

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201992513** (13) **A1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.05.31

(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 РАКА ГРУДИ

(31) 61/584,629

(32) 2012.01.09

(33) US

(62) 201491352; 2013.01.09

(71) Заявитель:
АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (СН)

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

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

(57) 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 антигенсвязывающие 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 данном документе раскрыто применение конъюгатов антитела в лечении тройного негативного рака молочной железы и/или базальноподобного рака молочной железы.

A1

201992513

201992513

A1

СПОСОБ ЛЕЧЕНИЯ РАКА ГРУДИ

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Ежегодно во всем мире диагноз "рак молочной железы" ставят более чем 1 миллиону 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, которая в сочетании с положительным статусом ER позволяет 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 Tykerb™ (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 предклиматическом 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 адъювантной терапии, как и при неоадъювантной 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-тубулин, 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 однонитевых разрывов ДНК путем ассоциации с

поврежденными нитями и является посредником в вовлечении ферментов, необходимых для репарации однонитевых разрывов (de Ruijter et al., 2011). Таким образом, стратегия состояла в том, чтобы ингибировать активность PARP1 как средства, позволяющего раковым клеткам накапливать все больше однонитевых 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 Genbank Q9UBP8, кДНК последовательность представлена нуклеотидами 738-992 последовательности SEQ ID NO.:1). Было обнаружено, что локус, содержащий KAAG,1 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 опухоль-специфичным 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, меланоммах, 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 локус *VMP/DCDC2/KAAG1* ассоциирован с дислексией (Schumacher et al., 2006; Cope 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. РСТ/CA2009/001586, опубликованную 3 июня 2010 г. под номером WO2010/060186, и РСТ/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 фигуре 1a 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 фигуре 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 фигуре 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 $\leq 0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фигуре 2b показано выравнивание вариабельного участка тяжелой цепи 3A4 мыши (SEQ ID NO:2) с вариантом вариабельного 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 $\leq 0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фигуре 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 вариабельного домена тяжелой цепи иммуноглобулина.

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

На фигуре 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). Mr маркер молекулярного веса (кДа).

На фигуре 5 представлен график результатов гель-фильтрации

в Superdex G75 образца рекомбинантного KAAG1. KAAG1 впрыскивали над гель-фильтрацией и разделяли со скоростью 0,4 мл/мин. Наибольший пик находится между фракциями 15-19.

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

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

На фигуре 7b изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости диссоциации (K_d) гуманизированных антител.

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

На фигуре 8a проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с KAAG1 в ИФА тесте (ELISA). Эта фигура демонстрирует сравнительное связывание вариантов гуманизированного антитела 3A4 и мышинового 3A4. Графики связывания в зависимости от концентрации гуманизированных тяжелых цепей (Nh1, Nh2, Nh3 и Nh4), объединенных с вариантом легкой цепи Lh1.

На фигуре 8b проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с KAAG1 в ИФА тесте. Эта фигура демонстрирует сравнительное связывание вариантов гуманизированного антитела 3A4 и мышинового 3A4. Графики связывания в зависимости от концентрации гуманизированных тяжелых цепей (Nh1, Nh2, Nh3 и Nh4), объединенных с вариантом легкой цепи Lh2.

На фигуре 9 проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с KAAG1 на поверхности раковых клеток. На данной иллюстрации продемонстрирована сравнительная связывающая активность гуманизированных и мышинных антител 3A4 на непрмеабилизированных клетках карциномы яичника SKOV-3.

На фигуре 10 показан результат сканирования микрочипа тканей, содержащий 139 образцов биопсии, полученных от пациентов с РМЖ. Образцы блоттировали, используя антитело 3A4 к KAAG1, было показано, что огромное большинство опухолей молочной железы экспрессировали антиген KAAG1 очень большом

количестве. Образцы с подтвержденным ТНPMЖ помечены звездочкой.

На фигуре 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 KAAG1 (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 фигуре 12 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток MDA-MB-231 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело, интернализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фигуре 13 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток MDA-MB-436 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело, интернализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фигуре 14 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток MDA-MB-436 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело, интернализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фигуре 15 представлено обнаружение антигена KAAG1 на поверхности клеток T47D при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к KAAG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубации клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс KAAG1/антитело, интернализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фигуре 16 представлены иммунофлуоресцентные данные, полученные на живых клетках MDA-MB-231 с антителом 3A4 к KAAG1

и антителом к LAMP1. Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к KAAG1 показан на рисунке слева, Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к LAMP1 показан на рисунке в центре, и совмещенное изображение их обоих показано на рисунке справа. Эти данные иллюстрируют совместную локализацию KAAG1 и LAMP1 рядом с окооядерной областью.

На фигуре 17 представлены иммунофлуоресцентные данные, полученные на живых клетках MDA-MB-231 с антителом 3A4 к KAAG1 и антителом к LAMP1. Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к KAAG1 показан на рисунке слева, Иммунофлуоресцентный сигнал, связанный с антителом к LAMP1 показан на рисунке в центре, и совмещенное изображение их обоих показано на рисунке справа. Эти данные иллюстрируют локализацию KAAG1 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 KAAG1, 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 потеря экспрессии рецептора эстрогена.

Карцинома молочной железы может представлять собой клетки

опухоли, которые демонстрируют уменьшение или потеря экспрессии рецептора прогестерона.

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

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

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

Еще более конкретно карцинома молочной железы может представлять собой клетки опухоли, демонстрирующие либо 1) потеря экспрессии рецептора эстрогена и рецептора прогестерона, 2) потеря экспрессии рецептора эстрогена и потеря экспрессии Her2, 3) потеря экспрессии рецептора прогестерона и потеря экспрессии Her2 или 4) потеря экспрессии рецептора эстрогена, потеря экспрессии рецептора прогестерона и потеря 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-КААG1, 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), p1420-1428; 2009; Fassina et al., *Modern Pathology*, 25; p86-99; 2012; Lee et al., *JCB*; 172; p973-981; 2006). EMT фенотип можно также различить по его повышенной способности к миграции, инвазивности или по устойчивости к апоптозу/аноикозу. 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 KAAG1. Нуждающееся лицо предпочтительно отбирают на основании отсутствия у их опухоли 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. Нуждающееся лицо может быть лицом, у которого не наблюдается ответ на гормональную терапию и/или на лечение транстузумабом (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 KAAG1 нуждающемуся лицу.

В соответствии с настоящим изобретением ингибитор KAAG1 может, таким образом, включать антитело, описанное в данном документе, или его антиген-связывающий фрагмент.

Также в соответствии с настоящим изобретением ингибитор KAAG1 может включать нуклеотидную последовательность, комплементарную последовательности SEQ ID NO.:1 или ее фрагменту. Более конкретно ингибитор KAAG1 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 KAAG1 включает мРНК, которая демонстрирует экспрессию последовательности SEQ ID NO.:1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны связываться с KAAG1 на поверхности клеток опухоли. Такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в KAAG1 в пределах аминокислот с 30 по 84 включительно.

Альтернативно такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты могут связываться с эпитопом, расположенным в KAAG1 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 KAAG1 в пределах аминокислот 50-70.

В дополнительном варианте осуществления данного изобретения антитело или их антиген-связывающий фрагмент может связываться с эпитопом, содержащимся в KAAG1 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 KAAG1 в пределах аминокислот 54-65.

Подходящие антитела для терапевтического лечения включают, например, те, которые выступают посредниками в атитело-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 КААГ1 нуждающемуся в этом лицу. Такой ингибитор КААГ1 включает, например, антитело или его антиген-связывающий фрагмент, которые специфично связываются с КААГ1.

Скорее всего, наиболее сильнодействующими антителами или антиген-связывающими фрагментами будут те, которые обладают высокой аффинностью к КААГ1. 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 КААГ1.

Подходящие антитела или антиген-связывающие фрагменты включают те, которые способны связываться с КААГ1 на поверхности клеток опухоли с высокой аффинностью. Такие антитела или их антиген-связывающие фрагменты с высокой аффинностью могут предпочтительно связываться с эпитопом, находящимся в КААГ1 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 аффинностью, являются те антитела, которые могут интернализироваться в клетку или отделы клетки (например, лизомсомы 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 KAAG1, 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 KAAG1, химиотерапевтического или цитотоксического агента. Пример противоракового средства, которое можно вводить с ингибитором KAAG1, может включать, например, доксорубин, таксаны, антиангиогенные средства, соли платины, ингибиторы PARP.

Другие способы лечения, охваченные настоящим изобретением, включают введение других типов ингибиторов KAAG1, таких, как терапевтические средства на антисмысловой основе (миРНК, антисмысловые средства, рибозимы и т.п.).

Антитела и антиген-связывающие фрагменты, которые связываются с KAAG1

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, KAAG1, секретируемой формой KAAG1 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 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 мКААG1 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 антитело-зависимой клеточной цитотоксичности (опухолевых клеток, экспрессирующих), комплимент-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 КААG1. 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 КААG1 или вариантом КААG1. 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 КААG1, или опухолевых клеток, экспрессирующих вариант КААG1 (например, путем механизма, основанного 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:

- а. По меньшей мере два CDR из CDRL1, CDRL2 или CDRL3 и;
- б. 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:

a. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:16, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:18,

b. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:20, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:22,

c. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:24, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:26,

d. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:48, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:46,

e. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:103, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:126,

f. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в

SEQ ID NO.:104, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:127,

г. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:105, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:128,

h. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:106, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:145,

i. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:107, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:129,

ж. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:108, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:130,

к. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:109, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:141,

1. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:110, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:131,

м. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:111, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:134,

п. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:112, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:135,

о. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:113, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:136,

р. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:114, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:133,

q. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:115, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:140,

г. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в

SEQ ID NO.:116, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:137,

с. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:117, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:144,

т. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:118, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:139,

у. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:119, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:132,

в. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:120, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:142,

w. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:121, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:138,

х. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:122, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:146,

у. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:123, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:153,

z. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:124, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:143,

аа. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:189, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:194,

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

сс. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:189, и/или 3CDRs переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:196,

dd. 3CDRs переменного участка легкой цепи, описанного в

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

ее. 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 КАAG1, и который может содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

а. 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),

б. варибельного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID

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

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

д. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:48, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:46,

е. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:103, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:126,

ф. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:104, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:127,

г. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:105, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:128,

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

и. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:107, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:129,

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

к. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:109, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:141,

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

м. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:111, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в

SEQ ID NO.:134,

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

о. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:113, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:140,

р. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:114, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:133,

q. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:115, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:140,

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

s. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:117, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:144,

t. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:118, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:139,

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

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

в. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:121, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:138,

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

у. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:123, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в

SEQ ID NO.:147;

z. переменного участка легкой цепи, описанного в SEQ ID NO.:124, и/или переменного участка тяжелой цепи, описанного в SEQ ID NO.:144;

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

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

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

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

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

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

Каркасный участок тяжелой и/или легкой цепей, описанных в данном документе, могут быть получены от одного или нескольких каркасных участков, проиллюстрированных в антителах, описанных в данном документе. Антитело или антиген-связывающие фрагменты могут, таким образом, содержать один или несколько CDRs, описанных в данном документе (например, выбранных из специфических 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.

Таблица 1 относится к полным последовательностям легкой и тяжелой цепи некоторых из антител к KAAG1, 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	Легкая (Lh1)		199
Гуманизированное 3A4	Легкая (Lh2)		200
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh1)		202
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh2)		203
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh3)		204
Гуманизированное 3A4	Тяжелая (Hh4)		205

Исследования по картированию эпитопов выявили, что антитело 3D3 взаимодействует с эпитопом KAAG1 на протяжении аминокислот 36-60, включительно. Антитела 3G10 и 3A4

взаимодействуют с эпитопом KAAG1 на протяжении аминокислот 61-84, включительно, и антитело 3C4 взаимодействуют с эпитопом KAAG1 на протяжении аминокислот 1-35. Несмотря на то что 3G10 и 3A4 связывают похожие участки, антитело 3G10 не связывается с KAAG1 столь же эффективно, как антитело 3A4.

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

Последовательности переменных участков легкой и тяжелой цепей выбранных антител, связывающихся с KAAG1, раскрыты в Таблице 2.

Таблица 2

Обозначение антитела	Тип переменного 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 переменным участкам легкой цепи и тяжелой цепи других антител, для которых было показано, что они связываются с КААГ1.

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

Таблица 3

Обозначение антитела	Тип цепи	CDR	SEQ ID NO.:	а.а. последовательность
3D3	Легкая (L)	CDR L1	27	KSSQSLNNSNFQKNFLA
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	MGYSDY

3G10	Легкая	CDR L1	33	RSSQSLHLSNGNTYLE
3G10	Легкая	CDR L2	34	KVSNRFS
3G10	Легкая	CDR L3	35	FQGS HVPLT
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	WQGT HFPRT
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	RSSKSLHLSNGN 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	MGYSDY
3A4	Легкая	CDR L1	52	RSSQSLHLSNGNTYLE
3A4	Легкая	CDR L2	53	TVSNRFS
3A4	Легкая	CDR L3	54	FQGS HVPLT
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 вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты представляют собой те, которые имеют вариацию в аминокислотной последовательности. Например, включенные вариантные антитела 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), переменный участок вариантной легкой цепи, переменный 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), переменный участок вариантной легкой цепи, переменный участок вариантной тяжелой цепи, вариантную легкую цепь, вариантную тяжелую цепь, вариантное антитело, вариантный антиген-связывающий фрагмент и вариант KAAG1.

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 таблице 1А под заголовком "предпочтительные замены". Если результат такой замены придает нежелательное свойство, то могут быть произведены более существенные изменения, обозначенные как "иллюстративные замены" в Таблице 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 Таблице 1А. Если результат такой замены дает нежелательное изменение, то вводят другой тип замен, обозначенных как "иллюстративные замены" в Таблице 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 переменными 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 последовательности 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 таблицу 1B, 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

[illegible]

Настоящее изобретение охватывает CDR, переменные участки легкой цепи, переменные 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 KAAG1, и которые могут содержать последовательности, выбранные из группы, состоящей из:

а. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:16, и переменного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:18,

б. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:20, и переменного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:22;

с. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:24, и переменного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:26;

д. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:48, и переменного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:46;

е. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:103, и переменного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:126,

ф. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:104, и переменного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:127,

г. переменного участка легкой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:105, и

вариабельного участка тяжелой цепи, имеющего по меньшей мере 70% идентичность последовательности с SEQ ID NO.:147, или;

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 вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать CDRs, идентичные с таковыми соответствующего вариабельного участка легкой и/или тяжелой цепи. В другом случае вариантные антитела или антиген-связывающие фрагменты могут содержать вариантные 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 переменный 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 переменный 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 переменного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает переменный 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 переменного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает переменный 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 переменного участка тяжелой цепи вариантного антитела охватывает переменный 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 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.: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 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.: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 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.: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 вариабельный 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 переменные 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 переменные 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 переменные 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 переменные 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 переменные 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 переменные цепи по меньшей мере с двумя консервативными аминокислотными заменами в трех CDRs (по сравнению с исходными CDRs) .

Сравнение аминокислотных последовательностей переменных участков легкой цепи или переменных участков тяжелой цепи антител, демонстрирующих отличные свойства, позволило нам получать консенсусные последовательности с CDRs в пределах переменных 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 переменный 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 переменный 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;

с. 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:

$X_{1a}SSX_{2a}SLLX_{3a}X_{4a}X_{5a}X_{6a}X_{7a}X_{8a}X_{9a}X_{10a}LX_{11a}$ (SEQ ID NO.:72)

где X_{1a} может быть основной аминокислотой;

где X_{2a} может быть основной аминокислотой;

где X_{3a} может быть H, Y или N;

где X_{4a} может быть S, T, N или R;

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

где X_{6a} может быть D, F или N;

где X_{7a} может быть G или Q;

где X_{8a} может быть K, L или N;

где X_{9a} может быть T или N;

где X_{10a} может быть ароматической аминокислотой, и;

где X_{11a} может быть A, N, E или Y.

В иллюстративном варианте осуществления изобретения X_{1a}

может быть К 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 T; X_{7a} представляет собой S; X_{8a} отсутствует; X_{9a} представляет собой N; X_{10a} представляет собой Y или F; X_{11a} представляет собой A.

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

KASQDX_{1b}X_{2b}X_{3b}X_{4b}X_{5b}X_{6b} (SEQ ID NO.:73)

где X_{1b} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{2a} может быть G или H;

где X_{3b} может быть T, N или R;

где X_{4b} может быть F, Y или A;

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

где 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 Y; X_{5b} представляет собой F; X_{6b} представляет собой L или 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:

$\text{FX}_{1c}\text{STX}_{2c}\text{X}_{3c}\text{S}$ (SEQ ID NO.:74)

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

где X_{2c} представляет собой R или T, и;

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

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

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

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRL2 последовательности SEQ ID NO.:74, где X_{1c} представляет собой А; 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:

$\text{X}_{1d}\text{VSX}_{2d}\text{X}_{3d}\text{X}_{4d}\text{S}$ (SEQ ID NO.:75)

где X_{1d} может быть L или K;

где X_{2d} может быть основной аминокислотой;

где X_{3d} может быть L или R и;

где 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:

$\text{X}_{1e}\text{ANRLVX}_{2e}$ (SEQ ID NO.:76)

где X_{1e} может быть основной аминокислотой;

где 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:

$X_{1f}QX_{2f}X_{3f}X_{4f}X_{5f}PLT$ (SEQ ID NO.:77)

где X_{1f} может быть Q или L;

где X_{2f} может быть ароматической аминокислотой;

где X_{3f} может быть D, F или Y;

где X_{4f} может быть E, A, N или S, и;

где 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:

$QQHX_{1g}X_{2g}X_{3g}PLT$ (SEQ ID NO.:78)

где X_{1g} может быть ароматической аминокислотой;

где X_{2g} может быть N или S, и;

где 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:

$X_{1h}QGX_{2h}HX_{3h}PX_{4h}T$ (SEQ ID NO.:79)

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:

$GYX_{1i}FX_{2i}X_{3i}YX_{4i}X_{5i}H$ (SEQ ID NO.:80)

где X_{1i} может быть T, I или K;

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

где X_{3i} может быть кислой аминокислотой;

где X_{4i} может быть E, N или D, и;

где 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:

$X_{1j}X_{2j}DPX_{3j}TGX_{4j}TX_{5j}$ (SEQ ID NO.:81)

Где X_{1j} может быть V или G

где X_{2j} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{3j} может быть A, G или E;

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

где 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:

$VX_{1k}DPX_{2k}TGX_{3k}TA$ (SEQ ID NO.:82)

где X_{1k} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{2k} может быть A, E или G;

где 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:

$YIX_{11}X_{21}X_{31}GX_{41}X_{51}X_{61}$ (SEQ ID NO.:83)

где X_{11} может быть S или N;

где X_{21} может быть ароматической аминокислотой

где X_{31} может быть D, E или N;

где X_{41} может быть D или H.

