которая может содержать описанную в данном документе нуклеиновую кислоту.

Выделенная клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный участок легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный участок тяжелой цепи, либо на от-

дельных векторах, либо на одном векторе. Выделенная клетка также может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, и нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, либо на отдельных векторах, либо на одном векторе.

В соответствии с настоящим изобретением клетка может быть способна к экспрессии, сборке и/или секреции антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

В другом аспекте настоящее изобретение предоставляет клетку, которая может содержать и/или может экспрессировать описанное в данном документе антитело.

В соответствии с настоящим изобретением клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный участок легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный участок тяжелой цепи.

Клетка может быть способна к экспрессии, сборке и/или секреции антитела или его антиген-связывающего фрагмента.

Приведенные ниже примеры представлены для дополнительного описания деталей настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

Данный пример раскрывает способы, используемые для превращения Fab в полные химерные моноклональные антитела IgG1.

За исключением возможности проведения исследования взаимодействия моноклональных антител с Fab фрагментами и белка КААG1, применение Fab может быть ограничено в отношении проведения достоверных *in vitro* и *in vivo* исследований для подтверждения биологической функции антигена. Таким образом, было необходимо перенести переменные участки легкой и тяжелой цепей, содержащиеся в Fab, в полные каркасы антител для выработки химерных IgG1 мыши-человека. Векторы экспрессии как для легкой, так и для тяжелой цепи иммуноглобулина построили таким образом, чтобы i) последовательности исходного бактериального сигнального пептида перед Fab в векторах экспрессии были заменены сигнальными пептидами млекопитающих и ii) константные участки легкой и тяжелой цепей в антителах мыши были заменены константными участками человека. В способах осуществления такого переноса используют стандартные методики молекулярной биологии, которые известны специалистам в данной области техники.

Вектор экспрессии легкой цепи - существующую экспрессирующую плазмиду млекопитающих, называемую pTTVH8G (Durocher et al., 2002), предназначенную для применения в системе временной трансфекции 293E, модифицировали для размещения переменного участка легкой цепи мыши. Полученная химерная легкая цепь мыши-человека содержала переменный участок мыши, за которым следовал константный домен каппа человека. Последовательность кДНК, кодирующую константный домен каппа человека, амплифицировали с помощью ПЦР с применением праймеров OGS1773 и OGS1774 (SEQ ID NO: 55 и 56 соответственно). Нуклеотидная последовательность и соответствующая аминокислотная последовательность константного участка каппа человека показаны в SEQ ID NO: 57 и 58 соответственно. Полученный ПЦР-продукт длиной в 321 пару оснований лигировали в pTTVH8G сразу после последовательности сигнального пептида VEGF A человека (NM_003376). В ходе данного этапа клонирования также разместили уникальные сайты для рестрикционных эндонуклеаз, которые делают возможным точное размещение кДНК, кодирующих переменные участки легкой цепи мыши. Последовательность полученной в результате этого плазмиды экспрессии, называемой pTTVK1, показана в SEQ ID NO: 59. Основываясь на последовательностях, раскрытых в табл. 2, были разработаны праймеры ПЦР, специфичные для переменного участка легкой цепи антител 3D3, 3G10, 3C4 и 3A4 (SEQ ID NOS: 15, 19, 23 и 47 соответственно), которые включали на своем 5'-конце последовательность, идентичную последним 20 парам оснований сигнального пептида VEGF A. Последовательности этих праймеров показаны в SEQ ID NOS: 60, 61, 62 и 213. Один и тот же обратный праймер использовали для амплификации всех трех переменных участков легких цепей 3D3, 3G10 и 3C4, поскольку с самого края 3'-концы были идентичными. Праймер (SEQ ID NO: 63) включал на своем 3'-конце последовательность, идентичную первым 20 парам оснований константного домена каппа человека. Праймер SEQ ID NO: 214 использовали для амплификации переменного участка легкой цепи 3A4. Как на ПЦР-фрагменты, так и на расщепленную pTTVK1 воздействовали 3'-5' экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы T4, что в результате дало комплементарные концы, которые соединили путем гибридизации. Полученные в результате реакции гибридизации продукты трансформировали в компетентные *E. coli*, и экспрессирующие плазмиды проверили путем секвенирования для того, чтобы убедиться, что переменные участки легкой цепи мыши правильно вставлены в вектор экспрессии pTTVK1. Специалисты в данной области техники легко поймут, что способ, используемый для конструирования плазмиды экспрессии легкой цепи, применим к антителам к КААG1, содержащимся в исходной библиотеке Fab.

Вектор экспрессии тяжелой цепи - вектор экспрессии, который давал тяжелую цепь иммуноглобулина 3A4, конструировали аналогичным образом, как и описанную выше pTTVK1, для получения легких цепей иммуноглобулинов. Плазмиду pYD11 (Durocher et al., 2002), которая содержит последовательность сигнального пептида IgGK человека, а также участки CH2 и CH3 Fc-домена человека IgG1, модифициро-

вали путем лигирования последовательности кДНК, кодирующей константный участок CH1 человека. Праймеры ПЦР OGS1769 и OGS1770 (SEQ ID NOS: 64 и 65), сконструированные так, чтобы содержать уникальные сайты эндонуклеаз рестрикции, использовали для амплификации участка IgG1 CH1 человека, содержащего нуклеотидную последовательность и соответствующую аминокислотную последовательность, которые показаны в SEQ ID NO: 66 и 67. После лигирования фрагмента из 309 пар оснований CH1 человека непосредственно после сигнальной последовательности пептида IgGK модифицированную плазмиду (SEQ ID NO: 68) назвали pYD15. Если выбранный переменный участок тяжелой цепи лигирован в вектор, то полученная плазида кодирует полную тяжелую цепь иммуноглобулина IgG1 с константными участками человека. Основываясь на последовательностях, раскрытых в табл. 2, были разработаны праймеры ПЦР, специфичные для переменного участка тяжелой цепи антител 3D3, 3G10, 3C4 и 3A4 (SEQ ID NOS: 17, 21, 25 и 45 соответственно), которые включали на своем 5'-конце последовательность, идентичную последним 20 парам оснований сигнального пептида IgGK. Последовательности этих праймеров показаны в SEQ ID NOS: 69 (3D3 и 3G10 имеют одинаковую последовательность 5'-конца), SEQ ID NO: 70 или SEQ ID NO: 215 для 3A4. Один и тот же обратный праймер использовали для амплификации всей трех переменных участков тяжелых цепей 3D3, 3C4 и 3G10, поскольку с самого края 3'-концы были идентичными. Праймер (SEQ ID NO: 71) включал на своем 3'-конце последовательность, идентичную первым 20 парам оснований константного домена CH1 человека. Для переменного участка тяжелой цепи 3A4 использовали SEQ ID NO: 216. Как на ПЦР-фрагменты, так и на расщепленную pYD15, воздействовали 3'-5' экзонуклеазной активностью ДНК-полимеразы T4, что в результате дало комплементарные концы, которые соединяли путем гибридизации. Полученные в результате реакции гибридизации продукты трансформировали в компетентные *E. coli*, и экспрессирующие плазмиды проверили путем секвенирования для того, чтобы убедиться, что переменные участки тяжелой цепи мыши правильно вставлены в вектор экспрессии pYD15. Специалисты в данной области техники легко поймут, что способ, используемый для конструирования плазмиды экспрессии тяжелой цепи, применим к антителам к КААG1, содержащимся в исходной библиотеке Fab.

Экспрессия химерного IgG1 человека в клетках 293E.

Полученные, как описано выше, векторы экспрессии, которые кодировали легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, экспрессировали в клетках 293E с помощью системы для временной трансфекции (Durocher et al., 2002). Можно использовать другие способы временной или стабильной экспрессии. Соотношение легкой к тяжелой цепи оптимизировали с тем, чтобы достигнуть наибольшего выхода антитела в среде для тканевой культуры и, как оказалось, оно составило 9:1 (L:H). Способность антител (моноклональных, химерных или гуманизированных) к КААG1 связываться с рекомбинантной Fc-КААG1 измеряли с помощью ELISA и сравнивали с исходными Fabs мыши.

Схема, использованная для превращения других Fabs в полный IgG (включая 3A4) и для экспрессии антител, описана более детально в международной публикации № PCT/CA2012/000296, полное содержание которой включено в данный документ посредством ссылки.

Пример 2. Гуманизация мышиного моноклонального антитела 3A4.

Международные патенты №№ PCT/CA2009/001586, PCT/CA2010/001795 и PCT/CA2012/000296 описывают иллюстративную методологию, применяемую для создания гуманизированных переменных участков легкой цепи и тяжелой цепи.

Гуманизация переменного участка легкой цепи антитела 3A4 включала 11 мутаций в его предложенном гуманизированном каркасе для 100% гуманизации каркаса. Гуманизация переменного участка тяжелой цепи антитела 3A4 включала 23 мутаций в его предложенном гуманизированном каркасе для 100% гуманизации каркаса. Эти на 100% гуманизированные последовательности переменного участка обозначены Lvh1 и Hvh1 соответственно (SEQ ID NO: 189 и 194). Также были сконструированы дополнительные гуманизированные последовательности, в которых несколько остатков из мышиных последовательностей 3A4 сохранили исходя из тщательного структурного и сравнительного анализов последовательностей, которые показали высокую вероятность изменения антиген-связывающей аффинности в случае введения мутаций в эти положения. Эти последовательности переменных участков обозначены Lvh2, Hvh2, Hvh3 и Hvh4 (SEQ ID NO: 190, 195, 196 и 197).

Два варианта гуманизированных легких цепей (включающие константный участок) в данном документе определены как Lh1 (SEQ ID NO: 199) и Lh2 (SEQ ID NO: 200). Четыре варианта гуманизированных тяжелых цепей (включающие константный участок) в данном документе определены как Hh1 (SEQ ID NO: 202), Hh2 (SEQ ID NO: 203), Hh3 (SEQ ID NO: 204) и Hh4 (SEQ ID NO: 205). Две гуманизированные легкие цепи и 4 гуманизированные тяжелые цепи можно собрать в 8 гуманизированных антител (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3 и Lh2Hh4).

В случае гуманизированной последовательности Lvh2 (SEQ ID NO: 190) легкой цепи 3A4 сохранялись каркасные остатки Val-L2 и Lys-L45 из мышиной последовательности, поскольку остаток L2 наполовину погружен, контактирует как с CDR-L1, так и с CDR-L3, и имеет предрасположенность к контакту с антигеном, в то время как остаток L45 взаимодействует с тяжелой цепью. Отмечали, что оба этих мышиных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Hvh2 (SEQ ID NO: 195) тяжелой цепи 3A4 сохранялись каркасные остатки Ile-H2 и Lys-L73 из

мышинной последовательности, поскольку остаток H2 наполовину погружен, контактирует как с CDR-H1, так и с CDR-H3 и имеет предрасположенность к контакту с антигеном, в то время как остаток H73 принадлежит к верньерной зоне, поддерживающей CDR-H2, и оба этих мышинных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Hvh3 (SEQ ID NO: 196) тяжелой цепи 3A4 сохранялись возвратные мутации Ile-H2 и Lys-L73, и помимо них сохранялись каркасные остатки Ile-H48, Ala-H67, Leu-H69 и Val-H71 из мышинной последовательности, поскольку все эти дополнительные мышинные остатки являются погруженными остатками и входят в верньерную зону, поддерживающую CDR-H2, и, кроме того, мышинный остаток H71 может встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Hvh4 (SEQ ID NO: 197) тяжелой цепи 3A4 включили все 6 возвратных мутаций гуманизированного варианта Hvh3 плюс два дополнительных мышинных каркасных остатка Lys-H38 и Lys-H66, поскольку они являются наполовину погруженными остатками, близкими к CDR-H2.

Получаемые в результате аминокислотные последовательности мышинных и гуманизированных цепей приведены в табл. 1. Выравнивание переменных участков мышинных и гуманизированных легких цепей показано на фиг. 1a, а выравнивание переменных участков мышинных и гуманизированных тяжелых цепей показано на фиг. 1b.

На фиг. 2a и 2b представлено выравнивание переменного участка мышинной легкой цепи с переменным участком на 100% гуманизированной легкой цепи и переменного участка мышинной тяжелой цепи с переменным участком на 100% гуманизированной тяжелой цепи соответственно. Этот чертеж иллюстрирует аминокислоты, которые являются консервативными, и аминокислоты, которые были выбраны для замены.

Пример 3. Сборка и экспрессия гуманизированных вариантных антител 3A4.

Цель данных исследований заключается в определении кинетических параметров антител к кластерину. В частности, для определения того, влияет ли гуманизация моноклонального антитела 3A4 к КААГ1 на кинетические параметры его связывания с КААГ1 человека. С этой целью разработали способ кинетического анализа с помощью прибора ProteOn XPR3 6 от BioRad. КААГ1 человека иммобилизовали на сенсорном чипе. Вводили полноразмерные антитела или Fab-фрагменты и позволяли им взаимодействовать с иммобилизованным КААГ1.

Построение плазмиды, кодирующей химерные (мышинные) тяжелую и легкую цепи 3A4.

Тяжелую и легкую цепи химерного антитела амплифицировали с помощью ПЦР с исходными цепями иммуноглобулина мыши с применением следующих олигонуклеотидных праймерных пар: тяжелая цепь, 5'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 206, и 3'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 207; легкая цепь, 5'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 208, и 3'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 209. Полученные ПЦР-продукты расщепляли с помощью Hind III и клонировали в pK-CR5 (SEQ ID NO: 210), предварительно расщепленную с помощью Hind III.

Построение плазмид, кодирующих варианты 1-4 гуманизированной тяжелой цепи 3A4.

Фрагменты, кодирующие гуманизированный участок тяжелой цепи антитела 3A4 (Hh1, Hh2, Hh3 и Hh4), заказали у GenScript (Пискавэй, США). ДНК-фрагменты, включающие последовательности "козак" и стоп-кодонов, расщепили с помощью HindIII и клонировали в сайт HindIII плазмиды pK-CR5, предварительно дефосфорилированной при помощи фосфатазы из кишечника коровы (NEB) для предупреждения рециркуляризации. На фиг. 3a изображена карта плазмиды pK-CR5-3A4-HC-variant1. Все варианты тяжелой цепи гуманизированного 3A4 построили аналогичным образом.

Построение плазмид, кодирующих варианты 1 и 2 гуманизированной легкой цепи 3A4.

Фрагменты, кодирующие участки легкой цепи человека антитела 3A4 (Lh1 и Lh2), заказали у GenScript. ДНК-фрагменты, включающие последовательности "козак" и стоп-кодонов, расщепили с помощью BamHI и клонировали в сайт BamHI плазмиды rMPG-CR5 (SEQ ID NO: 211), предварительно дефосфорилированной при помощи фосфатазы из кишечника коровы (NEB) для предупреждения рециркуляризации. На фиг. 3b изображена карта плазмиды rMPG-CR5-3A4-LC-variant1. Все варианты легкой цепи гуманизированного 3A4 построили аналогичным образом.

Исследование временной трансфекции.

Плазмидную ДНК выделили из небольших культур *E. coli* с применением набора Mini-Prep (Qiagen Inc, Миссиссога, Онтарио) согласно рекомендациям производителя. Вкратце, 2 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, засеяли одной колонией, отобранной после лигирования и трансформации. Культуры инкубировали при 37°C в течение ночи с интенсивным помешиванием (250 об/мин). Затем плазмиду выделили из 1,5 мл культуры, используя инструкции, буферы и колонки, поставляемые в наборе. ДНК элюировали с помощью 50 мкл стерильной воды. Плазмидную ДНК выделили из большой культуры *E. coli* с применением набора Plasmid Plus Maxi (Qiagen Inc, Миссиссога, Онтарио) согласно рекомендациям производителя. 200 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, засеяли одной свежей колонией *E. coli* и инкубировали в течение ночи при 37°C с интенсивным помешиванием (250 об/мин). Бактерии (130 мл культуры для тяжелой цепи и 180 мл культуры для легкой цепи) осаждали центрифугированием при 6000×g в течение 15 мин при 4°C и выделяли плазмиду, используя инструкции, буферы и колонки, поставляемые в наборе. Чистые плазмиды повторно суспендировали в стерильном 50

мМ Tris, pH 8 и проводили количественную оценку по измерениям оптической плотности при 260 нм. Перед трансфекцией очищенную плазмиду простерилизовали экстракцией с фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом. Плазмиды повторно суспендировали в стерильном 50 мМ Tris, pH 8, и проводили количественную оценку по оптической плотности при 260 нм.

Перед трансфекцией клетки (CHO-сТА) промывали, используя PBS, и повторно суспендировали при концентрации $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в среде для роста (CD-CHO, Invitrogen) без сульфата декстрана в течение 3 ч в суспензионной культуре. Для каждой комбинации плазмид 45 мл клеток трансфицировали путем медленного добавления 5 мл среды CDCHO, дополненной 10 мкг/мл каждой плазмиды и 50 мкг/мл полиэтиленимина (PEI Max; Polysciences). Конечная концентрация составила 1 мкг/мл каждой плазмиды и 5 мкг/мл PEI. Через 2 ч клетки переносили при 30°C. В последующие дни к клеткам добавляли 50 мкг/мл сульфата декстрана и 3,75 мл каждой добавки (Efficient Feed A и B, Invitrogen) и инкубировали их при 30°C в течение 13 дней. 2,5 мл Feed A и 2,5 мл Feed B добавили на 4, 6, 8 и 11 дни. На 13-й день надосадочную жидкость очищали путем центрифугирования и фильтровали через 0,22-мкм фильтр.

Клетки CHO (CHOсТА) трансфицировали плазмидами, кодирующими различные варианты гуманизированных тяжелых и легких цепей антитела 3A4, под управлением промотора CR5. Трансфекцию осуществляли различными комбинациями легкой и тяжелой цепей. В качестве контроля клетки также трансфицировали плазмидами, кодирующими химерное/мышинное антитело.

Очистка антитела.

15 мл надосадочной жидкости из образцов трансфицированных клеток CHO концентрировали центрифугированием с применением кассеты Amicon Ultra (Ultracell-50k) при 1500 об/мин. Сконцентрированное антитело (550 мкл) очищали, используя набор Nab spin kit Protein A Plus (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя. Очищенные антитела затем обессолили, используя PBS и кассеты для концентрирования Amicon Ultra (Ultracel-10K) при 2500 об/мин до конечного объема 250 мкл. Очищенное антитело количественно оценили путем считывания OD₂₈₀ с помощью спектрофотометра Nanodrop и хранили замороженным при -20°C. Аликвоту очищенного антитела повторно суспендировали в равном объеме Laemmli 2X, нагревали при 95°C в течение 5 мин и охлаждали на льду. Стандартную кривую строили с помощью известного количества очищенной каппа IgG1 человека из плазмы с миеломой человека (Athens Research). Образцы разделяли на полиакриламидном геле Novex с 10% Tris-глицин (Invitrogen Canada Inc., Берлингтон, Онтарио) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-N (Amersham Bioscience Corp., Бэ-д'Юрфе, Квебек) на 1 ч при силе тока 275 мА. Мембрану блокировали в течение 1 ч в 0,15% Tween 20, 5% обезжиренного молока в PBS и инкубировали в течение 1 ч с антителом козы к IgG человека (H+L), конъюгированным с Cy5 (Jackson, Кат. № 109-176-099). Проявляли сигнал и определяли количество путем сканирования при помощи сканера Typhoon Trio+ (GE Healthcare). Как показано на фиг. 4, все комбинации вариантов гуманизированного антитела 3A4 экспрессировались в клетках CHO.

Пример 4. Кинетический анализ мышинного и гуманизированного антитела 3A4.

Приобретенные материалы.

GLM сенсорные чипы, набор для связывания аминоконца Biorad ProteOn (EDC, sNHS и этаноламин) и буферы с 10 мМ ацетатом натрия приобрели у Bio-Rad Laboratories (Миссиссога, Онтарио). Буфер HEPES, EDTA и NaCl приобретены у Sigma-Aldrich (Оаквилль, Онтарио). 10-процентный раствор Tween 20 приобретен у Teknova (Холлистер, Калифорния). Антитело козы, специфическое к Fc-фрагменту IgG человека, приобретено у Jackson ImmunoResearch. Колонку для гель-фильтрации Superdex 75 10/300 GL приобретена у GE Healthcare.

Гель-фильтрация.

Белок КАAG1 в концентрации 3,114 мг/мл и объемом 220 мкл ввели в колонку Superdex G75. Разделение проводили при 0,4 мл/мин в подвижном буфере HBST (см. ниже) без Tween 20. Объем собранной фракции составил 500 мкл. Концентрацию КАAG1 в каждой фракции определяли по ОП₂₈₀ с помощью коэффициента удлинения 5500 и МВ, равного 8969. На фиг. 5 представлен профиль гель-фильтрации КАAG1. Небольшой пик возможного агрегата представляет собой элюат на уровне около 11 мл. Элюат белка на уровне 13 мл использовали в качестве анализируемого вещества для анализа ППР (фракции 15-19).

Биосенсорные анализы ППР.

Все анализы с применением поверхностного плазмонного резонанса осуществляли с помощью прибора BioRad ProteOn XPR36 (Bio-Rad Laboratories Ltd. (Миссиссога, Онтарио) с подвижным буфером HBST (10 мМ HEPES, 150 мМ NaCl, 3,4 мМ EDTA и 0,05% Tween 20, pH 7,4) при температуре 25°C. Поверхность для захвата мышинного Fc-участка создали при помощи сенсорного чипа GLM, активированного посредством 1:5 разведения стандартных растворов BioRad sNHS/EDC, вводимых в течение 300 с при 30 мкл/мин в направлении подачи анализируемого вещества (горизонтальное). Сразу после активации, в направлении подачи анализируемого вещества вводили 13 мкг/мл раствор антитела, специфичного к Fc-фрагменту IgG человека в 10 мМ NaOAc, pH 4,5, со скоростью потока 25 мкл/мин до тех пор, пока не иммобилизовалось примерно 8000 резонансных единиц (RU). Оставшиеся активные группы заблокировали посредством 300 с введения 1 М этаноламина со скоростью 30 мкл/мин в направлении подачи

анализируемого вещества, и это также обеспечивает создание ложно активированных промежуточных сигналов для холостых проб. Скрининг вариантов 3A4 на связывание с КААG1 проходил в два этапа, не прямой захват вариантов 3A4 из клеточного супернатанта на поверхность, специфическую к Fc-фрагменту IgG человека, в направлении подачи лиганда (вертикальное) с последующим введением КААG1 в направлении подачи анализируемого вещества. Сначала, для стабилизации фонового уровня использовали одно введение буфера в течение 30 с со скоростью 100 мкл/мин в направлении подачи лиганда. Для каждого захвата 3A4 неочищенные варианты 3A4 в среде для культивирования клеток разбавляли до 4% в HBST или использовали примерно 1,25 мкг/мл очищенного 3A4 в HBST. Четыре-пять вариантов 3A4 вместе с 3A4 дикого типа одновременно ввели в отдельные каналы для лигандов за 240 с при потоке 25 мкл/мин. Это привело к насыщающему захвату 3A4 примерно 400-700 RU на поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека. Первый канал для лиганда, при необходимости, оставляли пустым в качестве холостого контроля. Сразу после этапа захвата 3A4 дважды вводили буфер в направлении подачи анализируемого вещества для стабилизации фонового уровня, а затем ввели очищенный при помощи гель-фильтрации КААG1. Для типичного скрининга в отдельные каналы для анализируемого вещества одновременно вводили пять концентраций КААG1 (8, 2,66, 0,89, 0,29 и 0,098 нМ) и буферный контроль со скоростью 50 мкл/мин в течение 120 с с фазой диссоциации, равной 600 с, что дало набор сенсограмм связывания с буферным эталоном для каждого из захваченных вариантов 3A4. Комплексы поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека, и 3A4 восстанавливали в импульсном режиме, продолжительностью 18 с, подачей 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при 100 мкл/мин для подготовки поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека, для следующего цикла впрыска. Сенсограммы выравнивали и сопоставляли с двумя эталонами с помощью введения буферной холостой пробы и промежуточных сигналов, и полученные сенсограммы проанализировали с помощью программного обеспечения ProteOn Manager, версии 3.0. Кинетические значения и значения аффинности определяли путем приближения упомянутых сенсограмм к модели связывания Langmuir 1:1 с применением локального R_{max} , а константы аффинности (K_D , М) вывели из получаемых констант скорости (k_d с⁻¹/ k_a М⁻¹с⁻¹).

Определение констант скорости и аффинности.

На фиг. 6 подытожены константы скорости ассоциации (k_a , 1/М.с) и диссоциации (k_d , 1/с), а также константы аффинности (K_D , М) для взаимодействия КААG1 с очищенным мышинным 3A4, мышинным 3A4, которое временно экспрессировалось в качестве химерного, и временно экспрессируемыми гуманизированными вариантами. Эти константы графически представлены на фиг. 7а-с. Константы скорости ассоциации очень сходны с чистыми исходными, химерными и гуманизированными вариантами 3A4 (фиг. 7а). Константы скорости диссоциации сходны с временно экспрессируемыми химерами при сравнении с исходными 3A4, что указывает на то, что процедура трансфекции не изменила параметры взаимодействия КААG1 с антителом (фиг. 7б). Тем не менее, все гуманизированные варианты похоже имели слегка измененную скорость диссоциации, т.е. более высокую скорость диссоциации (фиг. 7б). Это отражено в константах аффинности (фиг. 7с). Таким образом, существует линейная корреляция между аффинностью связывания ($\log K_D$) гуманизированного варианта и количеством возвратных мутаций, осуществленных в исходном антителе (LcHc), с понижением аффинности связывания по мере увеличения количества мутаций. Однако разница в аффинности связывания отличается лишь в 4 раза между наихудшим вариантом (H1L1, 0,47 нМ), у которого не было сохраненных мышинных остатков, и наилучшим вариантом, у которого было 10 сохраненных мышинных остатков (H4L2, 0,1 нМ). Наконец, было обнаружено, что аффинность связывания у всех вариантов с КААG1 является субнаномолярной, а наилучший вариант (H4L2, 0,1 нМ) демонстрировал аффинность приблизительно в 6 раз слабее, чем мышинное антитело (LcHc, 0,057 нМ). В целом, данные результаты указывают на то, что гуманизация была успешной, поскольку все варианты проявляли высокую аффинность к КААG1.