где X_{51} может быть Y, S или N;

где 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:

$X_{1m}INPYNX_{2m}VTE$ (SEQ ID NO.:84)

где X_{1m} может быть N или Y, и;

где 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:

DINPX_{1n}YGX_{2n}X_{3n}T (SEQ ID NO.:85)

где X_{1n} может быть N или Y,

где X_{2n} может быть G или T и;

где 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:

MX_{1o}X_{2o}X_{3o}DY (SEQ ID NO.:86)

где X_{1o} может быть G или S;

где X_{2o} может быть Y или H, и;

где X_{3o} может быть A или S.

Другие конкретные варианты осуществления изобретения включают CDRH3 последовательности SEQ ID NO.:86, где X_{1o} представляет собой G; X_{2o} представляет собой Y, или X_{3o} представляет собой S.

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

IX_{1p}YAX_{2p}DY (SEQ ID NO.:87)

где X_{1p} может быть G или S и;

где 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:

AX_{1q}X_{2q}GLRX_{3q} (SEQ ID NO.:88)

где X_{1q} может быть R или W;

где X_{2q} может быть ароматической аминокислотой и;

где 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 KAAG1 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 переменном каркасном участке легкой цепи и вплоть до 23 аминокислотных замен (от одной до двадцати трех) в переменном каркасном участке тяжелой цепи, отличающих их от моноклонального антитела 3A4. Заявитель показал, что эти гуманизированные антитела 3A4 связываются с KAAG1 столь же эффективно, как и моноклональное антитело 3A4.

Иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела

или антиген-связывающих фрагментов включают такие, которые имеют переменный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO:186:

SEQ ID NO.:186

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPXLLINTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHPVPLTFGXGTXLEXK, 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 переменный участок легкой цепи, который приведен в SEQ ID NO:187:

SEQ ID NO.:187

DX_{e1}VMTQTPLSLX_{e2}VX_{e3}X_{e4}GX_{e5}X_{e6}ASISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPX_{e7}LLINTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{e8}GVYYCFQGSHPVPLTFGX_{e9}GTX_{e10}LEX_{e11}K,

где X_{e1} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{e2} может быть A или R;

где X_{e3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

где X_{e4} может быть L или R;

где X_{e5} может быть кислой аминокислотой;

где X_{e6} может быть Q или R;

где X_{e7} может быть основной аминокислотой;

где X_{e8} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{e9} может быть A или Q;

где X_{e10} может быть основной аминокислотой; или

где 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}VMQTPLSLX_{E2}VX_{E3}X_{E4}GX_{E5}X_{E6}ASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{E7}LLIHTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{E8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{E9}GTX_{E10}LEX_{E11}K

где X_{E1} может быть V или I

где X_{E2} может быть A или R

где X_{E3} может быть S или T

где X_{E4} может быть L или P

где X_{E5} может быть D или E

где X_{E6} может быть Q или R

где X_{E7} может быть K или Q

где X_{E8} может быть L или V

где X_{E9} может быть A или Q

где X_{E10} может быть R или K или

где 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

DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

SEQ ID NO.:190

DVVMQTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK.

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

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDT
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. 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 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_{f10}LEWX_{f11}GDINPYNGDTNYNQKFKGX_{f12}X_{f13}X_b_{f14}X_{f15}TX_{f16}DX_{f17}SX_{f18}STAYMX_{f19}LX_{f20}SLX_{f21}SEDX_{f22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXT_{f23}TVTVSS,

где X_{f1} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_b_{f2} может быть Р или А;

где X_{f3} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{f4} может быть V или K;

где X_{f5} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{f6} может быть основной аминокислотой;

где X_{f7} может быть S или A;

где X_{f8} может быть H или R;

где X_{f9} может быть основной аминокислотой;

где X_{f10} может быть S или G;

где X_{f11} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{f12} может быть основной аминокислотой;

где X_{f13} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{f14} может быть I или T;

где X_{f15} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{f16} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{f17} может быть K или T;

где X_{f18} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

где X_{f19} может быть Q или E;

где X_{f20} может быть N или S;

где X_{f21} может быть T или R;

где X_{f22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

или

где 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 переменный 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_{F21}SEDX_{F22}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXX_{F23}VTVSS

где X_{F1} может быть I или V;

где X_{F2} может быть P или A;

где X_{F3} может быть M или V;

где X_{F4} может быть V или K;

где X_{F5} может быть M или V;

где X_{F6} может быть K или R;

где X_{F7} может быть S или A;

где X_{F8} может быть H или R;

где X_{F9} может быть K или Q;

где X_{F10} может быть S или G;

где X_{F11} может быть I или M;

где X_{F12} может быть K или R;

где X_{F13} может быть A или V;

где X_{F14} может быть I или T;

где X_{F15} может быть L или I,

где X_{F16} может быть V или A;

где X_{F17} может быть K или T;

где X_{F18} может быть S или T;

где X_{F19} может быть Q или E;

где X_{F20} может быть N или S;

где X_{F21} может быть T или R;

где X_{F22} может быть S или T; или

где 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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

SEQ ID NO.:195

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

SEQ ID NO.:196

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

SEQ ID NO.:197

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

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

DIVMTQSPXSLAVSXGXXXTXNCKSSQSLNSNFQKNFLAWYQQKPGQXPKLLIYFAS
TRESSXPDRFXGSGSGTDFTLTISSXQAEDXAXYXCQQHYSTPLTFGXGTKLEXK (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}NCKSSQSLNSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{A7}
PKLLIYFASTRESSX_{A8}PDRFX_{A9}GSGSGTDFTLTISX_{A10}QAEDX_{A11}AX_{A12}YX_{A13}CQQHYSTP
LTFGX_{A14}GTKLEX_{A15}K (SEQ ID NO.:175);

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

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

где X_{A3} может быть, например, E или Q;

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

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

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

где X_{A7} может быть, например, P или S;

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

где X_{A9} может быть, например, S или I;

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

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

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

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

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

где 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}NCKSSQSLNNSNFQKNFLAWYQQKPGQX_{a7}
PKLLIYFASTRESSX_{a8}PDRFX_{a9}GSGSGTDFTLTISX_{a10}QAEDX_{a11}AX_{a12}YX_{a13}CQQHYSTP
LTFGX_{a14}GTKLEX_{a15}K (SEQ ID NO.:176);

где X_{a1} может быть, например, D или S;
где X_{a2} может быть, например, L или I;
где X_{a3} может быть, например, E или Q;
где X_{a4} может быть, например, R или K;
где X_{a5} может быть, например, A или V;
где X_{a6} может быть, например, I или M;
где X_{a7} может быть, например, P или S;
где X_{a8} может быть, например, V или I;
где X_{a9} может быть, например, S или I;
где X_{a10} может быть, например, L или V;
где X_{a11} может быть, например, V или L;
где X_{a12} может быть, например, V или D;
где X_{a13} может быть, например, Y или F;
где X_{a14} может быть, например, Q или A и;
где X_{a15} может быть, например, I или L.

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

EVQLXQ₁Q₂SAE₃XXXPGASV₄XXSCKASGYIF₅TDYEI₆HWVX₇QXPXXGLEW₈XGVIDPETGNT
AFN₉QKFKGX₁₀TX₁₁TAD₁₂XSX₁₃STAYMELSSL₁₄TSED₁₅XAVYYCMGYSDYWGQGTXX₁₆TVSS (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 переменный участок тяжелой цепи формулы:

EVQLX_{B1}Q_{B2}SAE_{B3}X_{B4}X_{B5}PGASV_{B6}X_{B7}SCKASGYIF_{B8}TDYEI_{B9}HWVX_{B10}QX_{B11}PX_{B12}X_{B13}
1GLEW_{B14}XGVIDPETGNTAFN_{B15}QKFKGX_{B16}X_{B17}TX_{B18}TAD_{B19}XSX_{B20}STAYMELSSL_{B21}TSED_{B22}X_{B23}
AVYYCMGYSDYWGQGTXX_{B24}X_{B25}TVSS (SEQ ID NO.:178),

где X_{B1} может быть, например, V или Q;
где X_{B2} может быть, например, G или V;

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

где X_{B4} может быть, например, K или V;

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

где X_{B6} может быть, например, K или T;

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

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

где X_{B9} может быть, например, A или T;

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

где X_{B11} может быть, например, Q или N;

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

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

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

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

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

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

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

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

где 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 переменный участок тяжелой цепи формулы:

EVQLX_{B1}Q_{B2}ASX_{B3}AE_{B4}X_{B5}PGASVX_{B6}X_{B7}SCKASGYIF_{B8}FTDYEIHWVX_{B9}QX_{B10}PX_{B11}
 1GLEWX_{B12}GVIDPETGNTAFNQKFKGX_{B13}X_{B14}TX_{B15}TADX_{B16}SX_{B17}STAYMELSSLTSED_{B18}
 AVYYCMGYSDYWGQGT_{B19}X_{B20}TVSS (SEQ ID NO.:179);

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

где X_{b2} может быть, например, G или V;
 где X_{b3} может быть, например, V или L;
 где X_{b4} может быть, например, K или V;
 где X_{b5} может быть, например, K или R;
 где X_{b6} может быть, например, K или T;
 где X_{b7} может быть, например, V или L;
 где X_{b8} может быть, например, R или K;
 где X_{b9} может быть, например, A или T;
 где X_{b10} может быть, например, G или V;
 где X_{b11} может быть, например, Q или N;
 где X_{b12} может быть, например, M или I;
 где X_{b13} может быть, например, R или K;
 где X_{b14} может быть, например, V или A;
 где X_{b15} может быть, например, I или L;
 где X_{b16} может быть, например, T или I;
 где X_{b17} может быть, например, T или S;
 где X_{b18} может быть, например, T или S;
 где X_{b19} может быть, например, L или T;
 где X_{b20} может быть, например, V или L.

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

DIVMXQSPSSXXASXGXRVTTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKXPKTLIFRANRLVDGV
 PSRFGSGSGXDYXLTISLXXEDXXXYSCLQYDEIPLTFGXGTKLEXX (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 переменный участок легкой цепи формулы:

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLIFR
 ANRLVDGVPSRFGSGSGX_{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 – Т или S;

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

где X_{c3} может быть, например, S или Y;

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

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

где X_{c6} может быть, например, A или S;

где X_{c7} может быть, например, T или Q;

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

где X_{c9} может быть, например, Q или E;

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

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

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

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

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

где X_{c15} может быть, например, гидрофобной аминокислотой или более конкретно – I или L, и; где 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 переменный участок легкой цепи формулы:

DIVMX_{c1}QSPSSX_{c2}X_{c3}ASX_{c4}GX_{c5}RVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKX_{c6}PKTLIFR
ANRLVDGVPSRFGSGSGX_{c7}DYX_{c8}LTISLX_{c9}X_{c10}EDX_{c11}X_{c12}X_{c13}YSCLQYDEIPLTFGX_{c14}
4GTKLEX_{c15}X_{c16} (SEQ ID NO.:182);

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

где X_{c2} может быть, например, L или M;

где X_{c3} может быть, например, S или Y;

где X_{c4} может быть, например, V или L;

где X_{c5} может быть, например, D или E;

где X_{c6} может быть, например, A или S;

где X_{c7} может быть, например, T или Q;

где X_{c8} может быть, например, T или S;

где X_{c9} может быть, например, Q или E;

где X_{c10} может быть, например, Р или F;

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

где X_{c12} может быть, например, А или G;

где X_{c13} может быть, например, Т или I;

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

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

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

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

EVQLQESGPX₁LVKPSQX₂LSLTCTVXGFSITSGYGWHWIRQXPGXXLEWXYINVDGHN
DYNPSLKSRRXIXQDTSKNQFXLXLXSVTXDXDTAXYYCASSYDGLFAYWGQGTLVTVSX

(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 гуманизированное антитело 3C4 может содержать переменный участок тяжелой цепи формулы:

EVQLQESGPX_{D1}LVKPSQX_{D2}LSLTCTVX_{D3}GFSITSGYGWHWIRQX_{D4}PGX_{D5}X_{D6}LEWX_{D7}
GYINVDGHNVDYNPSLKSRRX_{D8}X_{D9}IX_{D10}QDTSKNQFX_{D11}LX_{D12}LX_{D13}SVTX_{D14}X_{D15}DTAX_{D16}YY
CASSYDGLFAYWGQGTLVTVSX_{D17} (SEQ ID NO.:184);

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

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

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

где X_{D4} может быть, например, H или F;

где X_{D5} может быть, например, K или N;

где X_{D6} может быть, например, G или K;

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

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

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

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

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

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

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

где X_{D14} может быть, например, А или Т;

где X_{D15} может быть, например, А или Е;

где X_{D16} может быть, например, V или Т и;

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

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

EVQLQESGPX_{d1}LVKPSQX_{d2}LSLTCTVX_{d3}GFSITSGYGWHWIRQX_{d4}PGX_{d5}X_{d6}LEWX_{d7}
GYINYDGHNDYNPSLKSRLX_{d8}X_{d9}IX_{d10}QDTSKNQFX_{d11}LX_{d12}LX_{d13}SVTX_{d14}X_{d15}DTAX_{d16}YY
CASSYDGLFAYWGQGLTVTVSX_{d17} (SEQ ID NO.:185);

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

где X_{d2} может быть, например, Т или S;

где X_{d3} может быть, например, S или Т;

где X_{d4} может быть, например, Н или F;

где X_{d5} может быть, например, К или N;

где X_{d6} может быть, например, G или К;

где X_{d7} может быть, например, I или M;

где X_{d8} может быть, например, V или I;

где X_{d9} может быть, например, Т или S;

где X_{d10} может быть, например, S или Т;

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

где X_{d12} может быть, например, К или Q;

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

где X_{d14} может быть, например, А или Т;

где X_{d15} может быть, например, А или Е;

где X_{d16} может быть, например, V или Т и;

где 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 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 переменный участок легкой цепи, по меньшей мере на 70% идентичный последовательности SEQ ID NO.:48, и/или переменный 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 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; 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 переменном 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 переменном 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 аминокислотных замен может находиться, например, в переменном участке легкой цепи.

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

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент может, таким образом, иметь переменный 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 переменный 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 переменный участок легкой цепи, содержащий вплоть до двадцати пяти аминокислотных замен по сравнению с последовательностью SEQ ID NO.:48, и может иметь переменный 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 переменных участка в легкой цепи, то каждый из переменных 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 переменных 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 гуманизованное антитело или антиген-связывающий фрагмент данного изобретения может также иметь переменный участок легкой цепи и/или переменный 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 амино- или карбокси-конце переменного участка легкой цепи и/или переменного участка тяжелой цепи.

Другой иллюстративный вариант осуществления гуманизованного антитела или антиген-связывающего фрагмента данного изобретения включает, например, антитело или антиген-связывающий фрагмент, имеющий переменный 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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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 содержит (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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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, переменный 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:

a) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:186, и переменный 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;

b) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:187, и переменный 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;

c) переменный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:188, и переменный 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;

d) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:189, и переменный 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) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:190, и переменный 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 переменный участок легкой цепи может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:189 или 190, и переменный 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 переменный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:189, и переменный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:194.

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

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

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

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

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения переменный участок легкой

цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:190, и переменный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:195.

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

В соответствии с еще более конкретным вариантом осуществления данного изобретения переменный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:190, и переменный 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 переменный 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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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, вариабельный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO.:168.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содержит (или дополнительно содержит), например, вариабельный 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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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, содержащая 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, переменный участок легкой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO.:172.

Гуманизированное антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения содержит (или дополнительно содержит), например, переменный 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 из по меньшей мере 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 из по меньшей мере 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, переменный участок тяжелой цепи, приведенный в последовательности SEQ ID NO.:173.

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

а) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:180, и переменный 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) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:181, и переменный 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) переменный участок легкой цепи, который может содержать аминокислоты по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:182, и переменный 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;

г) переменный участок легкой цепи, который может содержать по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:172, и переменный 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 переменный участок легкой цепи может иметь по меньшей мере 90 последовательных аминокислот последовательности SEQ ID NO.:172, и переменный 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 переменный участок легкой цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:172, и переменный участок тяжелой цепи может быть приведен в SEQ ID NO.:173.

Антитело или антиген-связывающий фрагмент настоящего изобретения может иметь переменный участок легкой цепи и/или переменный 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 КААГ1, 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 КААГ1 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 КААГ1 можно получать при помощи способов рекомбинантной ДНК.

Для экспрессии антител к КААГ1 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 полипептид, 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 моноклональных 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 KAAG1, 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-мус, 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, варьируемыми участками, CDR и т.д.), описанным в данном документе.

Специалисты в данной области техники 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 KAAG1 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, доксорубицин 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 фрагмент.

Фармацевтические композиции антител и их применение

Также настоящим изобретением охватываются фармацевтические композиции антител к KAAG1 или антиген-связывающих фрагментов (конъюгированных или нет). Фармацевтическая композиция может содержать антитело к KAAG1 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, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), вещества-наполнители или модификаторы концентрации (например, лактоза, маннит), ковалентное присоединение полимеров, как, например, полиэтиленгликоля с белком, комплексообразование 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, поллоксамерами или поллоксаминами). 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, трансмукозально, 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 М 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 KAAG1, 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 KAAG1 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 KAAG1 или их фрагменты могут взаимодействовать с раковыми клетками, экспрессирующими KAAG1, и вызывать иммунную реакцию, выступая посредником в АЗКЦ. В других случаях антитела и фрагменты к KAAG1 могут блокировать взаимодействие KAAG1 с его белковыми партнерами.

В конкретных случаях, антитела к KAAG1 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 KAAG1 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 KAAG1, 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 KAAG1, 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 KAAG1 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 KAAG1 или вариант KAAG1.

Настоящее изобретение также охватывает способ выявления рака или определения клеток, экспрессирующих KAAG1, 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 KAAG1 или вариант KAAG1, 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 KAAG1 или вариант KAAG1. Иллюстративные варианты осуществления антител или антиген-связывающих фрагментов, применяемых в способах обнаружения, являются такими, которые могут связываться с внеклеточным участком KAAG1.

Другими иллюстративными вариантами осуществления антител или антиген-связывающего фрагмента, применяемого в способах обнаружения, являются те, которые связываются с KAAG1 или вариантом KAAG1, 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 KAAG1 (SEQ ID NO:2), варианта KAAG1, имеющего по меньшей мере 80% идентичность последовательности с последовательностью SEQ ID NO:2, или секретированной формы или циркулирующей формы KAAG1 или варианта KAAG1, при этом способ может включать приведение в контакт клетки, экспрессирующей KAAG1 или вариант KAAG1, или образца (биопсии, сыворотки, плазмы, мочи и т.д.), содержащего или с подозрением на содержание KAAG1 или варианта KAAG1, 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 секретированную 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-антитело) 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, переменные участки легкой цепи, переменные участки тяжелой цепи, легкие цепи, тяжелые цепи.