Пример 5. Связывание гуманизированных вариантов 3A4 с КААG1 в ELISA.

Также применяли способы ELISA для сравнения связывающей активности гуманизированных вариантов 3A4 с мышинным антителом 3A4. Рекомбинантный КААG1 человека для нанесения покрытия вносили в 96-луночные планшеты на ночь, промывали и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре (КТ) с повышающимися количествами мышинных или гуманизированных вариантов 3A4. После другого цикла этапов промывки в лунки добавили антитело к антителу человека, конъюгированному с HRP, и калориметрически измерили связанное антитело 3A4 при Abs_{450} . Как показано на фиг. 8а, гуманизированные варианты (Lh1Nh1, Lh1Nh2, Lh1Nh3 и Lh1Nh4) проявляли очень сходное связывание с КААG1 при сравнении с мышинным 3A4 (LcHc), у которого наблюдалась более высокая аффинность, равная 0,016 нМ. Этот результат указывал на то, что все четыре варианта гуманизированной тяжелой цепи были сопоставимы с исходной тяжелой цепью h3A4 при сборке с вариантом L1 гуманизированной легкой цепи. На фиг. 8а показаны результаты, полученные при сборке вариантов тяжелой цепи с вариантом Lh2 гуманизированной легкой цепи 3A4. В этом случае существует различие в связывании вариантов. Например, Lh2hh4 был вариантом с наиболее близким профилем к профилю мышинного 3A4. Это согласовывалось с данными ППР, из которых видно, что вариант 4 тяжелой цепи характеризовался наивысшей аффинностью к КААG1. Взятые вместе, эти данные по связыванию демонстрируют то, что все гуманизированные варианты в данном анализе взаимодействуют с КААG1 человека. Несмотря на нали-

чие незначительных различий, связывание в ELISA согласовывалось с результатами ППР.

Пример 6. Связывание гуманизированных вариантов 3A4 на поверхности раковых клеток.

Проточную цитометрию применяли для оценки способности гуманизированных вариантов 3A4 взаимодействовать с КААG1, экспрессируемым на поверхности раковых клеток. Для этого клетки карциномы яичника SKOV-3, которые, как было показано ранее, эффективно связывались 3A4 с помощью проточной цитометрии, инкубировали с восемью гуманизированными вариантами и исходным мышинным антителом. Вкратце, клетки SKOV-3 отделяли от планшета при помощи EDTA и инкубировали на льду с либо 3,0, 0,3 мг/мл, либо 0,3 мг/мл антител в течение 1 ч. После трех этапов промывания клетки инкубировали с вторичным антителом, антителом к IgG человека, конъюгированным с FITC, в течение 1 ч на льду. Флюоресценцию на клеточной поверхности измеряли в проточном цитометре, и значения показаны в гистограмме на фиг. 9. Как показано, все варианты могли обнаруживать КААG1 на поверхности непремеабиллизированных клеток, наиболее сильные сигналы получали при наиболее высокой концентрации антител 3A4 (3 мг/мл), и они понижались по мере понижения концентрации антитела. Среди различных вариантов, варианты с наибольшим количеством обратных мутаций мышиной цепи (фиг. 9, см. Lh1Nh4 и Lh2Nh4) взаимодействовали с КААG1 на поверхности клеток с наивысшей активностью. Фактически, Lh1Nh4 и Lh2Nh4, по-видимому, демонстрировали слегка улучшенное связывание на клеточной поверхности с КААG1 по сравнению с мышинным антителом 3A4 (LcHc).

Пример 7. Этот пример описывает применение антител к КААG1 для обнаружения экспрессии КААG1 при ТНРМЖ.

В качестве средства определения возможного присутствия антигена КААG1 в образцах ТНРМЖ проводили иммуногистохимический анализ. Были получены микрочипы тканей, содержащие 139 образцов биопсии РМЖ, взятых у пациентов. Залитые парафином образцы опухолей молочной железы, имеющих эпителиальное происхождение, размещали на покровных стеклах и фиксировали в течение 15 мин при 50°C. Депарафинизацию проводили путем обработки 2х ксилолом с последующим дегидратацией в последовательных промывках по 5 мин в 100, 80 и 70% этаноле. Слайды промывали 3х в PBS в течение 5 мин и обрабатывали раствором для извлечения антигена (1 mM EDTA, pH 8,0), чтобы размаскировать антиген. Эндогенные частицы, реагирующие с пероксидом, удаляли инкубацией стекол с H₂O₂ в метаноле и блокирование выполняли инкубацией стекол с бессывороточным блокирующим раствором (Santa Cruz Biotech) в течение 5 мин при комнатной температуре.

Первичное антитело.

(3A4 к КААG1) добавляли в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционноспособный по отношению к КААG1 антиген обнаруживали путем инкубации с биотин-конъюгированным мышинным анти-каппа, а затем - с стрептавидин-HRP третичным антителом. Позитивное окрашивание было выявлено путем обработки стекол субстратом ДАБ-перекись водорода в течение менее 5 мин, а затем контрастировали гематоксилином. Белок КААG1, как оказалось, экспрессировался на очень высоком уровне в абсолютном большинстве образцов опухолей молочной железы. Характерные чипы, содержащие образцы 139 опухолей, приведены на фиг. 10. В частности, 15/20 образцов биопсии с подтвержденным ТНРМЖ (фиг. 10, образцы указаны звездочкой) имели сильное окрашивание антителом 3A4 благодаря экспрессии КААG1. Вместе взятые эти иммуногистохимические исследования иллюстрируют применимость обнаружения КААG1 в РМЖ, в частности ТНРМЖ, с помощью моноклональных антител.

Пример 8.

Этот пример описывает применение антител к КААG1 для обнаружения экспрессии КААG1 в клеточных линиях ТНРМЖ.

Объединенные результаты анализа биоинформатики первичной структуры кДНК, кодирующей КААG1, биохимических исследования и иммуногистохимического определения белка в эпителиальных клетках указывают на то, что антиген КААG1 находился на клеточной поверхности. Однако требовалось более прямое свидетельство, чтобы продемонстрировать, что КААG1 действительно экспрессируется на поверхности клеток ТНРМЖ. Для проведения анализа клеточные линии РМЖ получали из коммерческих источников (ATCC, Manassas, VA) и использовали в экспериментах с проточной цитометрией. Анализ экспрессии RT-PCR с использованием специфических праймеров mRNA КААG1 ранее показали, что определенные клетки РМЖ экспрессировали mRNA КААG1 (см. PCT/CA2007/001134). Поэтому некоторые из этих клеточных линий были выбраны для определения наличия антигена КААG1 на их поверхности. Для подтверждения этого исследовали тройные негативные клеточные линии MDA-MB-231, MDA-MB-436, MDA-MB-468, BT-20 и BT-549 на предмет поверхностной экспрессии КААG1, используя антитело 3A4 к КААG1. Кроме того, клеточные линии РМЖ, которые не являются тройными негативными, а именно, T47D и MCF-7, также были включены в анализ. И наконец, в качестве отрицательного контроля в эксперимент по проточной цитометрии включили контрольную клеточную линию 293-6E, которая демонстрирует неопределяемый уровень экспрессии антигена КААG1. Для целей анализа методом проточной цитометрии (FCM) клетки собирали, используя 5 mM EDTA, подсчитывали с помощью гемоцитометра и повторно суспендировали в FCM-буфере (0,5% BSA, 10 мкг/мл козьей сыворотки в 1× PBS) с плотностью клеток 2×10⁶ клеток/мл. Химерные антитела 3A4 к КААG1 или контрольные IgG до-

бавляли к 100 мкл клеток до конечной концентрации, равной 0,5 мкг/мл, и инкубировали на льду в течение 1 ч. Клетки промывали в холодном FCM-буфере для удаления несвязавшихся антител, ресуспендировали в 100 мкл FCM-буфера, содержащего антитело к IgG человека, конъюгированное с вторичным антителом FITC (разведение 1:200) и инкубировали на льду в течение 45 мин. После еще одного этапа промывания в холодном FCM-буфере клетки повторно суспендировали в 300 мкл FCM-буфера и анализировали с помощью проточного цитометра. К каждому образцу добавляли 10 мкг/мл иодида пропидия для осуществления отбора мертвых клеток. Результаты трех независимых экспериментов показаны на фиг. 11, где средняя интенсивность флуоресценции (MFI) свернутой индукции представляет собой геометрическое среднее значение сигнала при инкубации клеток с антителом 3A4 от сигнала отрицательного контрольного образца IgG человека, который был произвольно установлен равным 1. Инкубация антител с контрольными клетками 293-6ЕНЕК-293 привела к сигналам флуоресценции, сходным с сигналом, полученным при инкубации клеток в отсутствие первичного антитела. Помимо этого, не наблюдали значительного различия между сигналом, полученным с 3A4, по сравнению с контрольным образцом IgG. Кроме того, при инкубации контрольного образца IgG с клеточными линиями РМЖ сигналы были очень схожими с сигналами, полученными от контрольного образца клеток 293-6Е. В отличие от этого, регистрируемый флуоресцентный сигнал наблюдали при инкубации антитела 3A4 с клеточными линиями РМЖ. Несмотря на различное наблюдаемое количество флуоресценции, наиболее высокое число КААG1 было обнаружено на поверхности клеточных линий MDA-MB-231 и BT-20 - двух клеточных линий ТНРМЖ (см. фиг. 11, клеточные линии ТНРМЖ обозначены звездочкой). В действительности все пять клеточных линий ТНРМЖ были положительными в отношении экспрессии КААG1 в этих условиях. Клетки T47 D и MCF-7 также экспрессировали КААG1. Вместе взятый этот проточный цитометрический анализ показывает, что клеточные линии ТНРМЖ экспрессируют КААG1 на поверхности своих клеток на высоком уровне.

Пример 9. Способы применения антитела к КААG1 3A4 в качестве конъюгата антитела.

Как продемонстрировано выше, антиген КААG1 был обнаружен с помощью 3A4 на поверхности раковых клеток с использованием проточной цитометрии. Существуют несколько различных молекулярных событий, которые могут произойти при связывании антитела с его целью на поверхности клеток. Они включают i) блокирование доступа к другому антигену/рецептору клеточной поверхности или лиганду, ii) образование относительно стабильного комплекса антитело-антиген, позволяющего нацеливаться на клетки с помощью ADCC или CDC, iii) могут происходить сигнальные события, которые проиллюстрированы с помощью агонстических антител, iv) комплекс может быть интернализован или v) комплекс может быть сброшен с клеточной поверхности. Для решения данного вопроса мы изучали поведение комплекса КААG1-антитело 3A4 на поверхности клеток. Клеточную линию карциномы яичников - SKOV3 - использовали в качестве положительного контрольного образца в этом эксперименте, поскольку она была успешно применена в предыдущих экспериментах по интернализации (см. PCT/CA2009/001586). Клетки ТНРМЖ MDA-MB-231 помещали в чашки, промывали и инкубировали с 0,5 мкг/мл химерного антитела 3A4, как описано в примере 3. После промывки добавляли полную среду и клетки размещали при 37°C в течение не более 60 мин. Клетки удаляли в определенные моменты времени (см. фиг. 12), быстро охлаждали, подготавливали для проточной цитометрии, используя FITC-конъюгированные человеческие антитела IgG, а результаты выражали как процентную долю средней интенсивности флуоресценции, оставшейся на клеточной поверхности, по сравнению с сигналом в начале отсчета времени 0 мин (см. фиг. 12, сигнал от поверхности (%), оставшийся от сигнала при 0 мин). Как показано на фиг. 12, флуоресцентный сигнал быстро уменьшается при инкубации 3A4 с клетками MDA-MB-231 (фиг. 12, черные столбцы, обозначенные как MDA-MB-231 на чертеже) и предположительно достигает максимальной потери сигнала через 30-45 мин. Потерю сигнала сравнивали с потерей, наблюдаемой при инкубации 3A4 с клетками SKOV3 (фиг. 12, серые столбцы). Эти результаты показывают, что комплекс 3A4/КААG1 исчез с клеток, что указывало на то, что могла произойти интернализация комплекса. Предварительные исследования для выяснения механизма, ответственного за такое снижение флуоресценции клеточной поверхности, показали, что, судя по всему, комплекс интернализовался. Сходные результаты ожидаются для гуманизированных антител 3A4.

Сходные результаты получали в двух дополнительных клеточных линиях ТНРМЖ, а именно MDA-MB-436 (фиг. 13) и BT-20 (фиг. 14), что подтверждает интернализацию комплекса 3A4/КААG1 на поверхности множества клеточных линий ТНРМЖ. В отличие от этого, несмотря на сходные уровни MFI от связывания 3A4 на поверхности MDA-MB-436 и T47D (фиг. 11), потеря сигнала от клеточной поверхности не наблюдалась при инкубации 3A4 с клеточной линией T47D. Это открытие позволяет предположить, что интернализация комплекса 3A4/КААG1 может происходить до значительно большей степени в клетках ТНРМЖ (фиг. 15) по сравнению с клетками, которые не являются тройными негативными.

Эти результаты дополнительно подтвердили путем проведения иммунофлуоресценции на живых клетках для того, чтобы узнать можно ли наблюдать такую интернализацию с помощью микроскопии. Клетки MDA-MB-231 высевали на покровные стекла, и после того, как клетки надлежащим образом закреплись, добавили свежую среду, содержащую химерное антитело к КААG1 3A4 в количестве 10 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Клетки промывали в PBS, затем фиксировали в 4% пара-

формальдегиде (в PBS) в течение 20 мин. После промывания клетки пермеабилizировали при помощи 0,1% Triton X-100 в PBS в течение 5 мин. Блокировку осуществляли с помощью 1,5% сухого молока в PBS в течение 1 ч. Ассоциированный с лизосомами мембранный белок 1, (LAMP1, Chang et al., 2002) обнаруживали путем инкубации с антителом к LAMP1 (Santa Cruz, sc-18821, разведение 1:100) в 1,5% молоке в PBS в течение 2 ч. После промывания в PBS добавляли все вместе вторичные антитела в 1,5% молока и инкубировали в течение 1 ч. Для химерных антител к КААG1 вторичным антителом было антитело ослы к IgG (H+L) человека, конъюгированное с родамином Red-X, разведение 1:300. Для антитела к LAMP1 вторичным антителом было антитело козы к IgG (H+L) мыши, конъюгированное с DyLight488, разведение 1:300. Оба вторичных антитела получали от Jackson ImmunoResearch. Покровные стекла промывали в PBS и погружали в препятствующий обесцвечиванию реактив ProLong Gold с DAPI. Как видно на фиг. 7, спустя 4 ч инкубации при 37°C в присутствии раковых клеток MDA-MB-231 антитело 3A4 можно было обнаружить в комплексах в основном вблизи околоядерной области (стрелки, см. красное окрашивание в левой части фиг. 16), что представляет собой типичные пути эндосомально-лизосомальной интернализации. Это наблюдение дополнительно подтвердилось при визуализации лизосомального маркера LAMP1, при этом оказалось, что он тоже экспрессировался в данных областях (стрелки, см. зеленое окрашивание в средней части фиг. 16). Важно то, что объединение двух изображений привело к появлению желто-оранжевых структур, указывающих на то, что 3A4 и антитела к LAMP1 присутствовали в одних и тех же структурах (стрелки, см. желтое окрашивание в правой части фиг. 16). Совместная локализация 3A4, которое связывается с КААG1 на поверхности раковых клеток, с LAMP1 - маркером поздних эндосом/лизосом, демонстрирует, что комплекс антитело/антиген интернализовался, и что он проходит по пути, пригодному для высвобождения полезного груза, который может быть присоединен к антителу 3A4. Идентичные результаты наблюдали в другой клеточной линии THPMJ - BT-20 (см. фиг. 17).

Вместе взятые, эти исследования продемонстрировали, что антитела, специфичные к КААG1, такие как 3A4, можно применять в качестве конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Таким образом, высокий уровень специфичности к THPMJ у КААG1 в сочетании с возможностью интернализации данной цели в клетки способствует разработке применений в качестве ADC.

Пример 10.

С целью продемонстрировать эффективность антител к КААG1 в нахождении и уничтожении клеток, у которых отсутствует экспрессия белка ER, экспрессия белка PgR и/или которые демонстрируют отсутствие повышенной экспрессии белка HER2, мы произвели два конъюгата антитело-лекарство (ADCs): 3A4-ADC1 и 3A4-ADC2.

Для этого мы использовали химерное антитело 3A4 и присоединили цитотоксическое средство посредством высоко стабильного пептидного линкера, который селективно расщепляется лизосомальными ферментами после интернализации (3A4-ADC1), или конъюгировали с другим антimitотическим средством посредством нерасщепляемого линкера (3A4-ADC2). Цитотоксическое средство может становиться активным после интернализации в клетки.

Способность 3A4 ADCs к обнаружению КААG1 на поверхности клеток THPMJ определяли, используя проточную цитометрию с применением способов, описанных в данном документе. Вкратце, неконъюгированные 3A4, 3A4-ADC1, 3A4-ADC2 и контрольный образец IgG инкубировали в присутствии клеток THPMJ MDA-231, которые являются КААG1-позитивными. Результаты указывают на то, что присоединение к 3A4 любого из этих двух средств не оказывает отрицательного влияния на его связывание с клетками тройного негативного рака молочной железы, такими как MDA-231 (данные не показаны).

Получив подтверждение того, что ADC на основе 3A4 может связываться с КААG1, экспрессированным на поверхности клеток THPMJ, их цитотоксичность, направленную на эти клетки, оценивали путем анализа пролиферации клеток. Клетки MDA-231 или TOV-112D культивировали, как описано выше в предыдущих примерах. Клетки засевали с плотностью 3000 клеток/лунку в 96-луночные планшеты в 200 мкл среды в каждой лунке в течение ночи при 37°C, в 5% CO₂. На следующий день среду заменяли на свежую, содержащую антитела, в концентрации, изменяющейся от 0,122 до 500 нМ, и инкубировали при 37°C в течение 72 ч. Все условия выполняли в трех экземплярах лунок. Число выживших клеток определяли с помощью анализа клеточной пролиферации, используя CellTiter 96 Aqueous One Solution (Promega, Madison, WI), следуя инструкции от производителя. После сбора первичных данных результаты выражали в виде процентной доли выживаний по сравнению с числом клеток в лунках, обработанных с использованием PBS, которое принимали за 100%. Результаты указывают на то, что неконъюгированное 3A4 не оказывало влияние на распространение клеток MDA-231 при всех исследованных концентрациях. В отличие от этого исследованные ADCs антитела 3A4 показали значительную цитотоксичность.

Эти результаты указывают на то, что конъюгаты антитела 3A4 можно применять в качестве альтернативного лечения пациентов, страдающих тройным негативным раком молочной железы или базально-подобным раком молочной железы. Сходные результаты ожидаются для конъюгатов на основе гуманизированных антител 3A4.

Настоящее описание относится к нескольким документам, содержание которых включено в данный

документ во всей своей полноте путем ссылки.

Последовательности, на которые ссылаются в описании.

SEQ ID NO.:1

GAGGGGCATCAATCACACCGAGAAGTCACAGCCCCTCAACCACTGAGGTGTGGGGGGG
TAGGGATCTGCATTTCTTCATATCAACCCACACTATAGGGCACCTAAATGGGTGGGCGGTGG
GGGAGACCGACTCACTTGAGTTTCTTGAAGGCTTCCTGGCCTCCAGCCACGTAATTGCCCCCG
CTCTGGATCTGGTCTAGCTTCCGATTCCGGTGGCCAGTCCGCGGGGTGTAGATGTTCTTGACG
GCCCCAAAGGGTGCCTGAACGCCGCCGGTCACCTCCTTCAGGAAGACTTCGAAGCTGGACACC
TTCTTCTCATGGATGACGACGCGCGCCCGCGTAGAAGGGGTCCCCGTGCGGTACACAAGC
ACGCTCTTCACGACGGGCTGAGACAGGTGGCTGGACCTGGCGCTGCTGCCGCTCATCTTCCCC
GCTGGCCGCCCGCTCAGCTCGCTGCTTCGCGTCGGGAGGCACCTCCGCTGTCCAGCGGCCTC
ACCGCACCCAGGGCGCGGGATCGCCTCCTGAAACGAACGAGAACTGACGAATCCACAGGTGA
AAGAGAAGTAACGGCCGTGCGCCTAGGCGTCCACCCAGAGGAGACACTAGGAGCTTGCAAGAC
TCGGAGTAGACGCTCAAGTTTTTACCGTGGCGTGCACAGCCAATCAGGACCCGAGTGCAGCG
CACCACACCAGGTTACCTGCTACGGGCAGAATCAAGGTGGACAGCTTCTGAGCAGGAGCCGG
AAACGCGCGGGGCCCTCAAACAGGCACGCCCTAGTGAGGGCAGGAGAGGAGGACGCACACAC
ACACACACACAAATATGGTGAAACCAATTCTTACATCATATCTGTGCTACCCCTTTCCAA
ACAGCCTA

SEQ ID NO.:2

MDDDAAPRVEGVVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAAHLPRWPPQLAASRREAPPLSQ
RPHRTQGAGSPPETNEKLINPQVKEK

SEQ ID NO.:3

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCA
CTATGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACCTTCAAAGAAGCTTTTGGCCT
GGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCTAAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAAT
CTAGTATCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTCACTCTTACCATCAGCA
GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTGAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGT
TCGGTGTGAGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGA
GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCCAAGTCAACCATCAGGGCCTGAGCTCGC
CCGTACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:4

DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCSSQSLNSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
TRESSIPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKAVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTL

TLISKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:5

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGC
TGTCCTGCAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACTGGGTGAAGCAGACTC
CTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCTTCAATC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAC
TCAGCAGTTTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTTATTCTGATTATTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTCCCTGG
CCCCCTCCTCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCC
CGGCTGTCTTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
GCTTGGGCAACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATTCACCTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAAC
TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
GGACCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGGGAGGAGCAGTACA
ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAG
CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
AGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
GGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACCACTACAAGACCACGCCTCCCGTGTGGACTCCGACG
GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
CTCCCGGGAAA

SEQ ID NO.:6

EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNT
AFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSSASTKGPSV
FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKS
LSLSPGK

SEQ ID NO.:7

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACGCTCCCTGTCTGTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCT
CCATCTCTTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGGT

ATTTGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG
 GGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCGGAG
 TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTCTCTCACGTTG
 GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCGCCAT
 CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
 GAGAGGCCAAAGTACAGTGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
 TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAG
 CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
 TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:8

DVLMQTTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIIYKVS
 N
 RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFAGTKLELKAVAAPSVFI
 FFPSPDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLT
 LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:9

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
 TATCCTGTAAAGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACCTACATGAAGTGGGTGAAGCAGAGCC
 ATGGAAGAGCCTTGAAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCCCGCACAGCCTACATGGAGC
 TCCGCGGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATT
 ATTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTC
 CCTGCGCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
 ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA
 CCTTCCCGGTGTCTTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
 CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
 TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATCACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCAC
 CTGAACTCCTGGGGGACCGTCACTCTTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCATCATGA
 TCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCTGAGGTCA
 AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGAGGAGC
 AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
 GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCT
 CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCCCATCCCGGGATGAGC
 TGACCAAGAACCAGTCAAGCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCG
 TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT
 CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
 ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT

CCCTGTCTCCCGGAAA

SEQ ID NO.:10

EIQLQQSGPELVKPGASVKISKASGYTFTDNYMNVVKQSHGKSLEWIGDINPYGTT
 TYNQKFKGKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDWFDYWGQGLVTVSAASTKGF
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
 TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
 DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO.:11

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCA
 CTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCTAACTTTTTAACTGGTTCCAGCAGAAACCAG
 GAAATCTCCAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGT
 TCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTTGAAGATT
 TGGGAATTTATTCTGTCTACAGTATGATGAGATTCCGCTCACGTTTCGGTGTCTGGACCAAGC
 TGGAGCTGAGAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
 AATCTGGAAGTGCCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCAGAGAGGCCAAAGTAC
 AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA
 GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
 ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
 ACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:12

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGV
 PSRFSGSGSGQDYSLTISSEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELRAVAAPSVFIPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:13

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTTAC
 TCACCTGCACTGTCACTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGT
 TTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACC
 CATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAGT
 TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTAT
 TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTG
 TCTTTCCCCTGGCCCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGCCCTGGGCTGCCTGG
 TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGCGCCCTGACCAGCGGCG

TGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATCACTCACACATGCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTCCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGAAGTCTCCAACAAGCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCATCCCGGG
 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGACCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACA
 TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAA

SEQ ID NO.:14

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHN
 DYNPSLKSRISITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSAASTK
 GPSVFLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:15

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCA
 CTATGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACCTTTCAAAGAAGCTTTTGGCCT
 GGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCTAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAAT
 CTAGTATCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCA
 GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGT
 TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO.:16

DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCKSSQSLLSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
 TRESSIPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.:17

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGC
 TGTCTGCAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACACTGGGTGAAGCAGACTC

CTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAACTGGTAATACTGCCTTCAATC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAC
 TCAGCAGTTTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTTATTCTGATTATTGGG
 GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCTCA

SEQ ID NO.:18

EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKASGYIFTDYEIHVWKQTPVHGLEWIGVIDPETGNT
 AFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO.:19

GATGTTTTGATGACCCAACTCCACGCTCCCTGTCTGTCTGAGTCTTGAGATCAAGCCT
 CCATCTCTTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAAATGGT
 ATTTGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG
 GGGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCGGAG
 TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCTCTCACGTTCC
 GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO.:20

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIIKVS
 N RFGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGYYCFQGSHPVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.:21

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
 TATCCTGTAAAGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCC
 ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCCGCACAGCCTACATGGAGC
 TCCGCGGCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATT
 ATTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO.:22

EIQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTDNMNMWVKQSHGKSLEWIGDINPYGTT
 TYNQKFKGKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDWFDYWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO.:23

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCA
 CTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTTTTTAACTGGTTCCAGCAGAAACCAG
 GAAAATCTCCAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGT
 TCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTGAAGATT
 TGGGAATTTATTCTTGTCTACAGTATGATGAGATTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGC
 TGGAGCTGAGA