Настоящее изобретение, таким образом, в дополнительном аспекте относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи антитела, которое способно специфически связываться с KAAG1.

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 KAAG1 или вариант KAAG1.

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 снижение распространения опухолевых клеток, экспрессирующих KAAG1 или вариант KAAG1.

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 KAAG1 или вариант KAAG1.

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

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. 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. 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;
- с. 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 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 антитела с по меньшей мере 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 отдельных 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 вариабельный участок легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельный 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 этой плазмиды экспрессии, называемой pTTVK1, показана в SEQ ID NO.:59. Основываясь на последовательностях, раскрытых в Таблице 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 всей 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 рTTVK1 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 рTTVK1. Специалисты в данной области техники легко поймут, что способ, используемый для конструирования плазмиды экспрессии легкой цепи применим к антителам к KAAG1, содержащимся в исходной библиотеке Fab.

Вектор экспрессии тяжелой цепи - вектор экспрессии, который давал тяжелую цепь иммуноглобулина 3A4, конструировали аналогичным образом, как и описанную выше рTTVK1, для получения легких цепей иммуноглобулинов. Плазмиду рYD11 (Durocher et al., 2002), которая содержит последовательность сигнального пептида IgGK человека, а также участки CH2 и CH3 Fc-домена человека IgG1, модифицировали 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 вариабельный участок тяжелой цепи лигирован в вектор, то полученная плазида кодирует полную тяжелую цепь иммуноглобулина IgG1 с константными участками человека. Основываясь на последовательностях, раскрытых в Таблице 2, были разработаны праймеры ПЦР, специфичные для вариабельного 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 вариабельных 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 вариабельного 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 вариабельные 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 KAAG1, содержащимся в исходной библиотеке Fab.

Экспрессия химерного IgG1 человека в клетках 293E - Полученные как описано выше векторы экспрессии, которые кодировали легкой 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 КАAG1 связываться с рекомбинантной Fc-КАAG1 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 мышино-го 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 Lvhl и Hvh1, соответственно (SEQ ID NO:189 и 194). Также были сконструированы дополнительные гуманизированные последовательности, в которых несколько остатков из мышинных 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 Lvhl2, 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 Nh1 (SEQ ID NO:202), Nh2 (SEQ ID NO:203), Nh3 (SEQ ID NO:204) и Nh4 (SEQ ID NO:205). Две гуманизированные легкие цепи и 4 гуманизированные тяжелые цепи можно собрать в 8 гуманизированных антител (Lh1Nh1, Lh1Nh2, Lh1Nh3, Lh1Nh4, Lh2Nh1, Lh2Nh2, Lh2Nh3 и Lh2Nh4).

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 Nvh2 (SEQ ID NO:195) тяжелой цепи 3A4 сохранялись каркасные остатки Ile-H2 и Lys-L73 из мышиной 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 мышиных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Nvh3 (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 мышиной последовательности, поскольку все эти дополнительные мышиные остатки являются погруженными остатками и входят в верньерную зону, поддерживающую CDR-H2, и кроме того, мышиный остаток H71 может встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности Nvh4 (SEQ ID NO:197) тяжелой цепи 3A4 включили все 6 возвратных мутаций гуманизированного варианта Nvh3 плюс два дополнительных мышиных 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 Таблице 1. Выравнивание переменных участков мышинных и гуманизированных легких цепей показано на Фигуре 1a, а выравнивание переменных участков мышинных и гуманизированных тяжелых цепей показано на Фигуре 1b.

На Фигурах 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. Данная фигура 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 XPR36 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, 2, 3 и 4 гуманизированной тяжелой цепи 3A4

Фрагменты, кодирующие гуманизированный участок тяжелой цепи антитела 3A4 (Nh1, Nh2, Nh3 и Nh4), заказали у GenScript (Пискатавэй, США). ДНК-фрагменты, включающие последовательности "козак" и стоп-кодона, 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 фигуре 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-кодона, 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 фигуре 3b изображена карта плазмиды rMPG-CR5-3A4-LC-variant1. Все варианты тяжелой 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 минут, 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 часов 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 день. 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 минут 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 час при силе тока 275 мА. Мембрану блокировали в течение 1 часа в 0,15% Tween 20, 5% обезжиренного молока в PBS и инкубировали в течение 1 часа 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 Фигуре 4, все комбинации вариантов гуманизированного антитела 3A4 экспрессировались в клетках CHO.

Пример 4

Кинетический анализ мышиного и гуманизированного антитела 3A4

Приобретенные материалы

GLM сенсорные чипы, набор для связывания amino-конца Biorad ProteOn (EDC, NHS и этаноламин) и буферы с 10 mM ацетатом натрия приобрели у Bio-Rad Laboratories (Миссиссога, Онтарио). Буфер HEPES, EDTA и NaCl приобретены у Sigma-Aldrich

(Оаквилль, Онтарио). Десятипроцентный 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 KAAG1 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 KAAG1 в каждой фракции определяли по ОП₂₈₀ с помощью коэффициента удлинения 5500 и МВ, равного 8969. На Фигуре 5 представлен профиль гель-фильтрации KAAG1. 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 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA и 0,05% Tween 20, pH 7,4) при температуре 25°C. Поверхность для захвата мышиного 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 mM NaOAc, pH 4,5, со скоростью потока 25 мкл/мин до тех пор, пока не иммобилизировалось 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 KAAG1 проходил в два этапа, непрямой захват вариантов 3A4 из клеточного супернатанта на поверхность, специфическую к Fc-фрагменту IgG человека, в направлении подачи лиганда (вертикальное) с последующим введением KAAG1 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 KAAG1. Для типичного скрининга в отдельные каналы для анализируемого вещества одновременно вводили пять концентраций KAAG1 (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 s⁻¹/ k_a М⁻¹s⁻¹).

Определение констант скорости и аффинности

На фигуре 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 KAAG1 с очищенным мышиным 3A4, мышиным 3A4, которое временно экспрессировалось в качестве химерного, и временно экспрессируемыми гуманизированными вариантами. Эти константы графически представлены на фигуре 7а-с. Константы скорости ассоциации очень сходны с чистыми исходными, химерными и гуманизированными вариантами 3A4 (фигура 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 KAAG1 с антителом (фигура 7b). Тем не менее, все гуманизированные варианты похоже имели слегка измененную скорость диссоциации, т.е. более высокую скорость диссоциации (фигура 7b). Это отражено в константах аффинности (фигура 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 KAAG1 является субнанолярной, 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 KAAG1.

Пример 5

Связывание гуманизированных вариантов 3A4 с KAAG1 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 часа 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 Abs₄₅₀. Как показано на фигуре 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 Фигуре 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 наличие 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 мг/мл, 0,3 мг/мл, либо 0,3 мг/мл антител в течение 1 часа. После трех этапов промывания клетки инкубировали с вторичным антителом, антителом к IgG человека, конъюгированным с FITC, в течение 1 часа на льду. Флуоресценцию на клеточной поверхности измеряли в проточном цитометре, и значения показаны в гистограмме на Фигуре 9. Как показано, все варианты могли обнаруживать KAAG1 на поверхности непрмеабилизированных клеток, и 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 мышинной цепи (фигура 9, см. Lh1Nh4 и Lh2Nh4) взаимодействовали с KAAG1 на поверхности клеток с наивысшей активностью. Фактически, Lh1Nh4 и Lh2hh4, по-видимому, демонстрировали слегка улучшенное связывание на клеточной поверхности с KAAG1 по сравнению с мышинным антителом 3A4 (LcHc).

Пример 7

Этот пример описывает применение антител к KAAG1 для обнаружения экспрессии KAAG1 при ТНРМЖ.

В качестве средства определения возможного присутствия антигена KAAG1 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 KAAG1) добавляли в течение 1 ч при комнатной температуре. Реакционноспособный по отношению к KAAG1 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 течении менее 5 мин, а затем контрастировали гематоксилином. Белок KAAG1, как оказалось, экспрессировался на очень высоком уровне в абсолютном большинстве образцов опухолей молочной железы. Характерные чипы, содержащие образцы 139 опухолей, приведены на Фигуре 10. В частности, 15/20 образцов биопсии с подтвержденным ТНРМЖ (Фигура 10, образцы указаны звездочкой) имели сильное окрашивание антителом 3A4 благодаря экспрессии KAAG1. Вместе взятые эти иммуногистохимические исследования иллюстрируют применимость обнаружения KAAG1 в РМЖ, в частности, ТНРМЖ, с помощью моноклональных антител.

Пример 8

Этот пример описывает применение антител к KAAG1 для обнаружения экспрессии KAAG1 в клеточных линиях ТНРМЖ.

Объединенные результаты анализа биоинформатики первичной структуры кДНК, кодирующей KAAG1, биохимических исследования и иммуногистохимического определения белка в эпителиальных клетках указывают на то, что антиген KAAG1 находился на клеточной поверхности. Однако требовалось более прямое свидетельство, чтобы продемонстрировать, что KAAG1 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. Анализы экспрессии RT-PCR с использованием специфических праймеров mRNA KAAG1 ранее показали, что определенные клетки РМЖ экспрессировали mRNA KAAG1 (см. PCT/CA2007/001134). Поэтому некоторые из этих клеточных линий были выбраны для определения наличия антигена KAAG1 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

KAAG1, используя антитело 3A4 к KAAG1. 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 293-6Е, которая демонстрирует неопределяемый уровень экспрессии антигена KAAG1. Для целей анализа методом проточной цитометрии (FCM) клетки собирали, используя 5 мМ EDTA, подсчитывали с помощью гемоцитометра и повторно суспендировали в FCM-буфере (0,5% BSA, 10 мкг/мл козьей сыворотки в 1х PBS) с плотностью клеток 2×10^6 клеток/мл. Химерные антитела 3A4 к KAAG1 или контрольные IgG добавляли к 100 мкл клеток до конечной концентрации, равной 0,5 мкг/мл, и инкубировали на льду в течение 1 часов. 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 минут. 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 Фигуре 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 привело к сигналам флуоресценции, сходными 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. Фигуру 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 поточной 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 интернализирован 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°С в течение не более 60 минут. Клетки удаляли в определенные моменты времени

(см. Фигуру 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 минут (см. Фигуру 12, сигнал от поверхности (%), оставшийся от сигнала при 0 мин). Как показано на Фигуре 12, флуоресцентный сигнал быстро уменьшается при инкубации 3A4 с клетками MDA-MB-231 (Фигура 12, черные столбцы, обозначенные как MDA-MB-231 на фигуре) и предположительно достигает максимальной потери сигнала через 30-45 минут. Потерю сигнала сравнивали с потерей, наблюдаемой при инкубации 3A4 с клетками SKOV3 (Фигура 12, серые столбцы). Эти результаты показывают, что комплекс 3A4/KAAG1 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 (Фигура 13) и BT-20 (Фигура 14), что подтверждает интернализацию комплекса 3A4/KAAG1 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 (Фигура 11), потеря сигнала от клеточной поверхности не наблюдалась при инкубации 3A4 с клеточной линией T47D. Это открытие позволяет предположить, что интернализация комплекса 3A4/KAAG1 может происходить до значительно большей степени в клетках ТНРМЖ (Фигура 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 закрепились, добавили свежую

среду, содержащую химерное антитело к KAAG1 3A4 в количестве 10 мкг/мл и инкубировали при 37°C в течение 4 часов. Клетки промывали в PBS, затем фиксировали в 4% параформальдегиде (в PBS) в течение 20 минут. После промывания клетки пермеабелизировали при помощи 0,1% Triton X-100 в PBS в течение 5 минут. Блокировку осуществляли с помощью 1,5% сухого молока в PBS в течение 1 часа. 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 часов. После промывания в PBS добавляли все вместе вторичные антитела в 1,5% молока и инкубировали в течение 1 часа. Для химерных антител к KAAG1 вторичным антителом было антитело осла 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 Фигуре 7, спустя 4 часа 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 Фигуры 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 фигуры 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 фигуры 16). Совместная локализация 3A4, которое связывается с KAAG1 на поверхности раковых клеток, с LAMP1 – маркером поздних эндосом/лизосом, демонстрирует, что комплекс антитело/антиген

интернализировался, 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 ТНPMЖ – BT-20 (см. фигуру 17).

Вместе взятые, эти исследования продемонстрировали, что антитела, специфичные к KAAG1, такие как 3A4, можно применять в качестве конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Таким образом, высокий уровень специфичности к ТНPMЖ у KAAG1 в сочетании с возможностью интернализации данной цели в клетки, способствует разработке применений в качестве ADC.

Пример 10

С целью продемонстрировать эффективность антител к KAAG1 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 антимитотическим средством посредством нерасщепляемого линкера (3A4-ADC2). Цитотоксическое средство может становиться активным после интернализации в клетки.

Способность 3A4 ADCs к обнаружению KAAG1 на поверхности клеток ТНPMЖ 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 ТНPMЖ MDA-231, которые являются KAAG1-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 KAAG1, экспрессированным на поверхности клеток

ТНРМЖ, 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 засеивали 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 нМ 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 базальноподобным 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

GAGGGGCATCAATCACACCGAGAAGTCACAGCCCCCTCAACCACTGAGGTGTGGGGGGG
 TAGGGATCTGCATTTCTTCATATCAACCCACACTATAGGGCACCTAAATGGGTGGGCGGTGG
 GGGAGACCGACTCACTTGAGTTTCTTGAAGGCTTCCTGGCCTCCAGCCACGTAATTGCCCCCG
 CTCTGGATCTGGTCTAGCTTCCGGATTTCGGTGGCCAGTCCGCGGGGTGTAGATGTTCTGACG
 GCCCCAAAGGGTGCCTGAACGCCGCCGGTCACTCCTTCAGGAAGACTTCGAAGCTGGACACC
 TTCTTCTCATGGATGACGACGCGGCGCCCCGCGTAGAAGGGGTCCCCGTTGCGGTACACAAGC
 ACGCTCTTCACGACGGGCTGAGACAGGTGGCTGGACCTGGCGCTGCTGCCGCTCATCTTCCCC
 GCTGGCCGCCGCCCTCAGCTCGCTGCTTCGCGTCGGGAGGCACCTCCGCTGTCCCAGCGGCCTC
 ACCGCACCCAGGGCGCGGGATCGCCTCCTGAAACGAACGAGAACTGACGAATCCACAGGTGA
 AAGAGAAGTAACGGCCGTGCGCCTAGGCGTCCACCCAGAGGAGACACTAGGAGCTTGCAGGAC
 TCGGAGTAGACGCTCAAGTTTTTTCACCGTGGCGTGCACAGCCAATCAGGACCCGCGAGTGC
 CACCACACCAGGTTACCTGCTACGGGCAGAATCAAGGTGGACAGCTTCTGAGCAGGAGCCGG
 AAACGCGCGGGGCCTTCAAACAGGCACGCCTAGTGAGGGCAGGAGAGAGGAGGACGCACACAC
 ACACACACACACAAATATGGTGAAACCCAATTTCTTACATCATATCTGTGCTACCCTTTCCAA
 ACAGCCTA

SEQ ID NO.:2

MDDDAAPRVEGVPPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAAHLPRWPPPQLAASRREAPPLSQ
 RPHRTQGAGSPPETNEKLTPQVKEK

SEQ ID NO.:3

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCA
 CTATGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACTTTCAAAGAAGCTTTTTGGCCT
 GGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCTAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAAT
 CTAGTATCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCA
 GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGT
 TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGC
 CATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
 CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGA
 GTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCA
 AAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGC
 CCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:4

DIVMTQSPSSLAVSIGQKVTMNCKSSQSLNNSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
 TRESSIPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELKAVAAPSVF
 IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL

TLISKADYEHKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNREGC

SEQ ID NO.:5

GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGC
 TGTCTTCAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACACTGGGTGAAGCAGACTC
 CTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCTTCAATC
 AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAC
 TCAGCAGTTTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTATTCTGATTATTGGG
 GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCAGCCTCAACGAAGGGCCCCTCTGTCTTTCCCCTGG
 CCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACT
 TCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGCGGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCC
 CGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCA
 GCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACA
 AGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAAC
 TCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCC
 GGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCA
 ACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACA
 ACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGG
 AGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAG
 CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
 AGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGT
 GGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACG
 GCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCT
 TCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGT
 CTCCCGGGAAA

SEQ ID NO.:6

EVQLQQSVAELVRPGASVTLCKASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNT
 AFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTTLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL
 NGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI
 AVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMHEALHNHYTQKS
 LSLSPGK

SEQ ID NO.:7

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACGCTCCCTGTCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCT
 CCATCTCTTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT

ATTTGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG
GGGTCCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCGGAG
TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTTCTCTCACGTTGC
GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCAT
CTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTG
TCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAG
CAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCG
TCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:8

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSTDFTLKISGVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFGAGTKLELKAVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVCLLNFFYPREKQVQKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT
LSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:9

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
TATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACCTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCC
ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCTCCCGCACAGCCTACATGGAGC
TCCGCGGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATT
ATTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTC
CCCTGGCCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGG
ACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACA
CCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCT
CCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG
TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAATTCCTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCAC
CTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGA
TCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCA
AGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGC
AGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATG
GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCT
CCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGC
TGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCG
TGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACT
CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGA
ACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCT

CCCTGTCTCCCGGAAA

SEQ ID NO.:10

EIQ LQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDN YMNWVKQSHGKSLEWIGDINPYYGTT
TYNQKFKGKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDWFDYWGQGLVTVSAASTKGP
SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD
TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS
DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO.:11

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCA
CTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTTTTTAAACTGGTTCCAGCAGAAACCAG
GAAAATCTCCAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTTGAAGATT
TGGAATTTATTCTTGTCTACAGTATGATGAGATTCCGCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGC
TGAGAGCTGAGAGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTAC
AGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACA
GCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAAC
ACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGT

SEQ ID NO.:12

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELRVAAPS VFI FPPSD
EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKAD
YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:13

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTTAC
TCACCTGCACTGTCACTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGT
TTCCAGGAAACAAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACC
CATCTCTCAAAGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGT
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTAT
TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCTCAACGAAGGGCCCATCTG
TCTTTCCCCTGGCCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGG
TCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCG

TGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCG
 TGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACA
 CCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGCCACCGTGCC
 CAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCC
 TCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTG
 AGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGG
 AGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGC
 TGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAA
 CCATCTCCAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGG
 ATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACA
 TCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGCCTCCCGTGC
 TGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGC
 AGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGA
 GCCTCTCCCTGTCTCCCGGGAAA

SEQ ID NO.:14

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHN
 DYNPSLKSRI SITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGT LVTVSAASTK
 GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS
 VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCEFTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP
 KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
 QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFY
 PSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY
 TQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:15

GACATTGTGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGGCTGTGTCAATAGGACAGAAGGTCA
 CTATGAACTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAAATAGTAACTTTCAAAGAACTTTTGGCCT
 GGTACCAGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCTAAACTTCTGATATACTTTGCATCCACTCGGGAAT
 CTAGTATCCCTGATCGCTTCATAGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTTACCATCAGCA
 GTGTGCAGGCTGAAGACCTGGCAGATTACTTCTGTCAGCAACATTATAGCACTCCGCTCACGT
 TCGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO.:16

DIVMTQSPSSSLAVSIGQKVTMNCSSQSLNLSNFQKNFLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
 TRESSIPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.:17

GAGGTTCACTGCAGCAGTCTGTAGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGC
 TGTCTTCAAGGCTTCGGGCTACATATTTACTGACTATGAGATACACTGGGTGAAGCAGACTC

CTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGGGTTATTGATCCTGAAACTGGTAATACTGCCTTCAATC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAAC
TCAGCAGTTTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTATGGGTATTCTGATTATTGGG
GCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO.:18

EVQLQQSVAELVRPGASVTLSCASGYIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGNT
AFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO.:19

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACGCTCCCTGTCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCT
CCATCTCTTGTAGATCGAGTCAGAGCCTTTTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT
ATTTGCAGAAACCAGGCCAGCCTCCAAAGGTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTG
GGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTCACACTCAAGATCAGCGGAG
TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTTCTCTCACGTTCTG
GTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO.:20

DVLMTQTPRSLSVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQPPKVLIIYKVS
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVIYCFQGS HVPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.:21

GAGATCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGTTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
TATCCTGTAAGGCTTCTGGATACACCTTCACTGACAACCTACATGAACTGGGTGAAGCAGAGCC
ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACTATGGTACTACTACCTACAACC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTGACTGTAGACAAGTCCTCCCGCACAGCCTACATGGAGC
TCCGCGGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGATGACTGGTTTGATT
ATTGGGGCCAAGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO.:22

EIQQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYTFTDNMNVWKQSHGKSLEWIGDINPYYGTT
TYNQKFKGKATLTVDKSSRTAYMELRGLTSEDSAVYYCARDWFDYWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO.:23

GACATCGTTATGTCTCAGTCTCCATCTTCCATGTATGCATCTCTAGGAGAGAGAGTCA
CTATCACTTGCAAGGCGAGTCAGGACATTCATAACTTTTTAAACTGGTTCCAGCAGAAACCAG
GAAAATCTCCAAAGACCCTGATCTTTCGTGCAAACAGATTGGTAGATGGGGTCCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCTGGGCAAGATTATTCTCTCACCATCAGCAGCCTGGAGTTTGAAGATT
TGGGAATTTATTCTTGTCTACAGTATGATGAGATTCCGCTCACGTTCCGTGCTGGGACCAAGC
TGGAGCTGAGA

SEQ ID NO.:24

DIVMSQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKSPKTLIFRANRLVDGV

PSRFSGSGSGQDYSLTISSLEFEDLGIYSCLQYDEIPLTFGAGTKLELR

SEQ ID NO.:25

GAGGTGCAGCTTCAGGAGTCAGGACCTGACCTGGTGAAACCTTCTCAGTCACTTTTCAC
TCACCTGCACTGTCACTGGCTTCTCCATCACCAGTGGTTATGGCTGGCACTGGATCCGGCAGT
TTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAACTACGATGGTCACAATGACTACAACC
CATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCAAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCTGCAGT
TGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTACTGTGCAAGCAGTTACGACGGCTTAT
TTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA

SEQ ID NO.:26

EVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYINYDGHN
DYNPSLKSRIKITQDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGLVTVSA

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

RSSQSLHLSNGNTYLE

SEQ ID NO.:34

KVSNRFS

SEQ ID NO.:35

FQGS HVPLT

SEQ ID NO.:36

GYTFDNYMN

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
вариабельного участка тяжелой цепи 3A4

CAGATCCAGTTGGTGCAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGA
TGTCTGTAAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCC
ATGGAAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAACTACAACC
AGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAGC
TCAACAGCCTGACATCGGAAGACTCAGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGGCTATGG
ACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:46 - полипептидная последовательность
вариабельного участка тяжелой цепи 3A4

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO:47 - нуклеотидная последовательность
вариабельного участка легкой цепи 3A4

GATGTTGTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGGCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCT
CCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGT
ACCTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTTCCAACCGATTTTCTG
GGGTCCCAGACAGATTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAG
TGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTTCG
GTGCTGGGACCAGGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO:48 - полипептидная последовательность
вариабельного участка легкой цепи 3A4

DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSN
RFSGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPLTFGAGTRLELK

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

RSSQSLLSHNGNTYLE

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

GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCCTGTTGAAGC

SEQ ID NO.:57

GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTG
GAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGA
AGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGG
ACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAG
TCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGTTAG

SEQ ID NO.:58

AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ
DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:59

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGG
TGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGA
GGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTT
TGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAATTCA

TGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCCTTGCTGCTCTACCTCCACCATGCCA
AGTGGTCCCAGGCTTGAGACGGAGCTTACAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCC
CGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGG
AGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGA
GCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCT
CGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGGTACCGCGGCCGCTTCGAATGAGA
TCCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAA
TTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCG
GAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGCCGGACGAACATAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCCCT
TCTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGGTTGGTACAACCTGCCAACTGGGCCCTG
TTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAAACACAAAGGGGTCTCTGACTGTAGTTGACATCCT
TATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGAGTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGT
CTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTATGTGTAACCTCTTGGCTGAAGCTCTTACACCAATG
CTGGGGGACATGTACCTCCCAGGGGGCCAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCA
GAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATAAGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTTTATAA
GGCCCCCTTGTTAACCTTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCAG
ACTAACCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTA
GTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGATATCTCCACCCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTTACA
TGGGGTCAGGATTCCACGAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGATCA
AGGAGCGGGCAGTGAACCTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTCATTCTCCTTCGTTTAGCTAA
TAGAATAACTGCTGAGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAG
GTGACGCCCCCAGAATAAAATTTGGACGGGGGGTTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAA
TATAACCCTCACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATC
TTTAACAATAGAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGA
ATTTATGGCTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGT
CCCAGGCAGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGA
GAGTGGACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGG
GCTCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGGCCACTCTTTTTTTTTGAAATTGTGGA
GTGGGGGCACGCGTCAGCCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGTGTA
ATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCCTGCGGTCAAACCACTTGCCACAAAACCACT
AATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGGCGGGCCAAGATAGGGGCGCGATTGCT
GCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGGGTTGTTGGTCCT
CATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGGTAGCATATACTACCC
AAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTA
TATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATAT

CTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTG
GGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGT
AGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATAT
GCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATAGGCT
ATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATC
CTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTA
ATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCTCAGC
ATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTAT
TTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAA
ATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGA
GACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATT
TCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCTTCCTGTTTTTGCTCACCCAGAAA
CGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGG
ATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCA
CTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCG
GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATC
TTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTG
CGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACA
TGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACG
ACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACATTAACCTGGCG
AACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAAGTTGCAG
GACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTG
AGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAG
TTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAG
GTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTG
ATTTAAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGA
CCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAG
GATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAAACCACCGC
TACCAGCGGTGGTTTGTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCT
TCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCA
AGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCA
GTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGC
GGTCGGGCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAAC
TGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACA
GGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACG
CCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGAT

GCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGG
CCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC
GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCGCAGCGAGT
CAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTGGCCGA
TTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAA
TTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTA
TGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACG
CCAAGCTCTAGCTAGAGGTCGACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCATCGCAGATCCGGGC
AACGTTGTTGCATTGCTGCAGGCGCAGAACTGGTAGGTATGGCAGATCTATACATTGAATCAA
TATTGGCAATTAGCCATATTAGTCATTGGTTATATAGCATAAATCAATATTGGCTATTGGCCA
TTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGACCG
CCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCAT
AGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCC
AACGACCCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACT
TTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTG
TATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTAT
GCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTTCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCT
ATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGG
GGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAATCAACGG
GACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGG
TGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCCGCATC
GCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCCAG
TACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGA
GTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAGTCACAGTCGCAAGG
TAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCAGCGGGTGGCGGTGCGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCT
GCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO.:60

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGACATTGTGATGACCCAGTCTCC

SEQ ID NO.:61

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTTTGATGACCCAACTCC

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
GGGGCACAGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGT
GGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGAC
TCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCT
GCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGT

SEQ ID NO.:67

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO.:68

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGG
TGAGTACTCCCTCTCAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAACGA
GGAGGATTTGATATTCACCTGGCCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCACTT
TGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTGCCGCCACCATGGAGACAGACA
CACTCCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCAGGTTCCTACTGGCGGAGACGGAGCTTACG
GGCCCATCTGTCTTTCCCCTGGCCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTG
GGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTG
ACCAGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGC
GTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAG
CCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCCAAATCTTGTGAATTCACTCACACATGC
CCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCCTTCCAAACCC
AAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAC
GAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACA
AAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCAC
CAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC
ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCC
CCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAACTACAAGACCACG
CCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGC
AGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTAC
ACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATA
AAGGAAATTTATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGAC
ATATGGGAGGGCAAATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGCC
GGACGAACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCC

TTCAGTTGGTTGGTACAACCTTGCCAACTGAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAG
TAGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATTCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATG
CTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGATGTAGGTGGGCGGGCCAAGAT
AGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCAC
AGGGTTGTTGGTCCTCATATTCACGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGG
TAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
GGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGC
TATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTAT
CCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCT
AATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAAT
ATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATC
TGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGG
GTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTA
GCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCA
TATGCTATCCTCACGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGGGCC
TCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTCAGGTG
GCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATA
TGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTA
TGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGTTT
TTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCACGAGTGG
GTTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTT
TTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTGTTGACGCCG
GGCAAGAGCAACTCGGTGCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGTTGAGTACTCACCAG
TCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCA
TGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCG
CTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATG
AAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCA
AACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGG
CGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTTATTGCTGATA
AATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGC
CCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGAC
AGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCAT
ATATACTTTAGATTGATTTAAAACCTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTT
TTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCG
TAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAA
CAAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTTC

CGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGT
TAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTAC
CAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTAC
CGGATAAGGCGCAGCGGTCTGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAA
CGACCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAG
GGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGC
TTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCTGGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGC
GTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCT
TTTTACGGTTCCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTG
ATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGA
CCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTTATATTGGCTCATGTCCAATATGAC
CGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTC
ATAGCCCATATATGGAGTTCGCGCTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCCGCTGGCTGACCGC
CCAACGACCCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGA
CTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCCACTTGGCAGTACATCAAG
TGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATT
ATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCG
CTATTACCATGGTGATGCGGTTTTTGGCAGTACACCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA CTCAC
GGGGATTTCCAAGTCTCCACCCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGT TTTGGCACCAAAAATCAAC
GGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCCGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC
GGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCCGCA
TCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGCGGTTGAGGACAAACTCTTCGCGGTCTTTCC
AGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTCCGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGC
GAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAGTCACAGTCGCAA
GGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGCGGCAGCGGGTGGCGGTCTGGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTG
CTGCTGATGATGTAATTAAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO.:69

GGGTTCAGGTTTCCACTGGCGAGGTTAGCTGCAGCAGTCTGT

SEQ ID NO.:70

GGGTTCAGGTTTCCACTGGCGAGGTGCAGCTTCAAGGAGTCAGG

SEQ ID NO.:71

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

SEQ ID NO.: 89: Иллюстративный вариант осуществления CDRL1

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 CDRL1

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 SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHFPRTFAGGTNLEIK

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

SIVMTQTPLTSLVTIGQPASITCKSSQSLLYSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLISLVSK
LD SGVPDGFRTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK

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

DAVMTQIPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLLHSDGKTYLNWLLQRPQGSPKRLIYLVSK
LD SGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPRTFGGGTKLEIK

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

DIVMTQAAPSVPTPGESVSISCRSSKSLLSNGNTYLYWFLQRPQGSPQLLIYRMSN
LASGVPDRFIGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVIYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO.107 - вариабельный участок легкой цепи 3A9

DIVMTQSPSSLAMSLGQKVTMSCKSSQSLLNSNNQLNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRKSGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHFNTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.108 - вариабельный участок легкой цепи 3B1

DIVMTQSPSSLAISVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.109 - вариабельный участок легкой цепи 3G5

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVFFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGSGTKLELK

SEQ ID NO.110 - вариабельный участок легкой цепи 3B2

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.111 - вариабельный участок легкой цепи 3B8

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.112 - вариабельный участок легкой цепи 3G8

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.113 - вариабельный участок легкой цепи 3F7

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.114 - вариабельный участок легкой цепи 3E9

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTEFTLTITSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.115 - вариабельный участок легкой цепи 3C3

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFGS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISGVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.106 - вариабельный участок легкой цепи 3E12

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNRSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSIPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.117 - вариабельный участок легкой цепи 4A2

DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMNCKSSQSLLNNSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLLYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTYFTLTISVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLDLK

SEQ ID NO.118 - вариабельный участок легкой цепи 3F10

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLNNTSNQNLNYLAWYQQKPGQSPKLLVYFAS
TTESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.119 - вариабельный участок легкой цепи 3F4

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLNNTSNQKNYLAWEYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRASGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.120 - вариабельный участок легкой цепи 3B11

DIVMTQSPSSLTMSVGQKVTMSCKSSQSLNNTSNQKNYLAWEYQQKPGQSPKLLVYFAS
TRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.121 - вариабельный участок легкой цепи 3G12

DIVMTQSPKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWYQQKPGQSPELLIYWTSTRHTGV
PDRFSGSGSGTDFTLTISSVQAEDLADYFCQQHYSTPLTFGAGTKLELR

SEQ ID NO.122 - вариабельный участок легкой цепи 3D1

DIKMTQSPSSMYASLGERVTITCKASQDIHTYLNWFQQKPGKSPETLIYRANRLVDGV
PSRFSGSGSGQDYSLTISSEYEDMGIIYYCLQYDEFPLTFGAGTKLELK

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
PSRFSGSGSGLDYSLTISSEYEDMGIIYFCLQYDAFPLTFGAGTKLELK

SEQ ID NO.126 - вариабельный участок тяжелой цепи 3A2

HEIQLOQSGPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTDYNMHWVKQKPGQGLEWIGYINPYNDV
TEYNEKFKGRATLTSDKSSSTAYMDLSSLTSDDSAVYFCWFGRLRWGQGTTLTVST

SEQ ID NO.127 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F6

HEVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYIFTEYNIHWWVKQKPGQGPWIGNINPYNDV
TEYNEKFKGKATLTSDKASSTAYMDLSSLTSEDSAVYYCARWGLRNWQGTTLTVSA

SEQ ID NO.128 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E8

HEVQLQQSVPELVKPGASVKMSCKTSGYTFTTEYNMHWVKQKPGQGPWIGNINPYNV
TEYNEKFKGKATLTSDKSSSTAYLDLSSLTSEDSAVYYCARWGLRNWQGTTLTVSA

SEQ ID NO.129 - вариабельный участок тяжелой цепи 3A9

HQVQVQQPGAELVRPGASVTLSCASGYIFTDYEVHWWVRQRPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTAEEDSAVYYCIGYADYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO.130 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B1

HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGG
TAYNQKFKGKATLTDDKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.131 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B2

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGA
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.132 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F4

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGS
TAYNQKFKGKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.133 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E9

HEVQLQQSGAELVRPGASATLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGS
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYADYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.134 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B8

HEVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQNFTEGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYADYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.135 - вариабельный участок тяжелой цепи 3G8

HQVQLKQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPATGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMEVSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.136 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F7

HQAYLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKGKATLTADKASSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.137 - вариабельный участок тяжелой цепи 3E12

HQVQLQQSEAEVLKPGASVKLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCMGHSYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.138 - вариабельный участок тяжелой цепи 3G12

HEVQLQQSVAELVRPGASVTVSCKASGYIFTDYEIHWVKQTPAHGLEWIGVIDPETGN
TAFNQKFKGKATLTADISSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.139 - вариабельный участок тяжелой цепи 3F10

HEVQLQQSVAELVRPGAPVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGA
TAYNQKFKGKATLTADKSSSAAYMELRSLTSEDSAVYYCMSYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.140 - вариабельный участок тяжелой цепи 3C3

HEVQLQQSVAEVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVIDPETGV
TAYNQRFDRKATLTDDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYFCMGYSDYWGGQTTLTVSS

SEQ ID NO.141 - вариабельный участок тяжелой цепи 3G5

HQVQLQQPGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGVLDPGTGR
TAYNQKFKGKATLSADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCMSYSDYWGPGTTLTVSS

SEQ ID NO.142 - вариабельный участок тяжелой цепи 3B11

HEVQLQQSVAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVRGLEWIGVIDPATGD
TAYNQKFKGKATLTADKSSSAAFMELSSLTSEDSAVYYCMGYSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO.143 - переменный участок тяжелой цепи 3E6

HQVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFSDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGD
TVYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCISYAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO.144 - переменный участок тяжелой цепи 4A2

HQVKLQQSGTELVRPGASVTLSCKASGYKFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIDPETGG
TAYNQKFKGKAILTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCISYAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO.145 - переменный участок тяжелой цепи 3E10

HEVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGDTFTDYMNWVKQSHGKSLEWIGDINPNYGG
ITYNQKFKGKATLTVDTSSTAYMELRGLTSEDSAVYYCQAYYRNSDYWGQGTTLTVSS

SEQ ID NO.146 - переменный участок тяжелой цепи 3D1

HEVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGDKLEWMGYISFNGD
YNYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLSSVTTEDTATYYCASSYDGLFAYWGQGTTLTVSA

SEQ ID NO.147 - переменный участок тяжелой цепи 3C2

HDVQLQESGPDLVKPSQSLSLTCTVTGFSITSGYGWHWIRQFPGNKLEWMGYISFNGD
SNYNPSLKSRIISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDATATYYCASSYDGLFAYWGQGPLTVSA