SEQ ID NO.:24

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQKPGKSPKTLIFRANRLVDGV

PSRFSGSGSQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELR

SEQ ID NO.:25

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTCAC
TCACCTGCACTGTCACTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGT
TTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACC
CATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAGT
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTAT
TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO.:26

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHN
DYNPSLKSRSITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSA

SEQ ID NO.:27

KSSQSLNLSNFQKNFLA

SEQ ID NO.:28

FASTRES

SEQ ID NO.:29

QQHYSTPLT

SEQ ID NO.:30

GYIFTDYEIH

SEQ ID NO.:31

VIDPETGNTA

SEQ ID NO.:32

MGYSDY

SEQ ID NO.:33

RSSQSLLSHNGNTYLE

SEQ ID NO.:34

KVSNRFS

SEQ ID NO.:35

FQGSHVPLT

SEQ ID NO.:36

GYTFTDNMYN

SEQ ID NO.:37

DINPYYGTTT

SEQ ID NO.:38

ARDDWFDY

SEQ ID NO.:39

KASQDIHNFLN
 SEQ ID NO.:40
 RANRLVD
 SEQ ID NO.:41
 LQYDEIPLT
 SEQ ID NO.:42
 GFSITSGYGWH
 SEQ ID NO.:43
 YINYDGHND
 SEQ ID NO.:44
 ASSYDGLFAY
 SEQ ID NO:45 - нуклеотидная последовательность
 переменного участка тяжелой цепи 3A4
 CAGATCCAGTTGGTGCAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
 TGTCTGTAAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCC
 ATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAACTACAACC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGC
 TCAACAGCCTGACATCGGAAGACTCAGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGCTATGG
 ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
 SEQ ID NO:46 - полипептидная последовательность
 переменного участка тяжелой цепи 3A4
 QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS
 SEQ ID NO:47 - нуклеотидная последовательность
 переменного участка легкой цепи 3A4
 GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCT
 CCATCTCTTGAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACATAGTAATGGAACACCTATTTAGAATGGT
 ACCTTCAGAAACAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTTCCAACCGATTTTCTG
 GGGTCCCAGACAGATTAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAG
 TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTCG
 GTGCTGGGACCAGGCTGGAGCTGAAA
 SEQ ID NO:48 - полипептидная последовательность
 переменного участка легкой цепи 3A4
 DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSN
 RFGSGVPDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK
 SEQ ID NO:49 - полипептидная последовательность CDR1

тяжелой цепи 3A4

GYTFTDDYMS

SEQ ID NO:50 - полипептидная последовательность CDR2

тяжелой цепи 3A4

DINPYNGDTNYNQKFKG

SEQ ID NO:51 - полипептидная последовательность CDR3

тяжелой цепи 3A4

DPGAMDY

SEQ ID NO:52 - полипептидная последовательность CDR1

легкой цепи 3A4

RSSQSLHSNGNTYLE

SEQ ID NO:53 - полипептидная последовательность CDR2

легкой цепи 3A4

TVSNRFS

SEQ ID NO:54 - полипептидная последовательность CDR3

легкой цепи 3A4

FQGS HVPLT

SEQ ID NO.:55

GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC

SEQ ID NO.:56

GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCTGTTGAAGC

SEQ ID NO.:57

GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG

GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA

AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG

ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG

TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG

GAGAGTGTTAG

SEQ ID NO.:58

AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

DSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:59

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGG

TGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTGAGTTTCAAAAACGA

GGAGGATTTGATATTCACCTGGCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTT

TGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCA

TGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCA
AGTGGTCCCAGGCTTGAGACGGAGCTTACAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAACGCTCTGTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
CGCCCCGTACAAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTAGGGTACCGCGGCCGCTTCGAATGAGA
TCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTGGAA
TTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTGGTCGAGATCCCTCG
GAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGCCGACGAACAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCT
TCTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGGGCCCTG
TTCCACATGTGACACGGGGGGGACCAAACACAAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACATCCT
TATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGT
CTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTAACCTCTGGCTGAAGCTCTTACACCAATG
CTGGGGGACATGTACCTCCCAGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCATCA
GAGGGGCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATAA
GGCCCCCTTGTTAACCCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGTAGTAGTATATACTATCCAG
ACTAACCCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTA
GTAAAGGGTCCCTAAGGAACAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACA
TGGGGTCAGGATTCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCA
AGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAA
TAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAG
GTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGGGGGTTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAA
TATAACCCCTACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATC
TTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGA
ATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGT
CCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGA
GAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGG
GCTCCACGCCAATGGGGCCATAAACAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTGAAATTGTGGGA
GTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGTGTGA
ATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCCTGCGGTCAAACCACTTGCCACAAAACCACT
AATGGCACCCCGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCT
GCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCTCT
CATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATACTACCC
AAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTA
TATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATAT

CTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTG
 GGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGT
 AGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATAT
 GCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCT
 ATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATC
 CTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTA
 ATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCACG
 ATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCAT
 TTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA
 ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
 GACAATAACCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTC AACATT
 TCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTCCTTCTGTTTTTGTCTACCCAGAAA
 CGCTGGTGAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGG
 ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGACGTTTTTCCAATGATGAGCA
 CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGTATTATCCCGTGTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCG
 GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC
 TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
 CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACA
 TGGGGGATCATGTAACTCGCCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG
 ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAC TGCGG
 AACTACTTACTCTAGCTTCCCGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAG
 GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
 AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
 TTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
 GTGCCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACGTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
 ATTTAAACCTTCATTTTAAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
 CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCGCTAGAAAAGATCAAAG
 GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAACAAAAAAACCACCGC
 TACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAC TGCGT
 TCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTG TAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA
 AGAACTCTGTAGCACCGCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
 GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
 GGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
 TGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGAGAAAGGCGGACA
 GGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
 CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT

GCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCTCGG
 CCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACAATGTTCTTTCTCGCTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC
 GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCGAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
 CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGA
 TTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA
 TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTA
 TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
 CCAAGCTCTAGCTAGAGGTCGACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGCAGATCCGGGC
 AACGTGTGTGCATTGCTGCAGGCGCAGAACTGGTAGGTATGGCAGATCTATACATTGAATCAA
 TATTGGCAATTAGCCATATTAGTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCA
 TTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCG
 CCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
 AGCCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
 AACGACCCCGCCCATTTGACGTCATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
 TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
 TATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT
 GCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
 ATTACCATGGTGATGCGGTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG
 GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACAAAATCAACGG
 GACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
 TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCCGCATC
 GCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCCAG
 TACTCTTGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGA
 GTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAGTCACAGTCGCAAGG
 TAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCAGCGGGTGGCGGTGGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCT
 GCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO.: 60

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCC

SEQ ID NO.: 61

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTTGTGATGACCCAACTCC

SEQ ID NO.: 62

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATCGTTATGTCTCAGTCTCC

SEQ ID NO.: 63

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGC

SEQ ID NO.: 64

GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTCCCCTGGCCCC

SEQ ID NO.:65

GTAAGCGAATTCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG

SEQ ID NO.:66

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG
GGGGCACAGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGT
GGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGT

SEQ ID NO.:67

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAAGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO.:68

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGG
TGAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCTAGTTTCCAAAAACGA
GGAGGATTTGATATTACCTGGCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTT
TGCTTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTGCCGCCACCATGGAGACAGACA
CACTCTGTCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCTACTGGCGGAGACGGAGCTTACG
GGCCCATCTGTCTTTCCCTGGCCCCCTCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATTCCTCACACATGC
CCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCC
AAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCTGCCC
CCATCCCGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACG
CCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATA
AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGAC
ATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGCC
GGACGAACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCCCTCTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCC

TTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACCTGAACCCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCCGGGTAG
 TAGTATATACTATCCAGACTAACCCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATG
 CTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGATGTAGGTGGCGGGCCAAGAT
 AGGGGGCGGATTGCTGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCAC
 AGGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGG
 TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
 GGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGC
 TATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTAT
 CCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCT
 AATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAAT
 ATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATC
 TGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
 GTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGT
 GCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCA
 TATGCTATCCTCAGCATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCCTTGAAGACGAAAGGGCC
 TCGTGATACGCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATAGTTTCTTAGACGTAGGTG
 GCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATA
 TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
 TGAGTATTC AACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTGCCTTCCTGTTT
 TTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
 GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTT
 TTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTGACGCCG
 GGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAG
 TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
 TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG
 CTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG
 AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
 AACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG
 CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGTTTATTGCTGATA
 AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
 CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC
 AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCAT
 ATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT
 TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG
 TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
 CAAAAAACACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTT

CGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGCTTACCGGGTTGGAAGCAGATAGTTAC
CGGATAAGGCGCAGCGGTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGC
TTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTG
ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGAC
CGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC
ATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATT
ATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG
CTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCAC
GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTGTTTTGGCACCAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCGTTGACGCAATGGGCGTAGGCGGTGAC
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTCCGCA
TCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCC
AGTACTCTTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGC
GAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGCGCTAACCAGTCACAGTCGCAA
GGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCAGCGGTGGCGGTTCGGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTG
CTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO.: 69

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCGAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGT

SEQ ID NO.: 70

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCGAGGTTGACGCTTCAGGAGTCAGG

SEQ ID NO.: 71

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

SEQ ID NO.: 89: Иллюстративный вариант осуществления CDR11

K-S-S-Q-S-L-L-N/H-S/T-S/N/D-N/G-Q/N/K-K/L-N-Y-L-A

SEQ ID NO.: 90: Иллюстративный вариант осуществления CDR11

K-A-S-Q-D-I-H-N/T-Y/F-L-N

SEQ ID NO.:91: Иллюстративный вариант осуществления CDRL2
F-A-S-T-R-E-S

SEQ ID NO.: 92: Иллюстративный вариант осуществления CDRL2
L-V-S-K-L-D-S

SEQ ID NO.:93: Иллюстративный вариант осуществления CDRL2
R-A-N-R-L-V-D

SEQ ID NO.:94: Иллюстративный вариант осуществления CDRL3
Q-Q-H-Y-S-T-P-L-T

SEQ ID NO.:95: Иллюстративный вариант осуществления CDRL3
W/L-Q-Y/G-D/T-A/E/H-F-P-R-T

SEQ ID NO.:96: Иллюстративный вариант осуществления CDRH1

1

G-Y-T/I-F-T-D/E-Y-E/N-M/I/V-H

SEQ ID NO.:97: Иллюстративный вариант осуществления CDRH1
G-F-T/S-I-T-S-G-Y-G-W-H

SEQ ID NO.:98: Иллюстративный вариант осуществления CDRH2
V/N/G-I/L-D-P-E/A/G-T/Y-G-X-T-A

SEQ ID NO.:99: Иллюстративный вариант осуществления CDRH2
Y-I-N/S-F/Y-N/D-G

SEQ ID NO.:100: Иллюстративный вариант осуществления CDRH3
M-G-Y-S/A-D-Y

SEQ ID NO.:101: Иллюстративный вариант осуществления CDRH3
A-S-S-Y-D-G-F-L-A-Y

SEQ ID NO.:102: Иллюстративный вариант осуществления CDRH1

3

A-R/W-W/F-G-L-R-Q/N

SEQ ID NO.103 - переменный участок легкой цепи 3A2
DAVMTQIPLTSLVTIGQPASLSCKSSQSLLHSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSK
LD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGHFPRTFAGGTNLEIK

SEQ ID NO.104 - переменный участок легкой цепи 3F6
SIVMTQTPLTSLVTIGQPASITCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSK
LD SGVPDGFRTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGHFPRTFGGGKLEIK

SEQ ID NO.105 - переменный участок легкой цепи 3E8
DAVMTQIPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSK
LD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGHFPRTFGGGKLEIK

SEQ ID NO.106 - переменный участок легкой цепи 3E10

DIVMTQAAPSPVPTPGESVSI SCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSN
 LASGVPDRFIGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK
 SEQ ID NO.107 - вариабельный участок легкой цепи 3A9
 DIVMTQSPSSLAMSLGQKVTMSCKSSQSLNNSNQLNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRSGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHFNTPFTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.108 - вариабельный участок легкой цепи 3B1
 DIVMTQSPSSLAISVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.109 - вариабельный участок легкой цепи 3G5
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGSGTKLELK
 SEQ ID NO.110 - вариабельный участок легкой цепи 3B2
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.111 - вариабельный участок легкой цепи 3B8
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.112 - вариабельный участок легкой цепи 3G8
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.113 - вариабельный участок легкой цепи 3F7
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.114 - вариабельный участок легкой цепи 3E9
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTEFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.115 - вариабельный участок легкой цепи 3C3
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFGS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISGVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.106 - вариабельный участок легкой цепи 3E12
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLNRSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.117 - вариабельный участок легкой цепи 4A2
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLLYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTYFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLDLK
 SEQ ID NO.118 - вариабельный участок легкой цепи 3F10

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLNNTSNQNLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TTESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.119 - вариабельный участок легкой цепи 3F4
 DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNTSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRASGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.120 - вариабельный участок легкой цепи 3B11
 DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLNNTSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
 TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.121 - вариабельный участок легкой цепи 3G12
 DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSI TCKASQDVGTA VAWYQQKPGQSPPELLIYWTSTRHTGV
 PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELR
 SEQ ID NO.122 - вариабельный участок легкой цепи 3D1
 DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHTYLNWFQQKPGKSPETLIYRANRLVDGV
 PSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.123 - вариабельный участок легкой цепи 3C2
 DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIHRANRLVAGV
 PSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDLGIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.124 - вариабельный участок легкой цепи 3E6
 DIQMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNYLNWFQQKPGKSPKTLIHRANRLVAGV
 PSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDLGIYYCLQYDAFPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.125 - вариабельный участок легкой цепи 3H3
 DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHRFLNWFQQKPGKSPKTLIFHANRLVDGV
 PSRFSGSGSGLDYSLTISSEYEDMGIYFCLQYDAFPLTFGAGTKLELK
 SEQ ID NO.126 - вариабельный участок тяжелой цепи 3A2
 HEIQLQQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTF TDYNMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDV
 TEYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMDLSSLTSDSAVYFCAWFGLRQWGQGT LVTVST
 SEQ ID NO.127 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F6
 HEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTEYNIHWVKQKPGQGP EWIGNINPYNDV
 TEYNEKFKGKATLTSDKASSTAYMDLSSLTSEDSAVYYCARWGLRNWGGT LVTVSA
 SEQ ID NO.128 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E8
 HEVQLQQSVPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTEYNMHWVKQKPGQGP EWIGNINPYNNV
 TEYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYLDLSSLTSEDSAVYYCARWGLRNWGGT LVTVSA
 SEQ ID NO.129 - вариабельный участок тяжелой цепи 3A9
 HQVQVQQPGAELVRPGASVTLSCASGYIFTDYEVHWVRQRPVHG LEWIGVIDPETGD
 TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTAEDSAVYYCIGYADYWGQT TLTVSS
 SEQ ID NO.130 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B1

HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGG
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.131 - варибельный участок тяжелой цепи 3B2
HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGA
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.132 - варибельный участок тяжелой цепи 3F4
HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGS
TAYNQKFKGKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.133 - варибельный участок тяжелой цепи 3E9
HEVQLQQSGAELVRPGASATLSCKASGYTFTDYEIMHWKQTPVHGLEWIGVIDPETGS
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYADYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.134 - варибельный участок тяжелой цепи 3B8
HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYADYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.135 - варибельный участок тяжелой цепи 3G8
HQVQLKQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIVHWKQTPVHGLEWIGVIDPATGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.136 - варибельный участок тяжелой цепи 3F7
HQAYLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKDKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.137 - варибельный участок тяжелой цепи 3E12
HQVQLQQSEAEVLKPGASVKLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSLTSEDSAVYYCMGHSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.138 - варибельный участок тяжелой цепи 3G12
HEVQLQQSVAELVRPGASVTVSCKASGYIFTDYEIHVVKQTPAHGLEWIGVIDPETGN
TAFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.139 - варибельный участок тяжелой цепи 3F10
HEVQLQQSVAELVRPGAPVTLSCKASGYTFTDYEIVHWKQTPVHGLEWIGVIDPETGA
TAYNQKFKGKATLTADKSSSAAYMELSLTSEDSAVYYCMSYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.140 - варибельный участок тяжелой цепи 3C3
HEVQLQQSVAEVVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVIDPETGV
TAYNQRFDRKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.141 - варибельный участок тяжелой цепи 3G5
HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHVVKQTPVHGLEWIGVLDPGTGR
TAYNQKFKDKATLSADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMSYSDYWGPGTTLTVSS
SEQ ID NO.142 - варибельный участок тяжелой цепи 3B11

HEVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVRGLEWIGVIDPATGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSAFMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.143 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E6
HQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFSYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGD
TVYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCISYAMDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO.144 - вариабельный участок тяжелой цепи 4A2
HQVQLQQSGTELVRPGASVTLSCKASGYKFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGG
TAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCISYAMDYWGQGTSTVTVSS
SEQ ID NO.145 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E10
HEVQLQQSGFELVKPGASVKISCKASGDTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGG
ITYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMELRGLTSEDSAVYYCQAYYRNSDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO.146 - вариабельный участок тяжелой цепи 3D1
HEVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPQDKLEWMGYISFNGD
YNYNPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTPLVTVSA
SEQ ID NO.147 - вариабельный участок тяжелой цепи 3C2
HDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPQGNKLEWMGYISFNGD
SNYNPSLKSRIITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDATATYYCASSYDGLFAYWGQGPLVTVSA
A
SEQ ID NO.:148
KSSQSLHSDGKTYLN
SEQ ID NO.:149
LVSKLDS
SEQ ID NO.:150
WQGFHFPRT
SEQ ID NO.:151
GYTFTD YNMH
SEQ ID NO.:152
YINPYNDVTE
SEQ ID NO.:153
AWFGL RQ
SEQ ID NO.:154
RSSKSLHSNGN TYLY
SEQ ID NO.:155
RMSNLAS
SEQ ID NO.:156
MQHLEYPYT

SEQ ID NO.:157
 GDTFTD YYMN
 SEQ ID NO.:158
 DINPNYGGIT
 SEQ ID NO.:159
 QAYYRNS DY
 SEQ ID NO.:160
 KASQDVGTA
 SEQ ID NO.:161
 WTSTRHT
 SEQ ID NO.:162
 QQHYSIPLT
 SEQ ID NO.:163
 GYIFTDYIEH
 SEQ ID NO.:164
 VIDPETGNTA
 SEQ ID NO.:165
 MGYSYD
 SEQ ID NO.:166
 MVLQTQVFISLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSNFQKNF
 LAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTP
 LTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 SEQ ID NO.:167
 MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYIEHWVRQ
 APGQGLEWMGVIDPETGNTAFNQKFKGRVTITADTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCMGYSDY
 WGQGTILVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
 FPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
 YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
 VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
 SEQ ID NO.:168
 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNLSNFQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYFAS
 TRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTPLTFGQGTKLEIK
 SEQ ID NO.:169

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYIEHWVRQAPGQGLEWMGVIDPETGNT
AFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCMGYSDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO.:170

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIHNFLNWFQQ
KPGKAPKTLIFRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNPFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKSTYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:171

MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSITSGYGWHWIR
QHPGKGLEWIGYINYDGHNDYNPSLKSRTISQDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASSYDG
LFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTFP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:172

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKAPKTLIFRANRLVDGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO.:173

EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSITSGYGWHWIRQHPGKGLEWIGYINYDGHN
DYNPSLKSRTISQDTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGLTVTVS

SEQ ID NO:186 (консенсусная последовательность 1
вариабельного участка вариантной легкой цепи 3A4)

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGYYCFQGSHPVPLTFGXGTXLEXK

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

SEQ ID NO:187 (консенсусная последовательность 2
вариабельного участка вариантной легкой цепи 3A4)

DX_{a1}VTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPX
{a7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX{a8}GYYCFQGSHPVPLTFGX_{a9}GTX_{a1}
₀LEX_{a11}K

где X_{a1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a2} может быть A или P;

X_{a3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{a4} может быть L или P;

X_{a5} может быть кислой аминокислотой;

X_{a6} может быть Q или P;

X_{a7} может быть основной аминокислотой;

X_{a8} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a9} может быть A или Q;

X_{a10} может быть основной аминокислотой или

X_{a11} может быть гидрофобной аминокислотой,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO:188 (консенсусная последовательность 3
вариабельного участка вариантной легкой цепи 3A4)

DX_{A1}VTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPX
{A7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX{A8}GYYCFQGSHPVPLTFGX_{A9}GTX_{A1}
₀LEX_{A11}K

где X_{A1} может быть V или I;

X_{A2} может быть A или P;

X_{A3} может быть S или T;

X_{A4} может быть L или P;

X_{A5} может быть D или E;
 X_{A6} может быть Q или P;
 X_{A7} может быть K или Q;
 X_{A8} может быть L или V;
 X_{A9} может быть A или Q;
 X_{A10} может быть R или K или
 X_{A11} может быть L или I,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 48.

SEQ ID NO:189 (вариабельный участок варианта 1 легкой цепи
3A4: Lvh1)

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:190 (вариабельный участок варианта 2 легкой цепи
3A4: Lvh2)

DVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:191 (консенсусная последовательность 1
вариабельного участка вариантной тяжелой цепи 3A4)

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFDDYMSWVXQXXGXLEWXXGINPYNGDT
NYNQKFKGXXXXTXDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTVTVSS

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

SEQ ID NO:192 (консенсусная последовательность 2
вариабельного участка вариантной тяжелой цепи 3A4)

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}
LEWX_{b11}GINPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXT_{b23}TVTVSS

где X_{b1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b2} может быть P или A;

X_{b3} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b4} может быть V или K;

X_{b5} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b6} может быть основной аминокислотой;

X_{b7} может быть S или A;

X_{b8} может быть H или P;

X_{b9} может быть основной аминокислотой;

X_{b10} может быть S или G;

X_{b11} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b12} может быть основной аминокислотой;

X_{b13} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b14} может быть I или T;

X_{b15} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b16} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b17} может быть K или T;

X_{b18} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{b19} может быть Q или E;

X_{b20} может быть N или S;

X_{b21} может быть T или R;

X_{b22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой или

X_{b23} может быть S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO:193 (консенсусная последовательность 3
 вариабельного участка вариантной тяжелой цепи 3A4)

QX_{B1}QLVQSGX_{B2}EX_{B3}X_{B4}KPGASVKX_{B5}SCKASGYTFTDDYMSWVX_{B6}QX_{B7}X_{B8}GX_{B9}X_{B10}
 LEWX_{B11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{B12}X_{B13}X_{B14}X_{B15}TX_{B16}DX_{B17}SX_{B18}STAYMX_{B19}LX_{B20}SLX_{B21}SEDX_{B22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXX_{B23}VTVSS

где X_{B1} может быть I или V;

X_{B2} может быть P или A;

X_{B3} может быть M или V;

X_{B4} может быть V или K;

X_{B5} может быть M или V;

X_{B6} может быть K или R;

X_{B7} может быть S или A;

X_{B8} может быть H или P;

X_{B9} может быть K или Q;

X_{B10} может быть S или G;

X_{B11} может быть I или M;

X_{B12} может быть K или R;

X_{B13} может быть A или V;

X_{B14} может быть I или T;

X_{B15} может быть L или I;

X_{B16} может быть V или A;

X_{B17} может быть K или T;

X_{B18} может быть S или T;

X_{B19} может быть Q или E;

X_{B20} может быть N или S;

X_{B21} может быть T или R;

X_{B22} может быть S или T или

X_{B23} может быть S или L,

где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная значениями X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, приведенном в SEQ ID NO: 46.

SEQ ID NO:194 (вариабельный участок варианта 1 тяжелой цепи 3A4: Hvh1)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGGGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:195 (вариабельный участок варианта 2 тяжелой цепи 3A4: Hvh2)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGGGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:196 (вариабельный участок варианта 3 тяжелой цепи 3A4: Hvh3)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGGGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:197 (вариабельный участок варианта 4 тяжелой цепи 3A4: Hvh4)

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGGGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 198 мышинная легкая (каппа) цепь 3A4

DVVMQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSN
RFGSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSFHVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTL
TSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:199 вариант 1 гуманизированной легкой (каппа) цепи 3A4; Lh1

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHLSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFGSGVDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSFHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSTL
TSLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:200 вариант 2 гуманизированной легкой (каппа) цепи 3A4; Lh2

DVVMQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISRVEAEDVGYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTL
TLISKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:201 тяжелая (IgG1) цепь мышиного 3A4

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:202 вариант 1 гуманизированной тяжелой (IgG1) цепи 3A4; Hh1

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:203 вариант 2 гуманизированной тяжелой (IgG1) цепи 3A4; Hh2

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:204 вариант 3 гуманизированной тяжелой (IgG1)

цепи 3A4; Hh3

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VITPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO:205 вариант 4 гуманизированной тяжелой (Iggl)
 цепи 3A4: Hh4

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VITPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:206

ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

SEQ ID NO.:207

ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGAGACAGGGAG

SEQ ID NO.:208

ATACCCAAGCTTGGGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG

SEQ ID NO.:209

ATACCCAAGCTTCTAACTCTCCCCTGTTGAAG

SEQ ID NO:210 pK-CR5

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTATAAATTCGCGTTAAATTTTGTATAATCAGC
 TCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAG
 ATAGGGTTGAGTGTGTTCAGTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAAC
 GTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCA
 AGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
 AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGAAAGGAGCG
 GCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACCCGCCGCGCTT
 AATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA

TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA
AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCG
TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGT
GGATCCACATCGGCGCGCCAAATGATTGCCCTCCCATATGTCCTTCCGAGTGAGAGACACAA
AAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTTTATTAGCCAGAGGTCGAGATTTA
AATAAGCTTGCTAGCAGATCTTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTG
GATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTT
TTTGAAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTACCCCA
ACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCGCCGTCTCAAGACCGCCTACT
TTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCGACCGCCACCCGCTGCCGCCCG
CCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCGACTGTGACTGGTTAGACGCCTTTCTCGAGAGGTTTTCCG
ATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGG
TTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGC
TGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCT
TCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGC
TCTGCTTATATAGCCTCCACCGTACACGCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTTATAATAC
AAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATA
CAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAAT
ACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTAAAGG
TTGTCGAGTGAAGACGAAAGGGTTCATTAAGCGCGCCGTCGACCTCGAGGGGGGGCCCGGTA
CCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCTGTGTGAATTTGTTATCCGCTCACAAATTCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
TGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCC
GCTTTCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGA
GGCGGTTTGGCGTATTGGGCGCTCTTCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTTCGTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA
AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCG
GGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCG
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTCAGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC
TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
GGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAA
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGC

AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
 TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
 ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
 TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTA
 TTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA
 CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCA
 GCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCC
 ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGC GC
 AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
 AGCTCCGTTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
 AGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTATCACTCATGGTT
 ATGGCAGCACTGCATAATTCTTACTGTCTATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
 GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCG
 TCAATACGGGATAATACCGGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATATTGGAACCGT
 TCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACT
 CGTGACCCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
 GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGAATAAGGGCGACACGAAATGTTGAATACTCATACTC
 TTCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
 GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:211 pMPG-CR5

GTCGACGATACCGTGCACTTAATTAAGCGCGCTCGACCAAATGATTTGCCCTCCCAT
 TGTCCTTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTT
 TTATTAGCCAGAGGTCGAGGTCGGGGGATCCGTTTAACTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGT
 GGAGAGAAAGGCAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTGAA
 TATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCGCTTTTGA
 GAGGGAGTACTACCCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCGCC
 GTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCCGACC
 GCCACCCGCTGCCGCCGCCACGGTGTCTAGCCTACCTTGCAGCTGTGACTGGTTAGACGCCT
 TTCTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTAC
 CGTTCGGAGGCCGACGGGTTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTC
 AACCGCGAGCCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCT
 GGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTG
 ACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCTCCACCGTACACGCCTACCTCGACCCGG
 GTACCAATCTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGAT
 TGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGA
 TTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATACAAACAGACCAG

ATTGCTGTTTGTAAAGGTTGTCGAGTGAAGACGAAAGGGTTAATTAAGGCGCGCCGTCGACT
AGCTTGGCACGCCAGAAATCCGCGCGGTGGTTTTTGGGGGTGCGGGGTGTTTGGCAGCCACAG
ACGCCCCGTGTTTCGTGTCGCCAGTACATGCGGTCCATGCCCAGGCCATCCAAAAACCATGG
GTCTGTCTGCTCAGTCCAGTCGTGGACCAGACCCACGCAACGCCCAAAATAATAACCCCCAC
GAACCATAAACCATTCCCCATGGGGGACCCCGTCCCTAACCCACGGGGCCAGTGGCTATGGCA
GGGCCTGCCGCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACCCGAAC TTGGGGGTGGGGT
GGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAG
TGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGGTTTTATGAACAAACGACCAACACCCGTGCGTTTTATT
CTGTCTTTTTATTGCCGTATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGT
TAGCCTCCCCATCTCCCTATTCCCTTGGCCCTCGGACGAGTGTGGGGCGTCGGTTTCCACT
ATCGGCGAGTACTTCTACACAGCCATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCGATTTGTGT
ACGCCCCGACAGTCCCGGCTCCGGATCGGACGATTGCGTCGCATCGACCCGCGCCCAAGCTGC
ATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATA
CGCCCCGAGCCGCGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGCTCTGCTG
CTCCATACAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCC
GAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTT
GGAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGCCGGA CTTCGGGGCAGTCTCGGCCCAAAGCATCAG
CTCATCGAGAGCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTGCTCCATCACAGTTTGCCAGTGATA
CACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCTTG
CGGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGAGCGATCGCATCCATGGC
CTCCGCGACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACC
CTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTCAGGCTCTCGCTGAATTCCCCAATGTCAAGCACTTC
CGGAATCGGGAGCGCGCCGATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATC
GGCGCAGCTATTTACCCGCGAGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACGAGA
TTCTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAGGTCCGAGACGCTGTGCAACTTTTCGATCAGAAACTT
CTCGACAGACGTGCGGTGAGTTTCAGGCTTTTTTCATATCTCATTGCCCGGGATCTGCGGCACG
CTGTTGACGCTGTTAAGCGGGTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTGAGGCCACACGCGTCACC
TTAATATGCGAAGTGACCTGGGACCGCGCCGCCCGACTGCATCTGCGTGTTGCAATTGCGC
AATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGTCATCATAGAACTAAAGACATGCAAATATATTTCT
TCCGGGGACACGCCAGCAAACGCGAGCAACGGGCCACGGGGATGAAGCAGGGCATGGCGGCC
GACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATG
ATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTA
GATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATC
ACTGGACCGCTGATCGTACGGCGATTTATGCCGCCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTGGCA
TGGATTGTAGGCGCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGC
CGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCAACACTCCAAGAA

TTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCCTTGGCAGAACATAT
CCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA
GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACG
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGGCTCTCCTGTTCCGACCCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCC
TTCGGGAAGCGTGGCGCTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCCAGCCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA
AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
TCTATTTTCGTTTCCATAGTTGCGCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT
ATCAGCAATAAACCCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTTCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
ATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
GGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTGAGAAGTAAGTTGGCCGAGTGTTTACTCAT
GGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGAC
TGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACCTTAAAAAGTGCTCATCATTTGAAA
ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACC
CACTCGTGCACCCAACCTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
AACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACAT
ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTTATTCATGACATTAACTATAAAAAATAGGCGTATCACGAG
GCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCTCTAGCAGATCCGGAATTCCCC
TCCCCAATTTAAATGAGGACCTAACCTGTGGAAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAACGTGAC
AAACAGAGGTTATTGGAATAACTAGCATGCTTAACCTTCATGCAGGGTCACAAAAAGTGATG
ACGATGGTGGAGGAAAACCTATTCAAGGCAGTAATTTCCACTTCTTTGCTGTTGGTGGAGACC
CCTTGGAATGCAGGGAGTGCTAATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGGTACTATAACCC

CTAAAAACCCACAGCCAGTCCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTTGGACAAAA
 ACAATGCTTATCCAGTTGAGTGCTGGGTTCCCTGATCCTAGTAGAAATGAAAATACTAGGTATT
 TTGGGACTTTACAGGAGGGGAAAATGTTCCCCAGTACTTCATGTGACCAACACAGCTACCA
 CAGTGTTGCTAGATGAACAGGGTGTGGGGCCTCTTTGTAAAGCTGATAGCCTGTATGTTTCAG
 CTGCTGATATTTGTGGCCTGTTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAGTGAGAGGCCTTGCAA
 GATATTTTAAGATCCGCCTGAGAAAAAGATCTGTAAAGAATCCTTACCTAATTTTCCTTTTTGC
 TAAGTGACCTTATAAACAGGAGAAGCCAGAGAGTGGATGGGCAGCCTATGTATGGTATGGAAT
 CCCAGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTTTGATGGCACAGAAAGACTTCCAGGGGACCCAGATATGA
 TAAGATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAACCAAAATGCTTTAAACAGGTGCTTTTATTG
 TACATATACATTTAATAAATGCTGCTTTTGTATAAGCCACTTTTAAGCTTGTGTTATTTTGGG
 GGTGGTGTTTTAGGCCTTTTAAACACTGAAAGCCTTTACACAAATGCAACTCTTGACTATGG
 GGGTCTGACCTTTGGGAATGTTTCAGCAGGGGCTGAAGTATCTGAGACTTGGGAAGAGCATTGT
 GATTGGGATTCAGTGCTTGATCCATGTCCAGAGTCTTCAGTTTCTGAATCCTCTTCTCTTGTA
 ATATCAAGAATACATTTCCCATGCATATATTATATTTTCATCCTTGAAAAAGTATACATACTT
 ATCTCAGAATCCAGCCTTTCCCTCCATTCAACAATTCTAGAAGTAAAACTGGGGTAGATGCT
 ATTACAGAGGTAGAATGCTTCCTAAACCCAGAAATGGGGGATCTGC

SEQ ID NO:212 - полипептидная последовательность CDR2
 гуманизированной тяжелой цепи 3A4.

DINPYNGDTN

SEQ ID NO:213 - OGS18500

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGTGATGACCCAACTCC

SEQ ID NO:214 - OGS2084

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTCCG

SEQ IDNO:215 - OGS1879

GGGTTCCAGGTTCCTGCTGGCCAGATCCAGTTGGTGCAATCTGG

EQ ID NO:216 - OGS1810

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

Список цитированной литературы

Santana-Davila R. and Perez E.A. (2010) "Treatment options for patients with triple-negative breast cancer" *J Hematol Oncol.* 27:42.

de Ruijter T.C., Veeck J., et al. (2011) "Characteristics of triple-negative breast cancer." *J Cancer Res Clin Oncol.* 137:183.

Ismail-Khan R. and Bui M.M. (2010) "A review of Triple-negative breast cancer" *Cancer Control* 17:173.

Carey L.A., Perou C.M. et al. (2006) "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." *JAMA* 295:2492.

Krieg M., Seynaeve C. et al. (2009) "Sensitivity to first-line chemotherapy for metastatic breast cancer in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers." *J Clin Oncol* 27:3764.

Rouzier R., Perou C.M. et al. (2005) "Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy" *Clin Cancer Res* 11:5678.

Fong P.C., Boss D.S. et al. (2009) "Inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase in tumors from BRCA mutation carriers." *N Engl J Med* 361:123.

Dent R., Trudeau M et al. (2007) "Triple-Negative Breast Cancer: Clinical Feature and Patterns of Recurrence" *Clin. Cancer Res.* 13: 4429.

Bernstein L and J.V. Lacey Jr. (2011) "Receptors, Associations, and Risk Factor Differences by Breast Cancer Subtypes: Positive or Negative?" *J Natl Cancer Inst* 103(6): 451-453 (Расширенная публикация 23 февраля 2011 г.).

Nofech-Mozes S. et al., (2009) "Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers" *Cancer Res. Treat.* 118: 131-137.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ лечения тройного негативного рака молочной железы, включающий введение индивиду антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, которое конъюгировано с терапевтической молекулой, подходящей для лечения тройного негативного рака молочной железы, и способно связываться с ассоциированным с почками антигеном 1 (КААГ1), причем антителo или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

CDRH1 с SEQ ID NO: 49,
CDRH2 с SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 212,
CDRH3 с SEQ ID NO: 51,
CDRL1 с SEQ ID NO: 52,
CDRL2 с SEQ ID NO: 53 и
CDRL3 с SEQ ID NO: 54.

2. Способ по п.1, в котором антителo представляет собой моноклональное антителo, химерное антителo, антителo человека или гуманизированное антителo или его антигенсвязывающий фрагмент.

3. Способ по п.1 или 2, в котором антителo или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего
вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 48 и
вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 46;

б) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего
вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 186, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 48, и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 191, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 46;

с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 187 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 192;
 d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 188 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 193;
 e) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194;

g) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195;

h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 196;

i) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 197;

j) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194; и

k) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 200 и

тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205;

b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;

c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;

d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204;

e) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205;

f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;

g) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;

h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204; и

i) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205.

5. Способ по любому из пп.1-4, в котором терапевтическая молекула представляет собой цитотоксическое средство или антимитотическое средство.

6. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение химиотерапевтического средства.

7. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение противоракового средства.

8. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение цитотоксического агента.

9. Способ по любому из пп.1-5, дополнительно включающий введение ингибитора PARP1, ингибитора EGFR или терапевтического антитела, подходящего для лечения тройного негативного рака молочной железы.

10. Способ по любому из пп.1-5, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают аффинностью 1нМ или меньше или 0,1 нМ или меньше в отношении КААГ1.

11. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного специфически связываться с КААГ1, причем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

CDRH1 с SEQ ID NO: 49,

CDRH2 с SEQ ID NO: 50 или SEQ ID NO: 212,

CDRH3 с SEQ ID NO: 51,

CDRL1 с SEQ ID NO: 52,

CDRL2 с SEQ ID NO: 53 и

CDRL3 с SEQ ID NO: 54,

в производстве лекарственного средства для лечения тройного негативного рака молочной железы.

12. Применение по п.11, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с терапевтической молекулой, подходящей для лечения тройного негативного рака молочной железы.

13. Применение по п.12, при котором терапевтическая молекула представляет собой цитотоксическое средство или антимиотическое средство.

14. Применение по любому из пп.11-13, при котором антитело представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, антитело человека или гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

15. Применение по любому из пп.11-14, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

а) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 48 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 46;

б) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 186, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенная как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 48, и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 191, где по меньшей мере одна из аминокислот, определенных как X, представляет собой аминокислотную замену по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде с SEQ ID NO: 46;

с) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 187 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 192;

д) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 188 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 193;

е) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 или SEQ ID NO: 190 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 196 или SEQ ID NO: 197;

ф) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194;

г) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195;

h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 196;

и) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 189 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 197;

ж) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего

вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и

вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 194; и
к) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего
вариабельную область легкой цепи с SEQ ID NO: 190 и
вариабельную область тяжелой цепи с SEQ ID NO: 195.