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

RSSKSLHSHNGN TYLY

SEQ ID NO.:155

RMSNLAS

SEQ ID NO.:156

MQHLEYPTY

SEQ ID NO.:157

GDTFTD YMN

SEQ ID NO.:158

DINPNYGGIT

SEQ ID NO.:159

QAYYRNS DY

SEQ ID NO.:160

KASQDVGTAVA

SEQ ID NO.:161

WTSTRHT

SEQ ID NO.:162

QQHYSIPLT

SEQ ID NO.:163

GYIFTDYEIH

SEQ ID NO.:164

VIDPETGNTA

SEQ ID NO.:165

MGYSDY

SEQ ID NO.:166

MVLQTQVFISLLLWISGAYGDIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNNSNFQKNF
LAWYQQKPGQPPKLLIYFASTRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTP
LTFGQGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYFPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:167

MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYEIHWVRQ
APGQGLEWMGVIDPETGNTAFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCMGYSDY
WGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT
FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL
TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN
VFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:168

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLNNSNFQKNFLAWYQQKPGQPPKLLIYFAS
TRESSVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQHYSTPLTFGQGKLEIK

SEQ ID NO.:169

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTDYEIHWVRQAPGQGLEWMGVIDPETGNT
AFNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCMGYSDYWGQGTLLTVSS

SEQ ID NO.:170

MVLQTQVFISLLWLISGAYGDIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNFLNWFQQ
KPGKAPKTLIFRANRLVDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQG
TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVT
EQDSKDSSTLSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO.:171

MDWTWRILFLVAAATGTHAEVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSITSGYGWHWIR
QHHPGKGLEWIGYINYDGHNDYNPSLKSRTISQDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASSYDG
LFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP
REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS
RDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:172

DIVMTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDIHNFLNWFQQKPGKAPKTLIFRANRLVDGV
PSRFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYSCLQYDEIPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO.:173

EVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSITSGYGWHWIRQHHPGKGLEWIGYINYDGHN
DYNPSLKSRTISQDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASSYDGLFAYWGQGTLLTVS

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

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSN
RFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHPVPLTFGXGTXLEXK

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}VMQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPX
{a7}LLIHTVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX{a8}GVYYCFQGSHPVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K

где X_{a1} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{a2} может быть А или Р;

где X_{a3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

где X_{a4} может быть L или Р;

где X_{a5} может быть кислой аминокислотой;

где X_{a6} может быть Q или Р;

где X_{a7} может быть основной аминокислотой;

где X_{a8} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{a9} может быть А или Q;

где X_{a10} может быть основной аминокислотой; или

где X_{ea1} 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 переменного участка вариантной легкой цепи 3A4)

DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{A7}LLIHTVSNRFSQVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHPVPLTFGX_{A9}GTX_{A10}LEX_{A11}K

где X_{A1} может быть V или I

где X_{A2} может быть А или Р

где X_{A3} может быть S или T

где X_{A4} может быть L или Р

где X_{A5} может быть D или E

где X_{A6} может быть Q или Р

где X_{A7} может быть K или Q

где X_{A8} может быть L или V

где X_{A9} может быть А или Q

где X_{A10} может быть R или K или

где 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: Lvhl)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:190 (вариабельный участок варианта 2 легкой цепи

3A4: Lvhl2)

DVVMQTPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK

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

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXGDINPYNGDT
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}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}AVYYCARDPGAMDYWGQGTXT_{b23}TVTVSS

где X_{b1} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b2} может быть Р или А;

где X_{b3} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b4} может быть V или K;

где X_{b5} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b6} может быть основной аминокислотой;

где X_{b7} может быть S или А;

где X_{b8} может быть Н или Р;

где X_{b9} может быть основной аминокислотой;

где X_{b10} может быть S или G;

где X_{b11} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b12} может быть основной аминокислотой;

где X_{b13} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b14} может быть I или T;

где X_{b15} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b16} может быть гидрофобной аминокислотой;

где X_{b17} может быть К или Т;

где X_{b18} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

где X_{b19} может быть Q или E;

где X_{b20} может быть N или S;

где X_{b21} может быть Т или R;

где X_{b22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

или

где 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 переменного 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;

где X_{B2} может быть P или A;

где X_{B3} может быть M или V;

где X_{B4} может быть V или K;

где X_{B5} может быть M или V;

где X_{B6} может быть K или R;

где X_{B7} может быть S или A;

где X_{B8} может быть H или P;

где X_{B9} может быть K или Q;

где X_{B10} может быть S или G;

где X_{B11} может быть I или M;

где X_{B12} может быть K или R;

где X_{B13} может быть A или V;

где X_{B14} может быть I или T;

где X_{B15} может быть L или I,

где X_{B16} может быть V или A;

где X_{B17} может быть K или T;

где X_{B18} может быть S или T;

где X_{B19} может быть Q или E;

где X_{B20} может быть N или S;

где X_{B21} может быть T или R;

где X_{B22} может быть S или T; или

где 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)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

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

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

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

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

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

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

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

DVVMQTQTPSLAVSLGDQASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSN
RFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

DIVMTQTPSLPVPVTPGEPASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSN
RFGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

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

DVVMQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSN
RFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFTGQGTKLEIKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTL
TLISKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:201 тяжелая (Iggl) цепь мышиноного 3A4

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDT
NYNQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQTSVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

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

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

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

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDT
NYNQKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT
QKSLSLSPGK

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

цепи 3A4; Hh3

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

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

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDT
 NYNQKFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKG
 PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV
 VTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
 DTLNISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
 DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYP
 SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT
 QKSLSLSPGK

SEQ ID NO.:206

ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

SEQ ID NO.:207

ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGGAGACAGGGAG

SEQ ID NO.:208

ATACCCAAGCTTGGGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG

SEQ ID NO.:209

ATACCCAAGCTTCTAACACTCTCCCCTGTTGAAG

SEQ ID NO:210 pK-CR5

CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGC
 TCATTTTTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAGAATAGACCGAG
 ATAGGGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAAGAACGTGGACTCCAAC
 GTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATCA
 AGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCGATTT
 AGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCG
 GGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTAACCACCACACCCGCCGCGCTT
 AATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTTCAGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGA

TCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTA
AGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGAGCGCGCG
TAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGT
GGATCCACATCGGCGCGCCAAATGATTTGCCCTCCCATATGTCCTTCCGAGTGAGAGACACAA
AAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTTTATTAGCCAGAGGTGAGATTTA
AATAAGCTTGCTAGCAGATCTTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGTGGAGAGAAAGGCAAAGTG
GATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTT
TTTGAAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCA
ACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCGCCGTCTCAAGACCGCCTACT
TTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCCGACCGCCACCCGCTGCCGCCCG
CCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCGACTGTGACTGGTTAGACGCCTTTCTCGAGAGGTTTTCCG
ATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGG
TTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGC
TGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCT
TCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGC
TCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTACACGCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTTATAATAC
AAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATA
CAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAAT
ACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTAAAG
TTGTGAGTGAAAGACGAAAGGGTTCATTAAGGCGCGCCGTGACCTCGAGGGGGGGCCCGTA
CCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTG
TTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAG
TGTAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCC
GCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGA
GGCGGTTTTCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTT
CGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGG
GATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCC
GCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCA
AGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATAACAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCC
CTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCG
GGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCGC
TCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTACGCCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAAC
TATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAAC
AGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTAC
GGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA
AGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTTCG

AAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGG
ATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAG
TAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTA
TTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTA
CCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCA
GCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCC
ATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCCAGTTAATAGTTTGC GC
AACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTCATTC
AGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTT
AGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCATGGTT
ATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGT
GAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCG
TCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGT
TCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACCCACT
CGTGACCCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACA
GGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTC
TTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTT
GAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:211 pMPG-CR5

GTCGACGATACCGTGCACTTAATTAAGCGCGCTCGACCAAATGATTTGCCCTCCCATA
TGTCTTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAATAAATTTCTT
TTATTAGCCAGAGGTCGAGGTCGGGGGATCCGTTTAACTTGGACCTGGGAGTGGACACCTGT
GGAGAGAAAGGCAAAGTGGATGTCATTGTCACTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGGTGAA
TATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAACTGACAATCTTAGCGCAGAAGTAATGCCCGCTTTTGA
GAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGACCATCCGCC
GTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAACAACCCCGACC
GCCACCCGCTGCCGCCCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCGACTGTGACTGGTTAGACGCCT
TTCTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTAC
CGTTCGGAGGCCGACGGGTTTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTC
AACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCT
GGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTG
ACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAGGCCTCCCACCGTACACGCCTACCTCGACCCGG
GTACCAATCTTATAATACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGAT
TGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGA
TTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAG

ATTGTCTGTTTGTAAAGTTGTCGAGTGAAGACGAAAGGGTTAATTAAGGCGCGCCGTCGACT
AGCTTGGCACGCCAGAAATCCGCGCGGTGGTTTTTGGGGGTGCGGGGTGTTTGGCAGCCACAG
ACGCCCCGTGTTTCGTGTCGCGCCAGTACATGCGGTCCATGCCCAGGCCATCCAAAAACCATGG
GTCTGTCTGCTCAGTCCAGTTCGTGGACCAGACCCACGCAACGCCCAAATAATAACCCCCAC
GAACCATAAACCATTTCCCATGGGGGACCCCGTCCCTAACCCACGGGGCCAGTGGCTATGGCA
GGGCCTGCCGCCCCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACCCGAACCTGGGGGGTGGGGT
GGGGAAAAGGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAG
TGCCAGCCCTGGGACCGAACCCCGCGTTTTATGAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATT
CTGTCTTTTTATTGCCGTCATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGT
TAGCCTCCCCCATCTCCCCTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCGGTTTTCCACT
ATCGGCGAGTACTTCTACACAGCCATCGGTCCAGACGGCCGCGCTTCTGCGGGCGATTTGTGT
ACGCCCCGACAGTCCCGGCTCCGGATCGGACGATTGCGTCGCATCGACCCTGCGCCCAAGCTGC
ATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATGCGGAGCATATA
CGCCCGGAGCCGCGGGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAAGTAGCGCGTCTGCTG
CTCCATACAAGCCAACCACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGACCTCGTATTGGGAATCCCC
GAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCCATTGTCCGTCAGGACATTGTT
GGAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGCCGGACTTCGGGGCAGTCCTCGGCCCAAAGCATCAG
CTCATCGAGAGCCTGCGCGACGGACGCACTGACGGTGTCTGTCATCACAGTTTGCCAGTGATA
CACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATCACGCCATGTAGTGTATTGACCGATTCTTG
CGGTCCGAATGGGGCCGAACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGGCCGACGATCGCATCCATGGC
CTCCGCGACCGGCTGCAGAACAGCGGGCAGTTCGGTTTTCAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACC
CTGTGCACGGCGGGAGATGCAATAGGTGAGGCTCTCGCTGAATTCCCCAATGTCAAGCACTTC
CGGAATCGGGAGCGCGGCCGATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATC
GGCGCAGCTATTTACCCGCAGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACGAGA
TTCTTCGCCCTCCGAGAGCTGCATCAGGTGCGAGACGCTGTCGAACTTTTCGATCAGAACTT
CTCGACAGACGTGCGGGTGAGTTCAGGCTTTTTTCATATCTCATTGCCCGGGATCTGCGGCACG
CTGTTGACGCTGTTAAGCGGGTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTTCGAGGCCACACGCGTCACC
TTAATATGCGAAGTGGACCTGGGACCGCGCCGCCCCGACTGCATCTGCGTGTTTGAATTTCGCC
AATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTTGTGTCATCATAGAACTAAAGACATGCAAATATATTTCT
TCCGGGGACACCGCCAGCAAACGCGAGCAACGGGGCCACGGGGATGAAGCAGGGCATGGCGGCC
GACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATG
ATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGTCCAGGCAGGTA
GATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCAGCCTAACTTCGATC
ACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCTCGGCGAGCACATGGAACGGGTTGGCA
TGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGTCGCGGTGCATGGAGC
CGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCGCTAACGGATTCAACCACTCCAAGAA

TTGGAGCCAATCAATTCTTGCGGAGAACTGTGAATGCGCAAACCAACCCTTGGCAGAACATAT
CCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCGGCGCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAA
GGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACG
CTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTCCCCCTGGAAG
CTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCC
TTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGT
TCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCCGTTTACGCCCAGCGCTGCGCCTTATCCGG
TAACTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGG
TAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAA
CTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTTGT
TTGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTAC
GGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAA
AAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATA
TGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
TCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGG
CTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTT
ATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGC
CTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTT
GCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
ATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTGTGCAAAAAAGC
GGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAGTGTTATCACTCAT
GGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGAC
TGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCC
GGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAA
ACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTTCGATGTAACC
CACTCGTGACCCCACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAA
AACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCAT
ACTCTTCCTTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACAT
ATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCC
ACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCACGAG
GCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCATGTTTGACAGCTTATCTCTAGCAGATCCGGAATTCCCC
TCCCCAATTTAAATGAGGACCTAACCTGTGGAAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAACCTGTAC
AAACAGAGGTTATTGGAATAACTAGCATGCTTAACCTTCATGCAGGGTCACAAAAAGTGCATG
ACGATGGTGGAGGAAAACCTATTCAAGGCAGTAATTTCCACTTCTTTGCTGTTGGTGGAGACC
CCTTGGAATGCAGGGAGTGCTAATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGGTACTATAACCC

CTAAAAACCCAACAGCCCAGTCCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTTGGACAAAA
 ACAATGCTTATCCAGTTGAGTGCTGGGTTCCTGATCCTAGTAGAAATGAAAATACTAGGTATT
 TTGGGACTTTCACAGGAGGGGAAAATGTTCCCCCAGTACTTCATGTGACCAACACAGCTACCA
 CAGTGTTGCTAGATGAACAGGGTGTGGGGCCTCTTTGTAAAGCTGATAGCCTGTATGTTTCAG
 CTGCTGATATTTGTGGCCTGTTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAGTGGAGAGGCCTTGCAA
 GATATTTTAAGATCCGCCTGAGAAAAAGATCTGTAAAGAATCCTTACCTAATTTCTTTTTGC
 TAAGTGACCTTATAAACAGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGGCAGCCTATGTATGGTATGGAAT
 CCCAGGTAGAAGAGGTTAGGGTGTTTGATGGCACAGAAAGACTTCCAGGGGACCCAGATATGA
 TAAGATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAACCAAAATGCTTTAAACAGGTGCTTTTATTG
 TACATATACATTTAATAAATGCTGCTTTTGTATAAGCCACTTTTAAGCTTGTGTTATTTTGGG
 GGTGGTGTTTTAGGCCTTTTAAAACACTGAAAGCCTTTACACAAATGCAACTCTTGACTATGG
 GGGTCTGACCTTTGGGAATGTTTCAGCAGGGGCTGAAGTATCTGAGACTTGGAAGAGCATTGT
 GATTGGGATTCACTGCTTGATCCATGTCCAGAGTCTTCAGTTTCTGAATCCTCTTCTCTTGTA
 ATATCAAGAATACATTTCCCATGCATATATTATATTTTCATCCTTGAAAAAGTATACATACTT
 ATCTCAGAATCCAGCCTTTCCTTCCATTCAACAATTCTAGAAGTTAAACTGGGGTAGATGCT
 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

GGGTTCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGCAATCTGG

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 ДЛЯ ВЫДЕЛЕННОЙ ЗАЯВКИ

1. Способ лечения тройного негативного рака молочной железы, базального рака молочной железы или лечения рака молочной железы с низкой экспрессией рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PgR) и/или Her2,

который включает введение больному ингибитора ассоциированного с почками антигена 1 (ингибитор KAAG1).

2. Способ по п.1, где ингибитор KAAG1 представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое способно связываться с KAAG1.

3. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способного к специфическому связыванию с KAAG1, для получения лекарственного средства для:

а) лечения рака молочной железы с низкой экспрессией рецептора эстрогена (ER), рецептора прогестерона (PgR) и/или Her2,

б) лечения тройного негативного рака молочной железы или

с) лечения базального рака молочной железы.

4. Способ или применение по п.2 или 3, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, антитело человека или гуманизированное антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент.

5. Способ или применение по п.3 или 4, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

CDRH1, как указано в SEQ ID NO:49,

CDRH2, как указано в SEQ ID NO:50 или SEQ ID ID:212,

CDRH3, как указано в SEQ ID NO:51,

CDRL1, как указано в SEQ ID NO:52,

CDRL2, как указано в SEQ ID NO:53, и

CDRL3, как указано в SEQ ID NO:54.

6. Способ или применение по любому из пп.3-5, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент выбран из группы, состоящей из:

а. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:48, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:46;

b. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:186, и

где по меньшей мере одна аминокислота, обозначенная как X, является аминокислотной заменой по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, как указано в SEQ ID NO:48, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:191;

где по меньшей мере одна аминокислота, обозначенная как X, является аминокислотной заменой по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, как указано в SEQ ID NO:46; и

c. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:187, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:192;

d. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:188, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:193;

e. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:189 или SEQ ID NO:190, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:194, SEQ ID NO:195, SEQ ID NO:196 или SEQ ID NO:197;

f. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:189, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:194;

g. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:189, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:195;

h. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:189, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:196;

i. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:189, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:197;

j. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:190, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:194;

k. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельную область легкой цепи, как указано в SEQ ID NO:190, и

вариабельную область тяжелой цепи, как указано в SEQ ID NO:195;

l. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO: 199 или SEQ ID NO:200, и

тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:202, SEQ ID NO:203, SEQ ID NO:204 или SEQ ID NO:205;

m. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:199, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:202;

n. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:199, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:203;

o. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:199, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:204;

- р. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:199, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:205;
- q. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:200, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:202;
- г. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:200, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:203;
- с. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:200, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:204; и
- т. антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий легкую цепь, как указано в SEQ ID NO:200, и тяжелую цепь, как указано в SEQ ID NO:205.

7. Способ или применение по любому из пп.3-6, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгировано с терапевтической молекулой.

8. Способ или применение по п.7, где терапевтическая молекула представляет собой цитотоксический агент.

9. Способ или применение любого из пп.1-8, дополнительно включающий введение противоопухолевого агента, химиотерапевтического или цитотоксического агента.

По доверенности

Фигура 1а

[illegible]

Фигура 1b

3A4-VH													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1		
	1234567890												

Фигура 2а

Выравнивание вариабельной легкой цепи

Мышиная VL	DVVMQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRF 60
SEQ ID NO. 33	DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLHSGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRF 60
	*:*****. *: *: *****:*****:***:*****
Мышиная VL	SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGVIYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK 112
SEQ ID NO. 33	SGVPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDVGVIYCFQGSHVPLTFGQGTKLEIK 112
	*****:***** **:**:

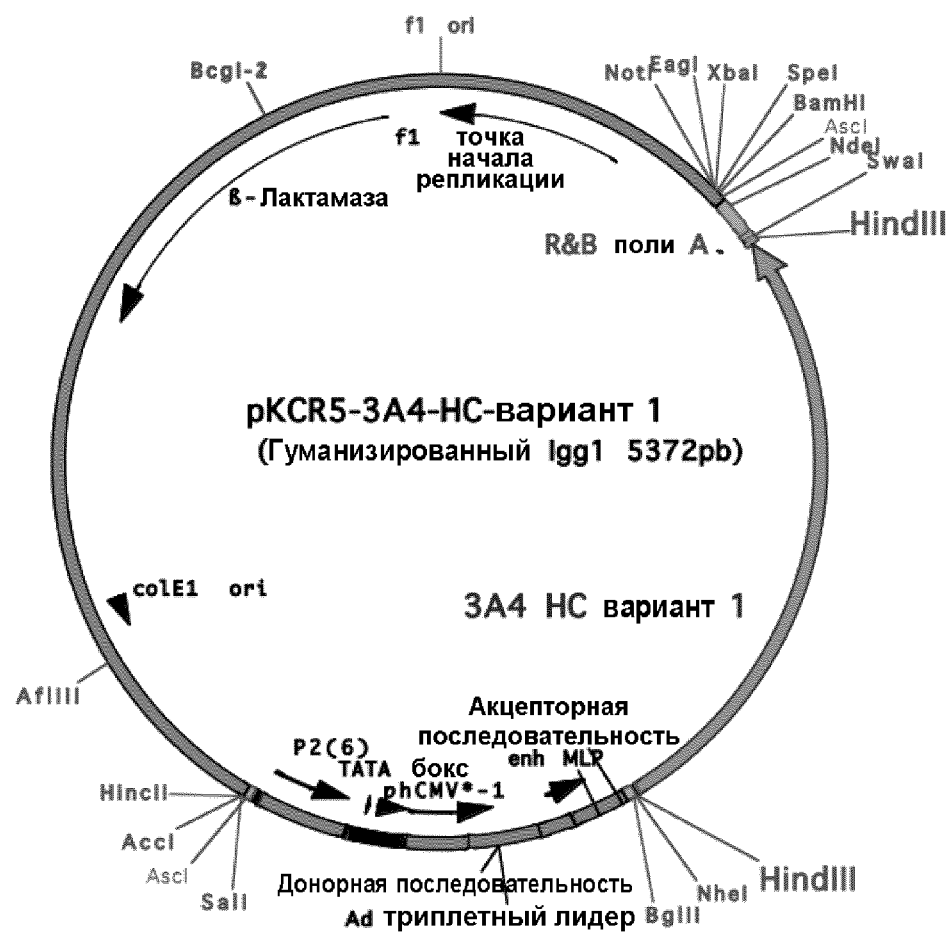
2/21

Фигура 2b

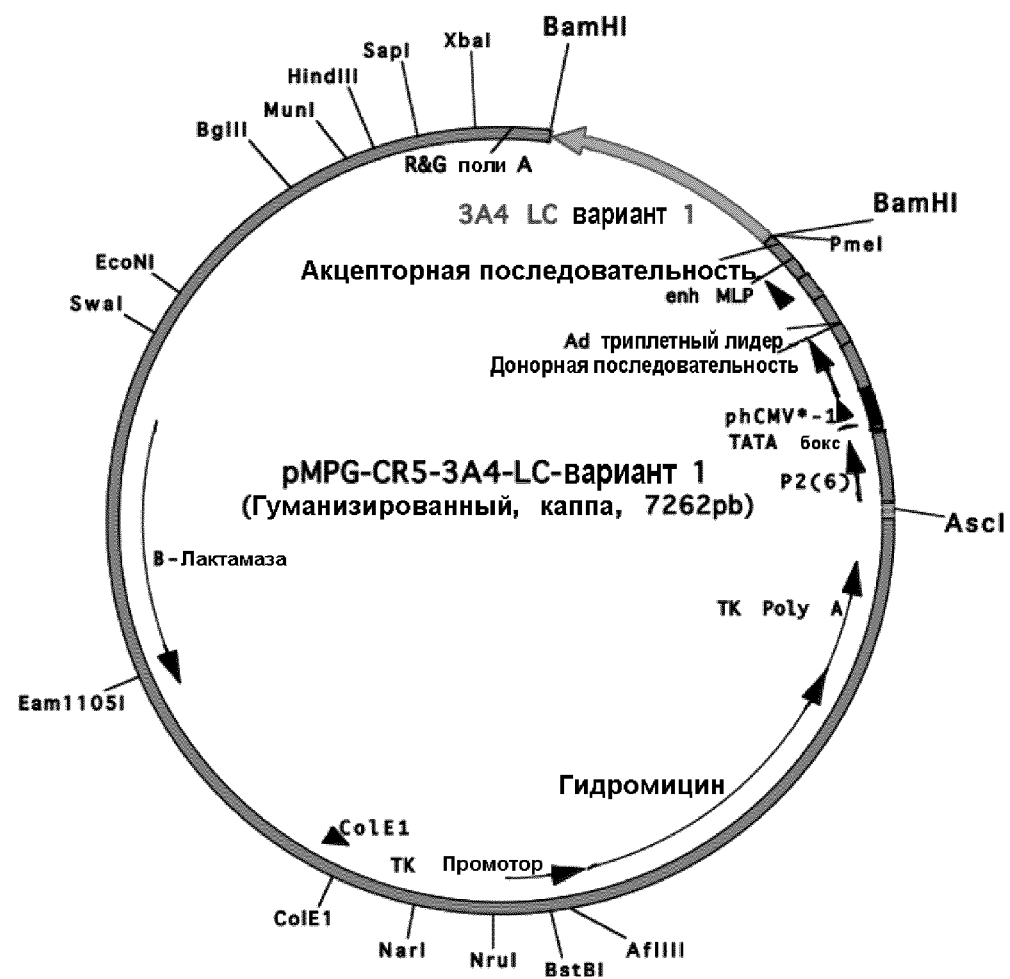
Выравнивание вариабельной тяжелой цепи

Мышиная VH	QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNY 60
SEQ ID NO. 38	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY 60
	*:*****. *: *****:*****:*: *: *****
Мышиная VH	NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS 116
SEQ ID NO. 38	NQKFKGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTSLVTVSS 116
	*****:. :*, *. *:*****:*, ** ***** *****

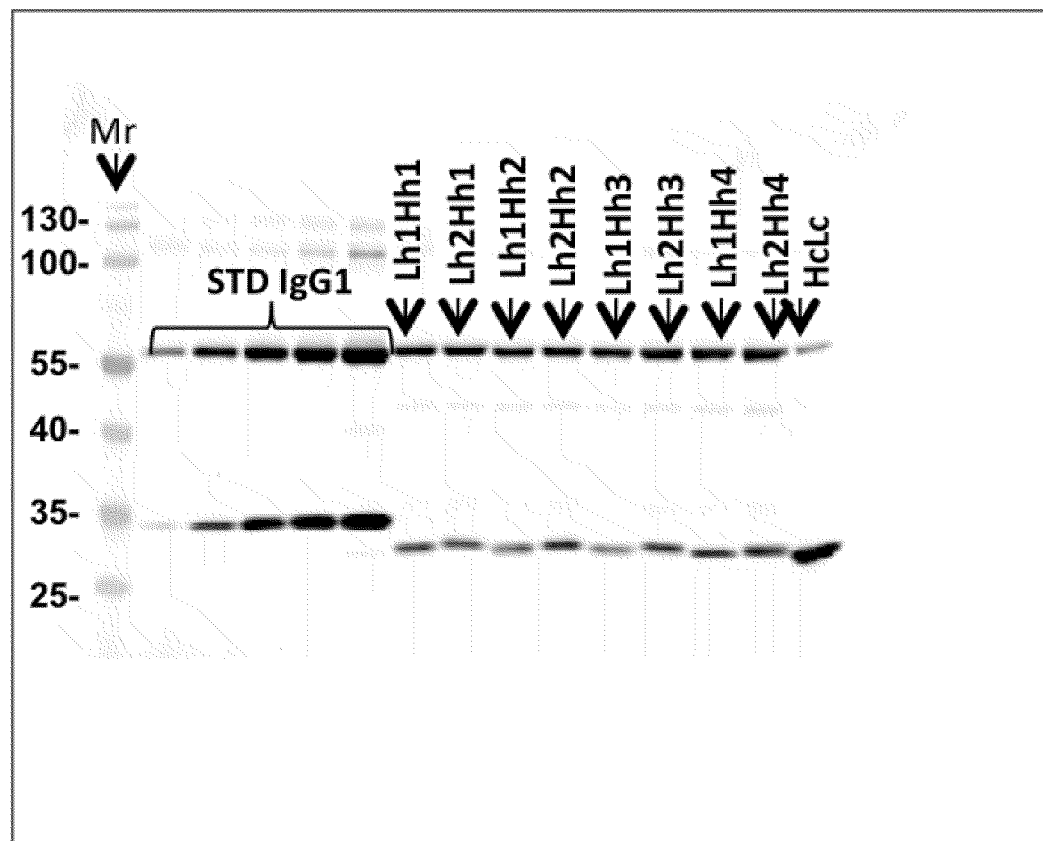
Фигура 3а



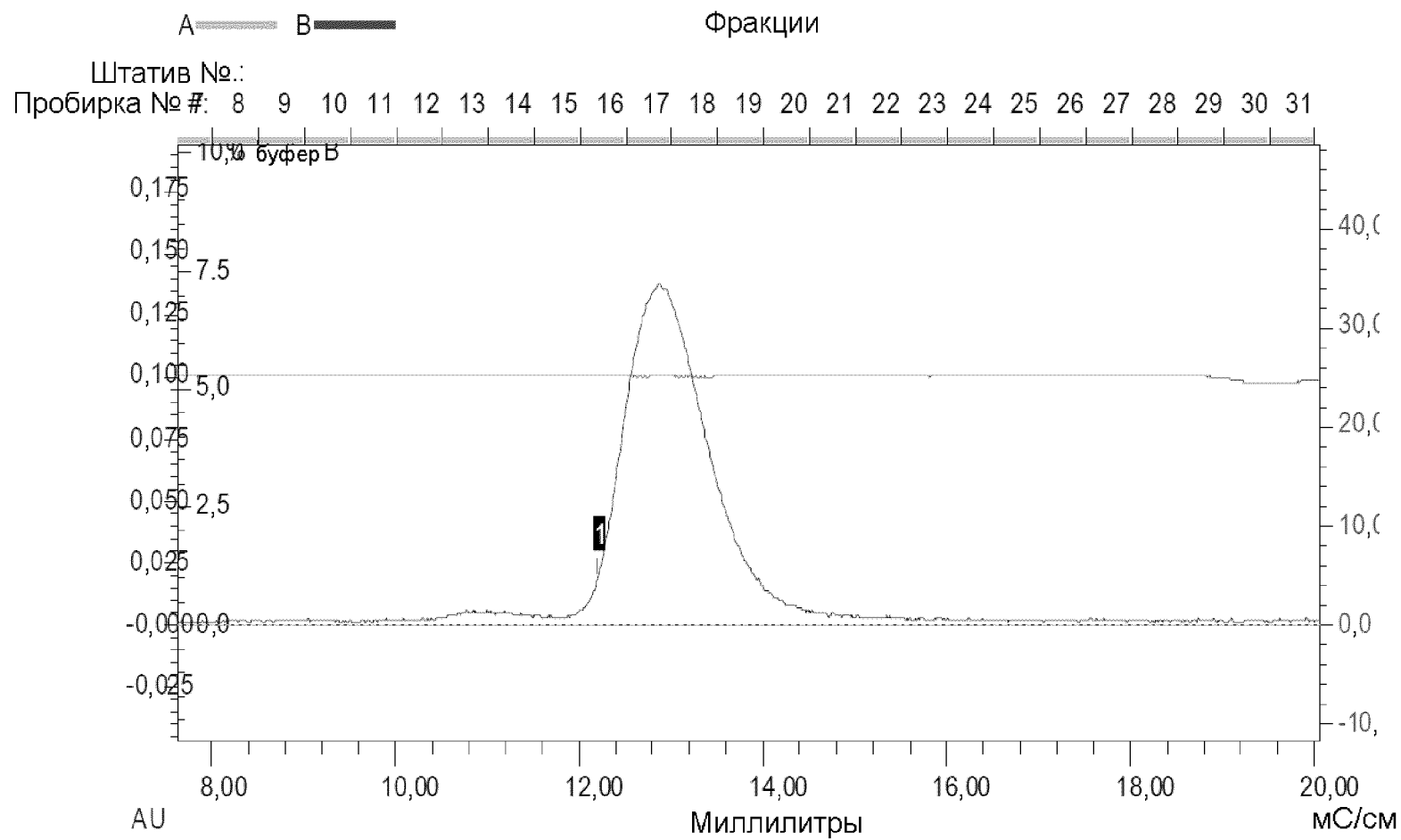
Фигура 3b



Фигура 4



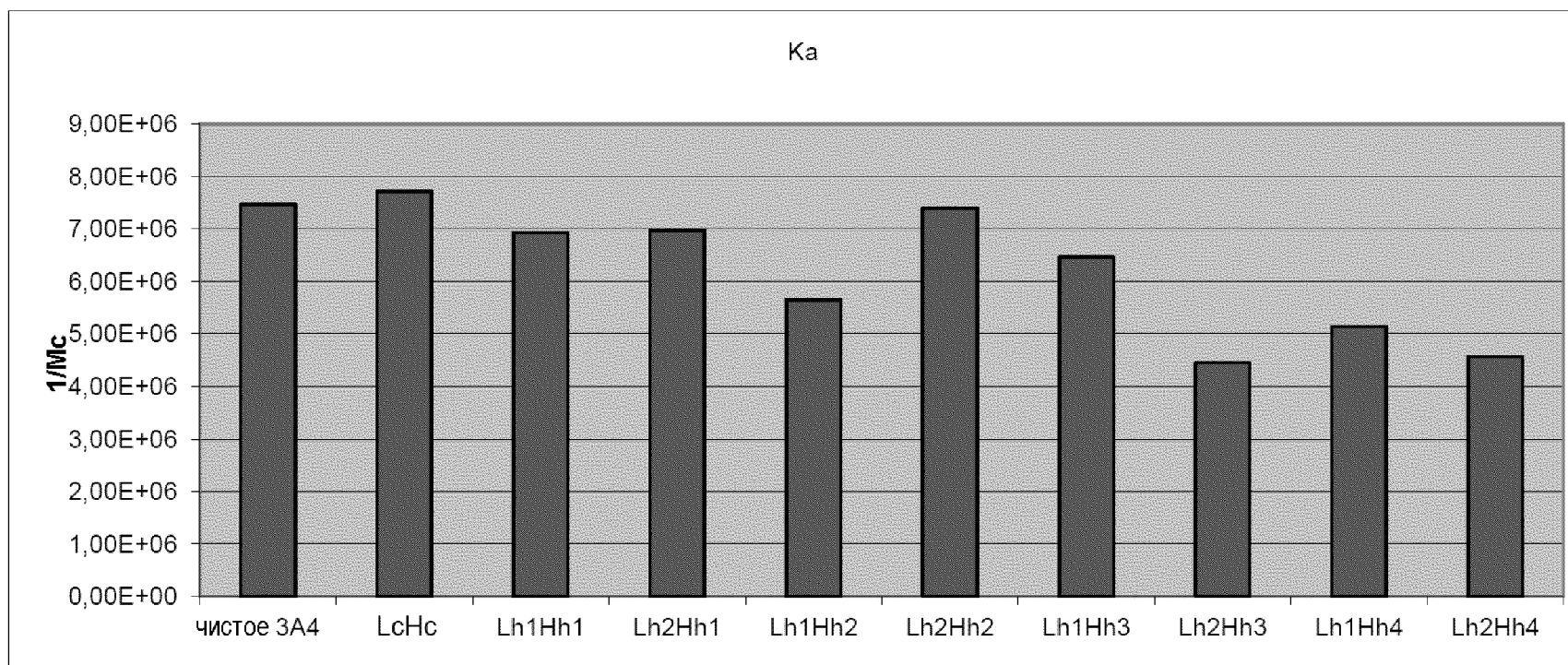
Фигура 5



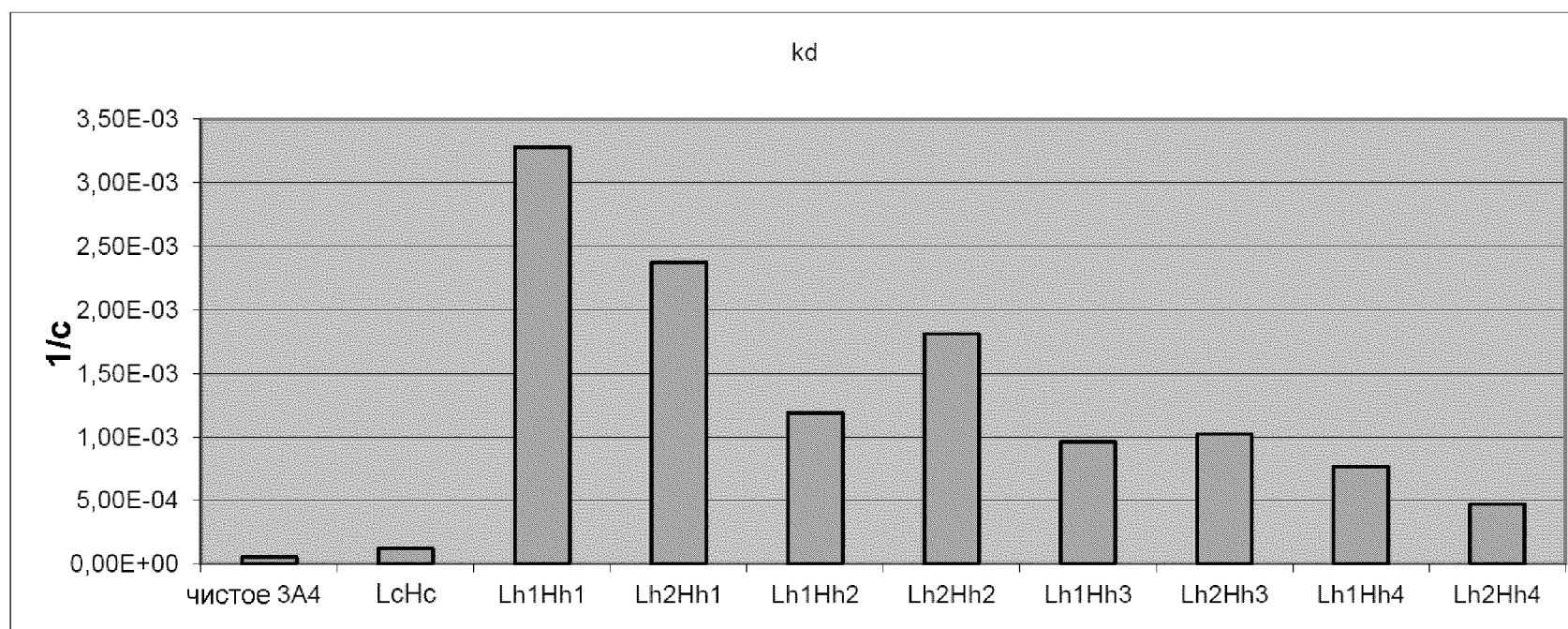
Фигура 6

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_D (нМ)	Различие, раз
LcHc	$7,72 \times 10^6$	$1,21 \times 10^{-4}$	0,016	-
Lh1Hh1	$6,93 \times 10^6$	$3,28 \times 10^{-3}$	0,474	29,6
Lh2Hh1	$6,97 \times 10^6$	$2,37 \times 10^{-3}$	0,341	21,3
Lh1Hh2	$5,65 \times 10^6$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,211	13,2
Lh2Hh2	$7,40 \times 10^6$	$1,81 \times 10^{-3}$	0,245	15,3
Lh1Hh3	$6,46 \times 10^6$	$9,60 \times 10^{-4}$	0,149	9,3
Lh2Hh3	$4,46 \times 10^6$	$1,02 \times 10^{-3}$	0,228	14,3
Lh1Hh4	$5,14 \times 10^6$	$7,64 \times 10^{-4}$	0,149	9,3
Lh2Hh4	$4,57 \times 10^6$	$4,70 \times 10^{-4}$	0,103	6,4