16. Применение по любому из пп.11-15, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбрано из группы, состоящей из:

- a) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202, SEQ ID NO: 203, SEQ ID NO: 204 или SEQ ID NO: 205;
- b) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;
- c) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;
- d) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204;
- e) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 199 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205;
- f) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 202;
- g) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 203;
- h) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 204; и
- i) антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, содержащего легкую цепь с SEQ ID NO: 200 и тяжелую цепь с SEQ ID NO: 205.

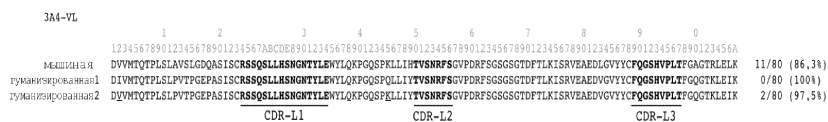
17. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит противораковое средство.

18. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит химиотерапевтическое средство.

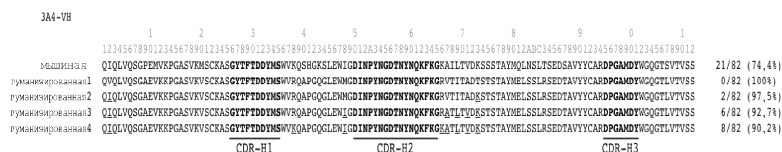
19. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит цитотоксическое средство.

20. Применение по любому из пп.11-16, при котором лекарственное средство дополнительно содержит ингибитор PARP1, ингибитор EGFR или терапевтическое антитело, подходящее для лечения тройного негативного рака молочной железы.

21. Применение по любому из пп.11-16, при котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент обладают аффинностью 1 нМ или меньше или 0.1 нМ или меньше в отношении КААГ1.



Фиг. 1а



Фиг. 1b

034414

Выравнивание переменной легкой цепи

Мышьяная VL DIVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHSGNGNTYLEWY LQKPGQSPKLLIHTVSNRF 60
SEQ ID NO.33 DIVVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSGNGNTYLEWY LQKPGQSPQLLIYTVSNRF 60

Мышьяная VL SGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK 112
SEQ ID NO. 33 SGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFQGQTKLEIK 112
*****-***** **:**

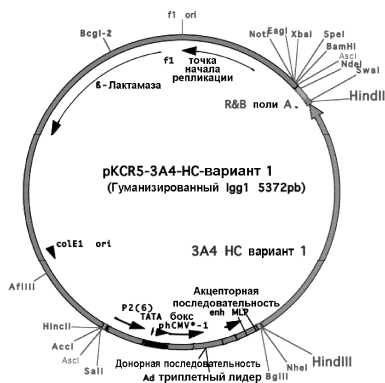
Фиг. 2а

Выравнивание переменной тяжелой цепи

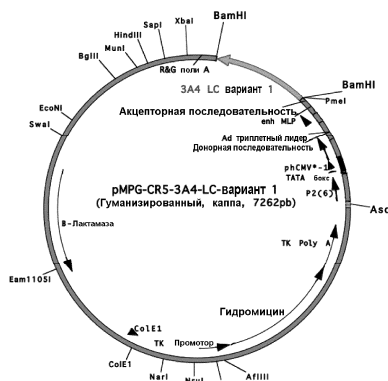
Мышина VH QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYSWVQKSHGKSLIEWIGDINPYNGDTNY 60
 SEQ ID NO. 38 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVCKASGYTFTDDYSWVRQAPGGLEWMGDINPYNGDTNY 60
 ***** *: *****-*****-*****-*****-*****-*****-*****-*****-*****-*****

Мышинная VH NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGSVTVSS 116
SEQ ID NO. 38 NQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS 116
***** : * * * : ***** * * * ***** : *****

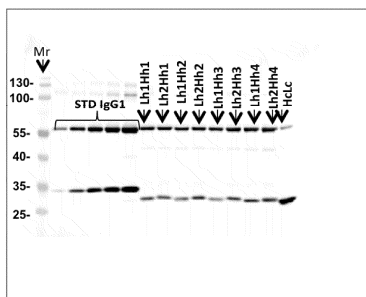
ФИГ. 2b



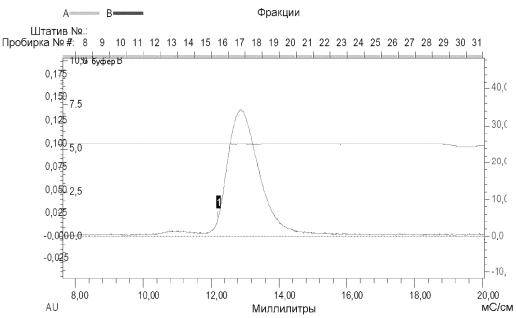
ФИГ. 3а



ФИГ. 3b



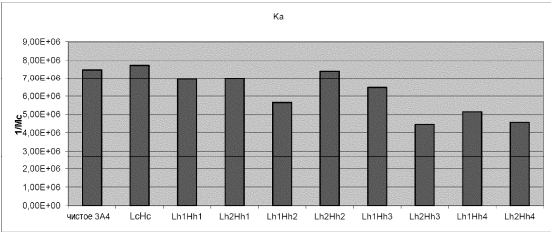
ФИГ. 4



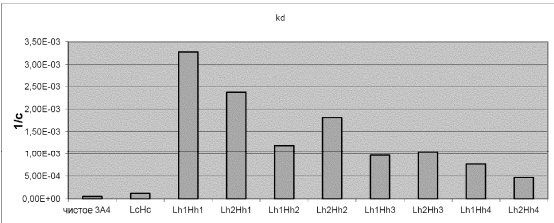
Фиг. 5

Антитело	ka (1/Мс)	kd (1/с)	Kd (нМ)	Различие, раз
LcHc	7,72 x 10 ⁶	1,21 x 10 ⁻⁴	0,016	-
Lh1Hh1	6,93 x 10 ⁶	3,28 x 10 ⁻³	0,474	29,6
Lh2Hh1	6,97 x 10 ⁶	2,37 x 10 ⁻³	0,341	21,3
Lh1Hh2	5,65 x 10 ⁶	1,19 x 10 ⁻³	0,211	13,2
Lh2Hh2	7,40 x 10 ⁶	1,81 x 10 ⁻³	0,245	15,3
Lh1Hh3	6,46 x 10 ⁶	9,60 x 10 ⁻⁴	0,149	9,3
Lh2Hh3	4,46 x 10 ⁶	1,02 x 10 ⁻³	0,228	14,3
Lh1Hh4	5,14 x 10 ⁶	7,64 x 10 ⁻⁴	0,149	9,3
Lh2Hh4	4,57 x 10 ⁶	4,70 x 10 ⁻⁴	0,103	6,4

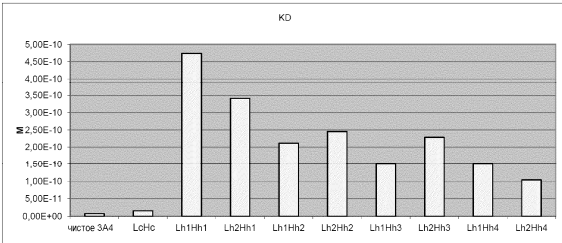
Фиг. 6



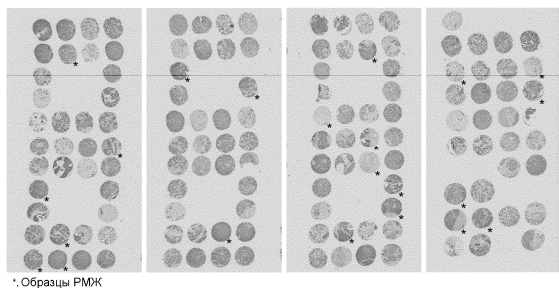
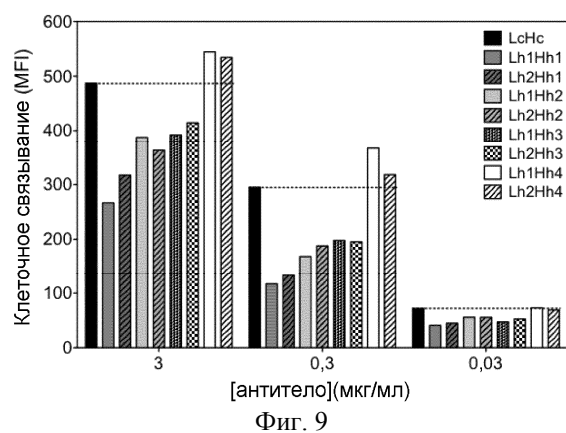
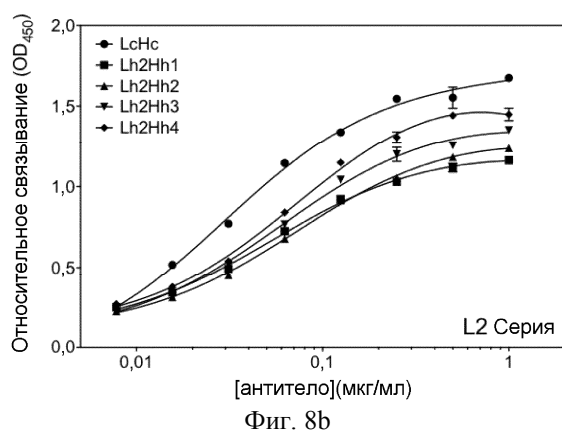
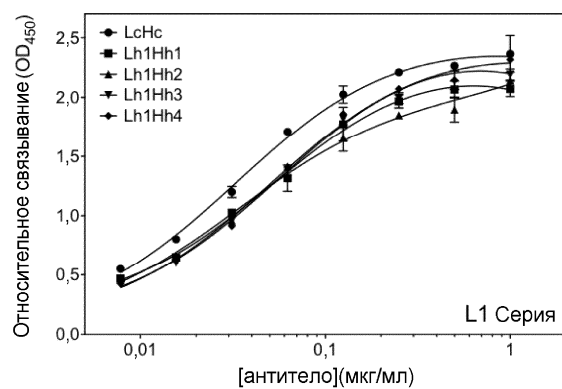
Фиг. 7а



Фиг. 7b

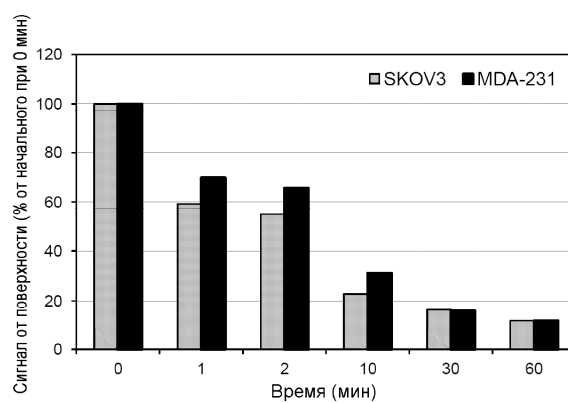


Фиг. 7с





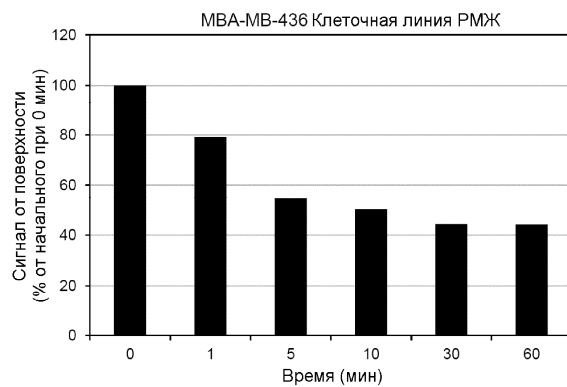
Фиг. 11



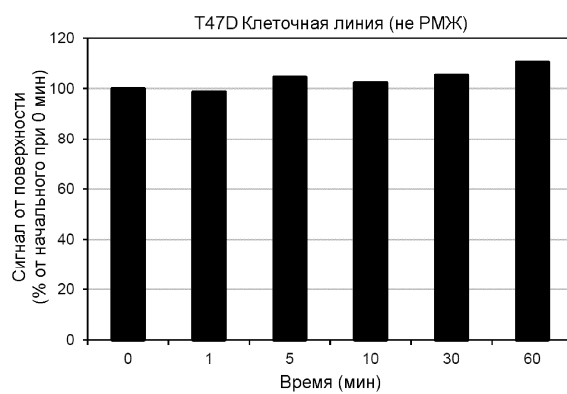
Фиг. 12



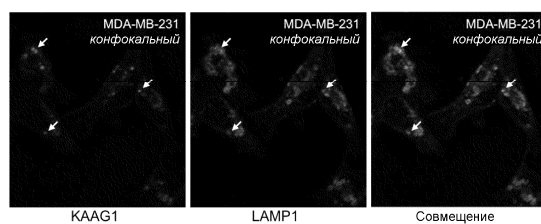
Фиг. 13



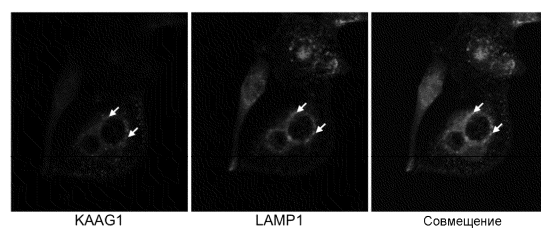
Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16



Фиг. 17