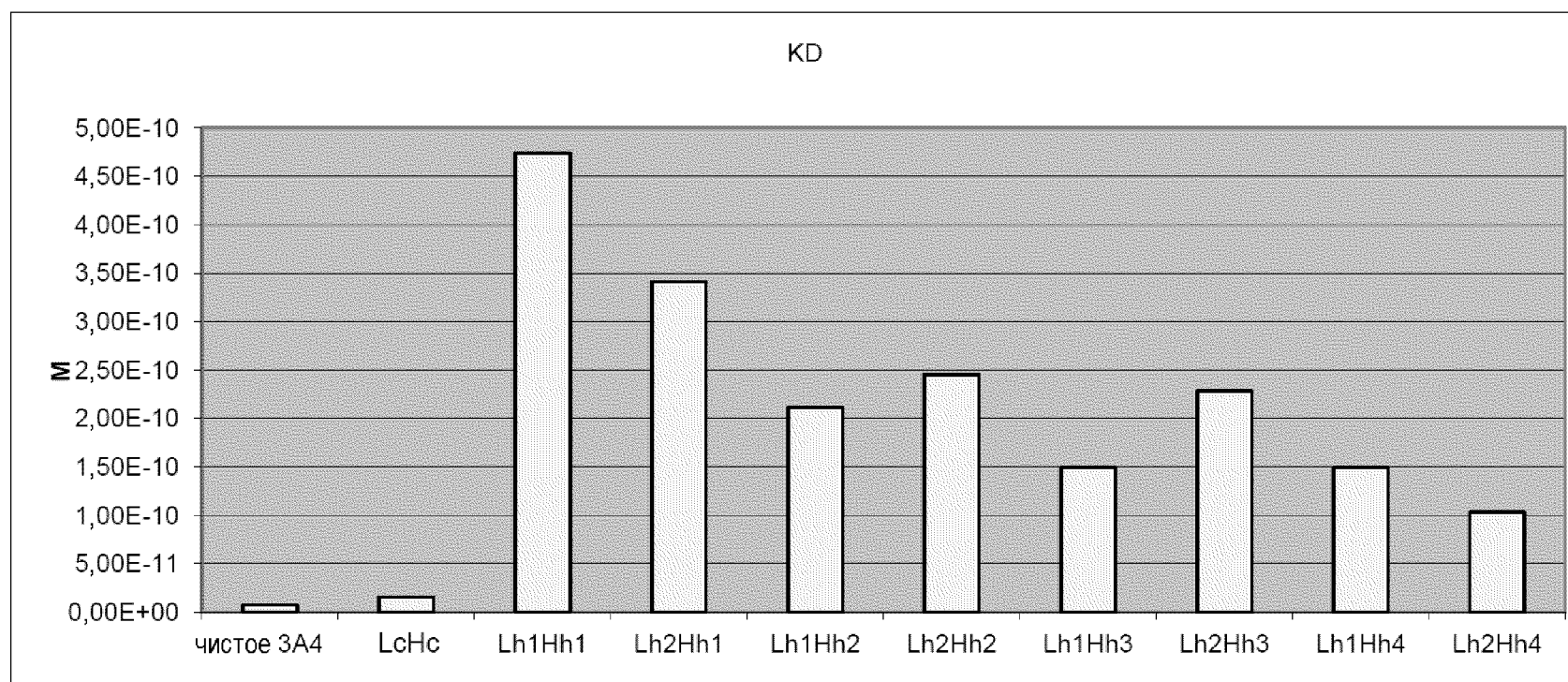
Фигура 7а



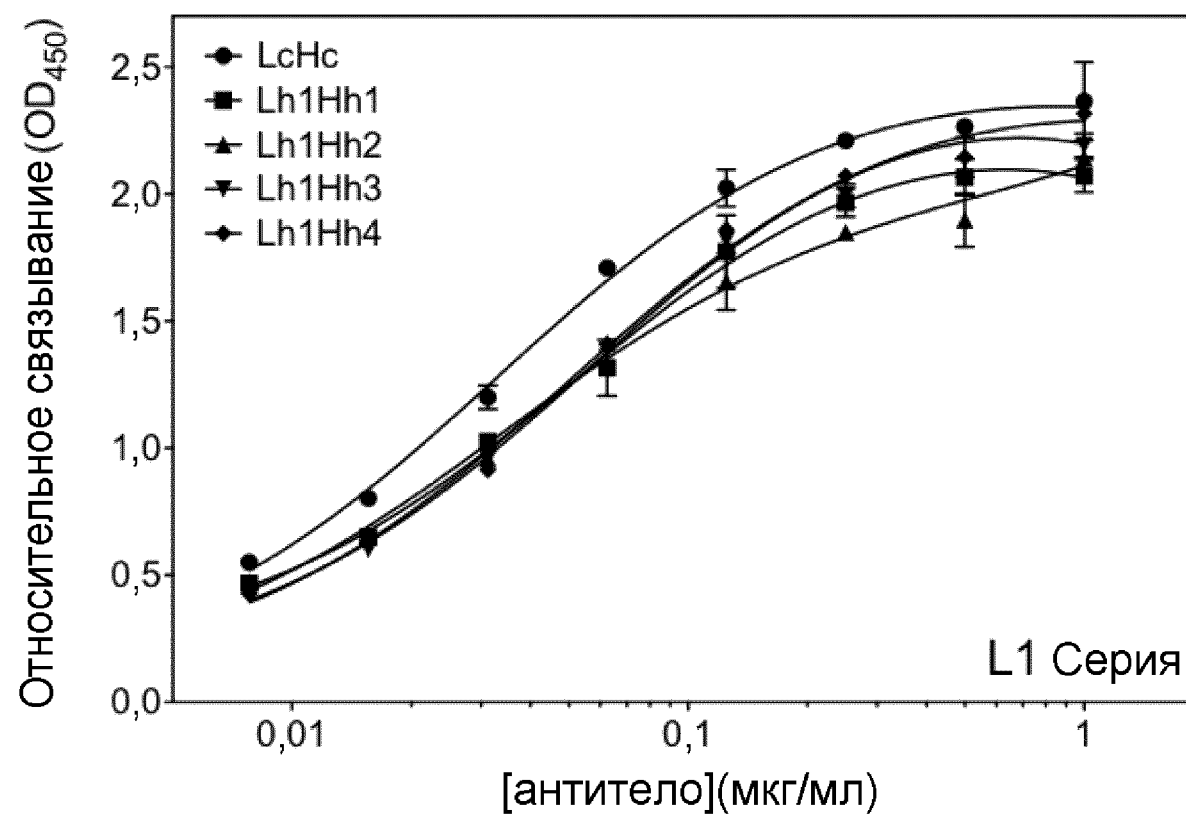
Фигура 7b



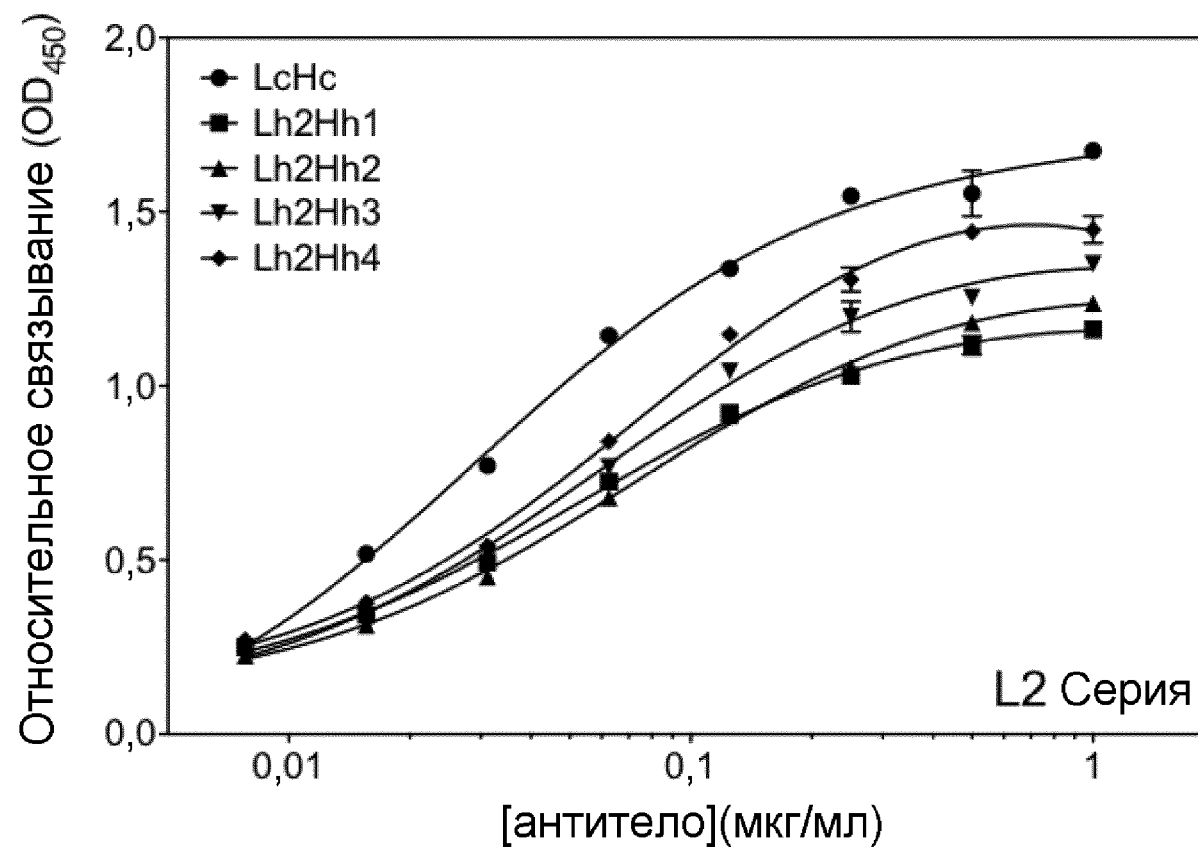
Фигура 7с



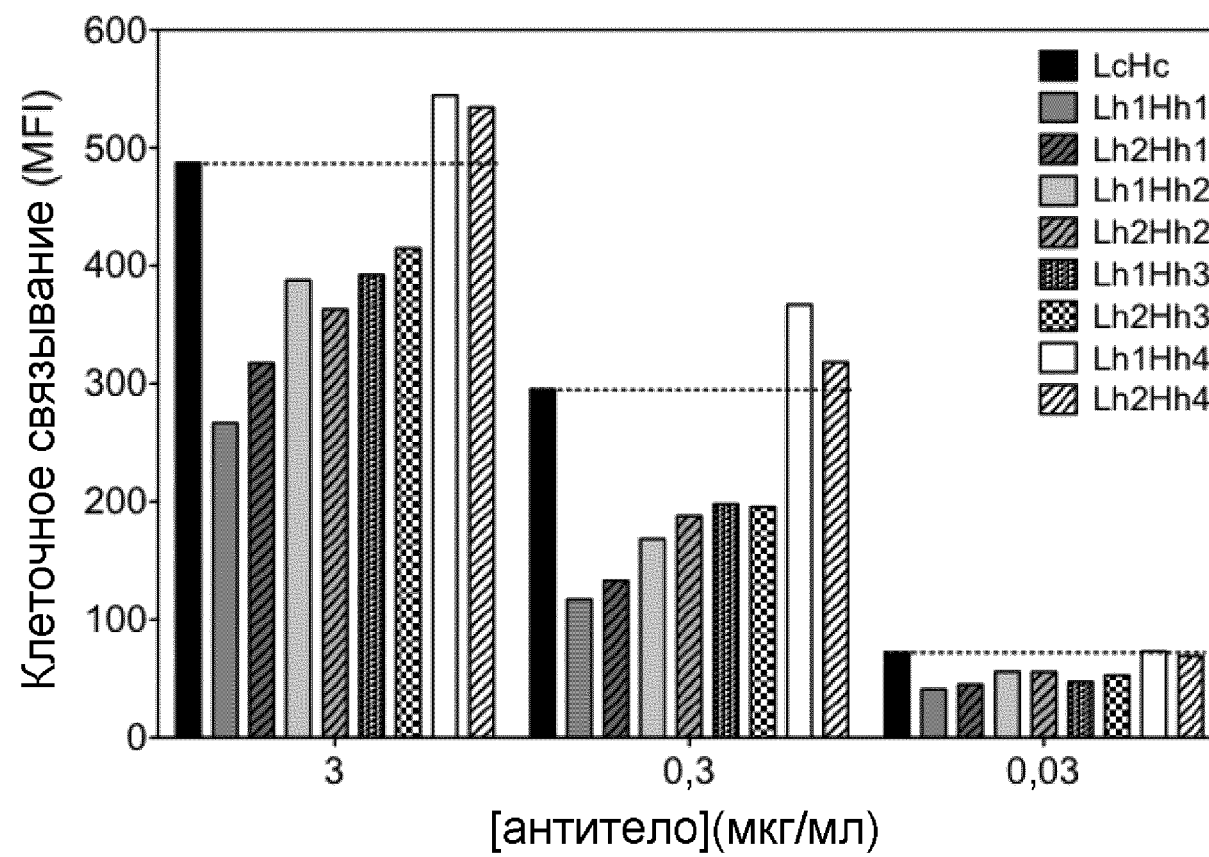
Фигура 8а



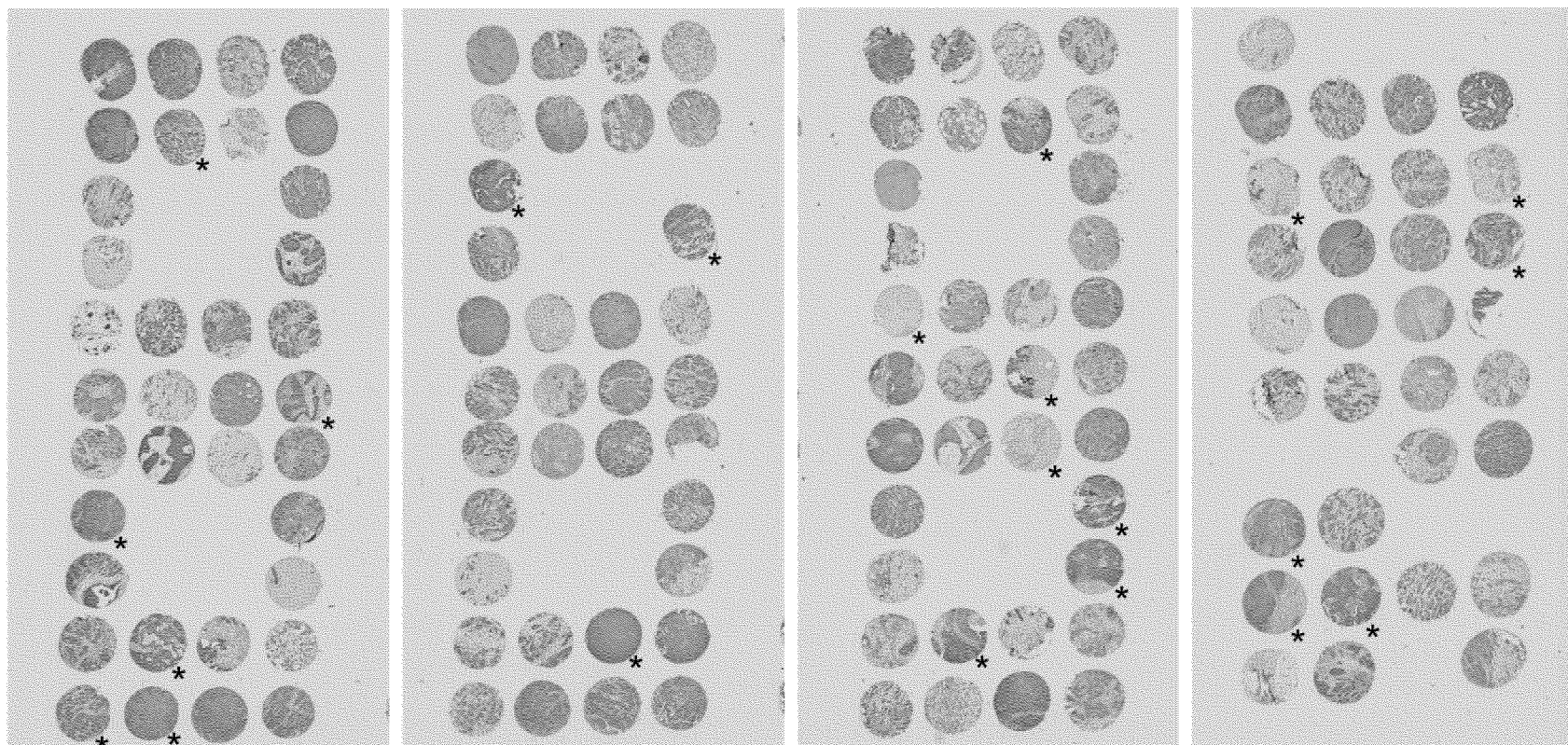
Фигура 8b



Фигура 9

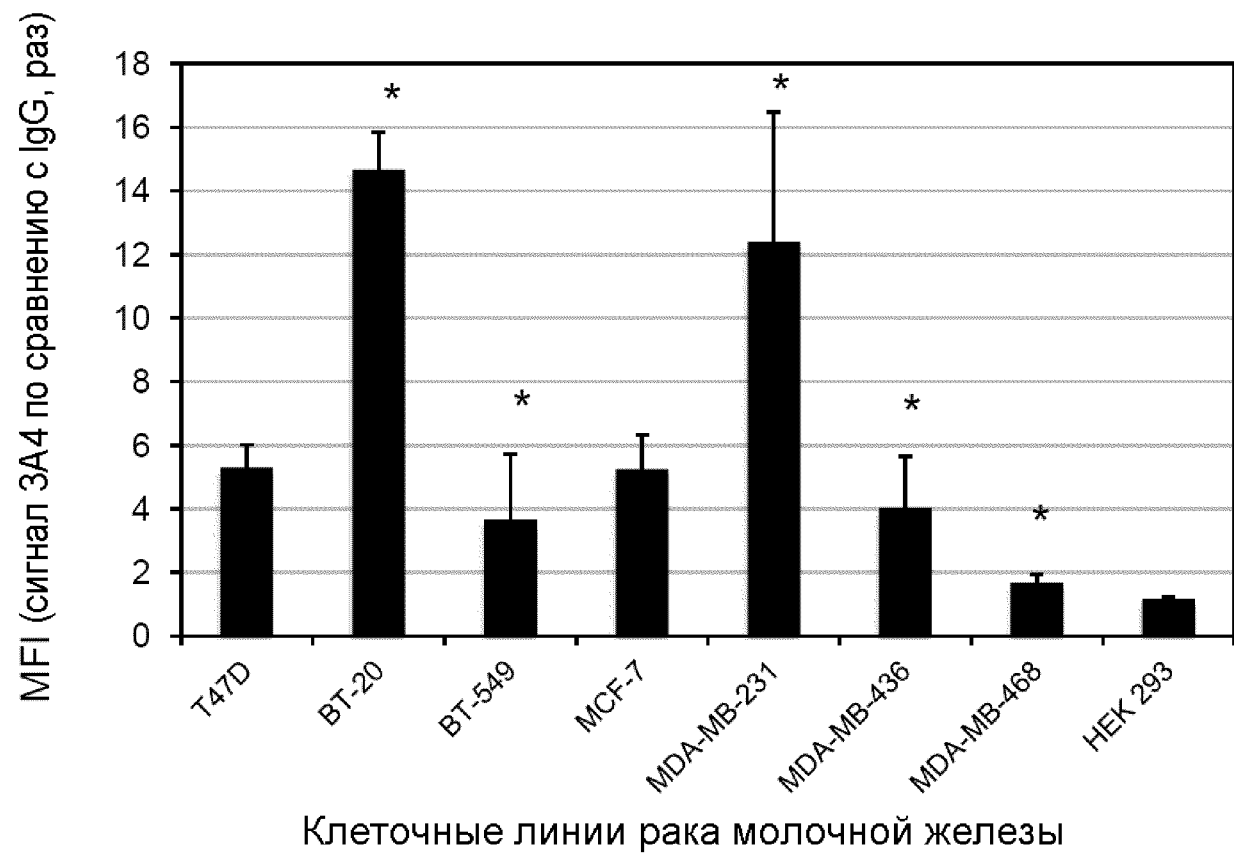


Фигура 10



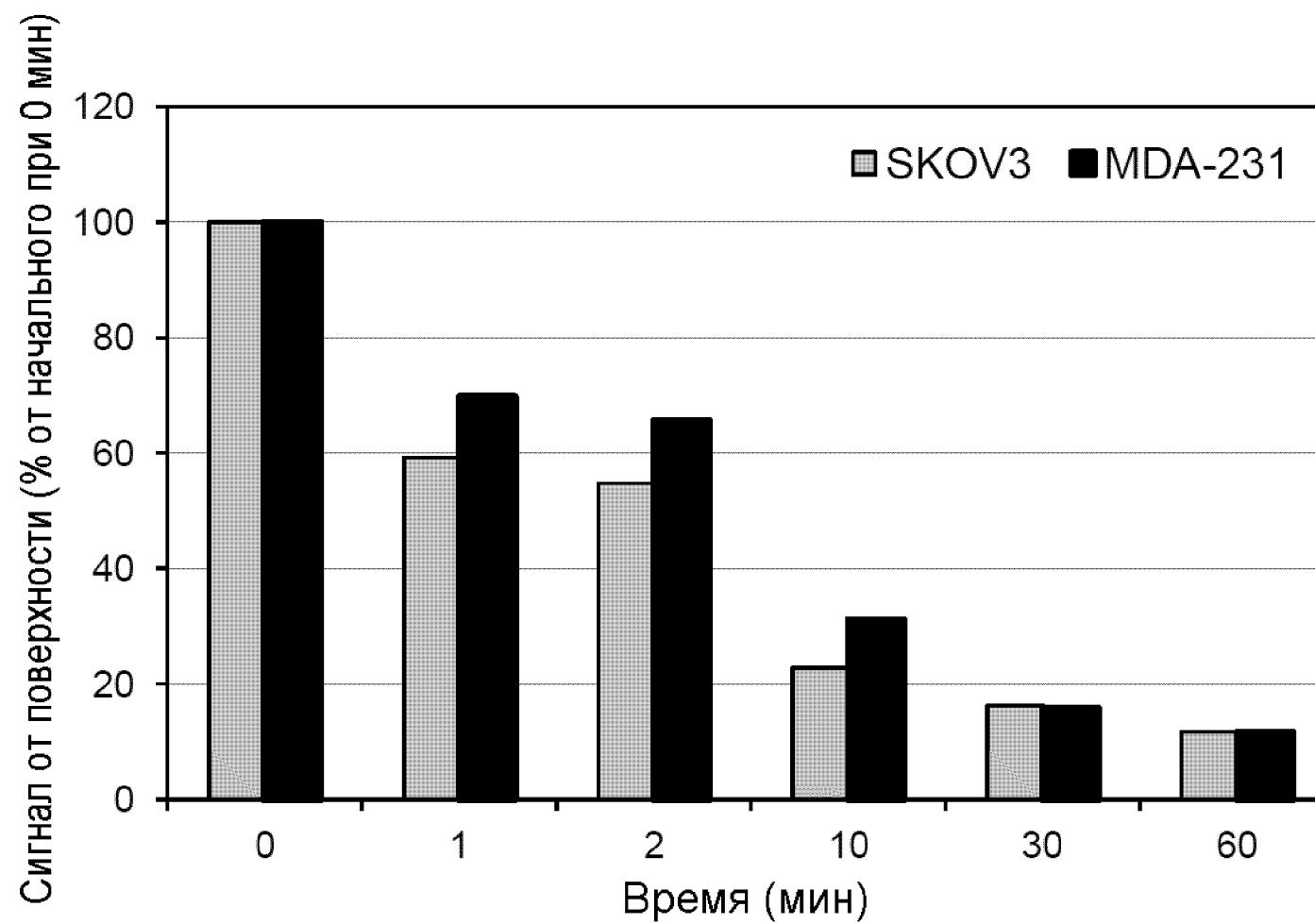
*, Образцы РМЖ

Фигура 11

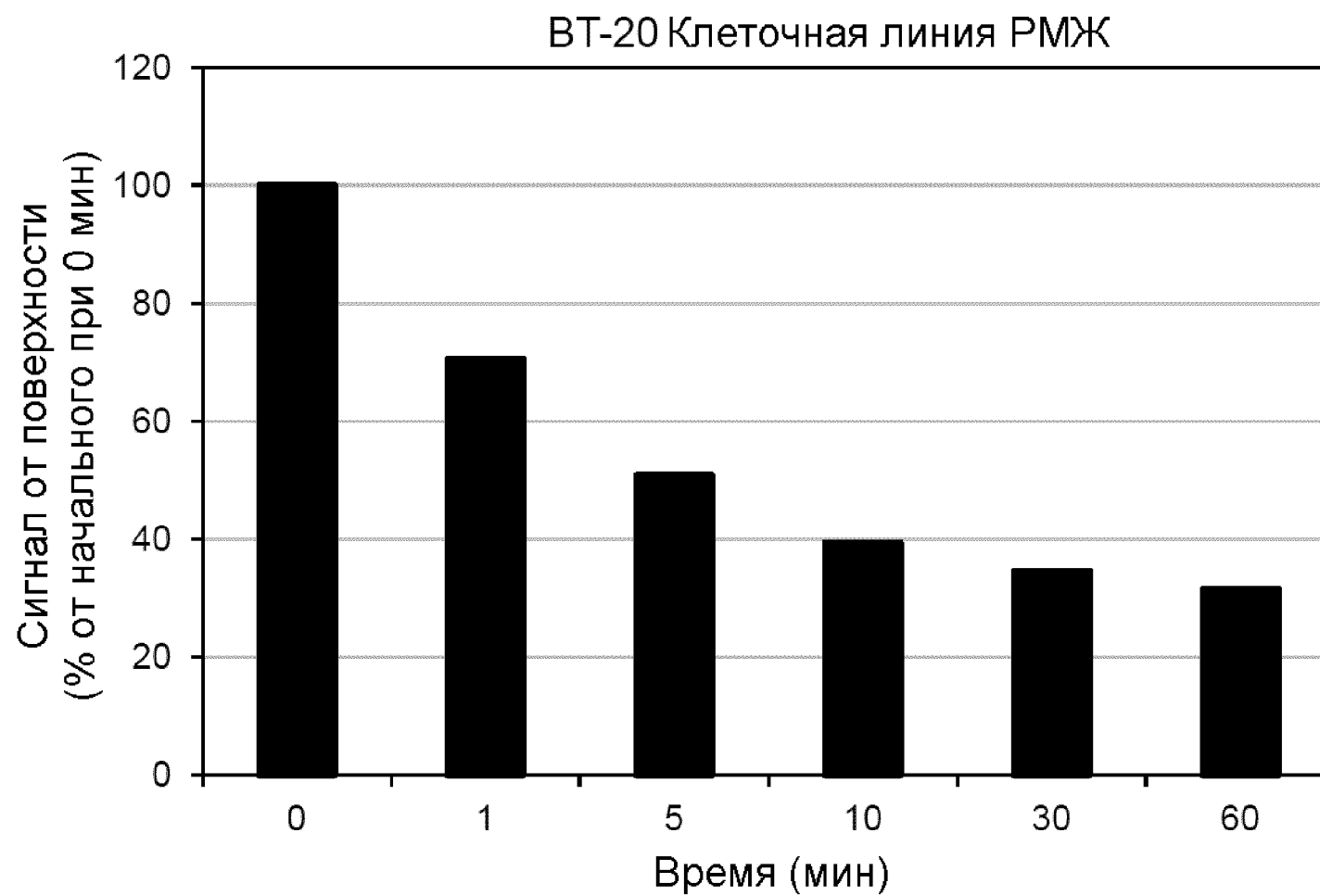


*, Клеточные линии РМЖ

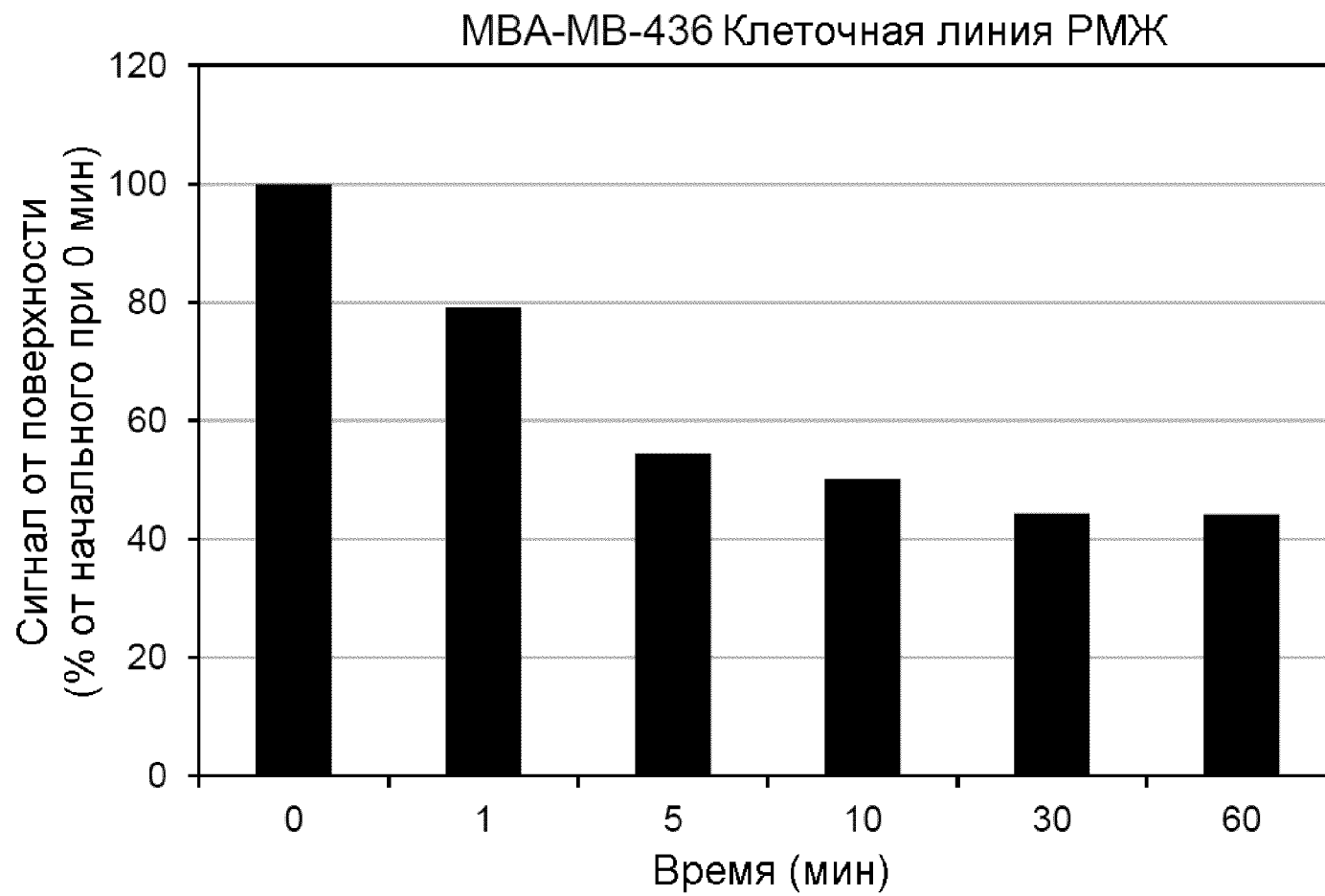
Фигура 12



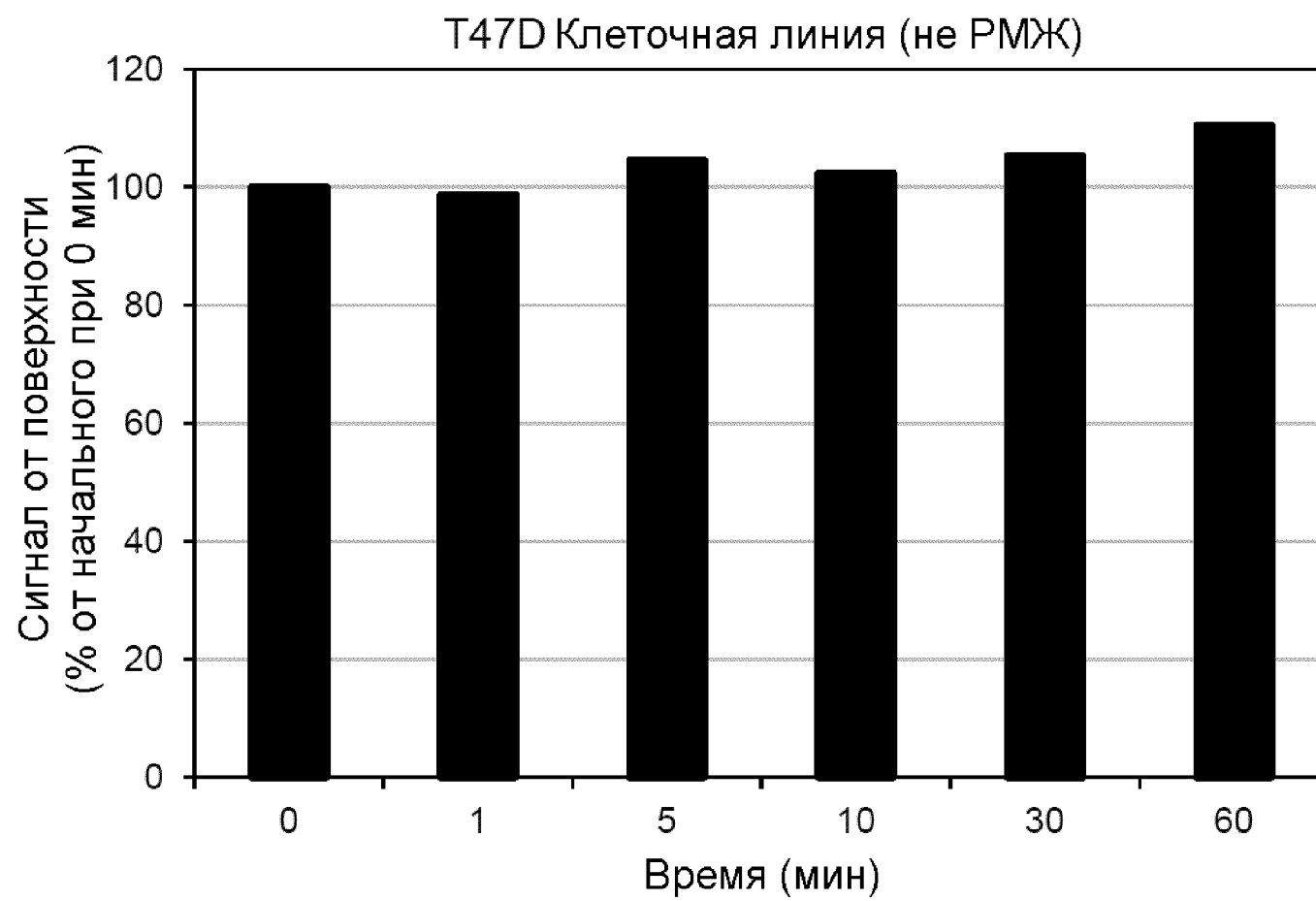
Фигура 13



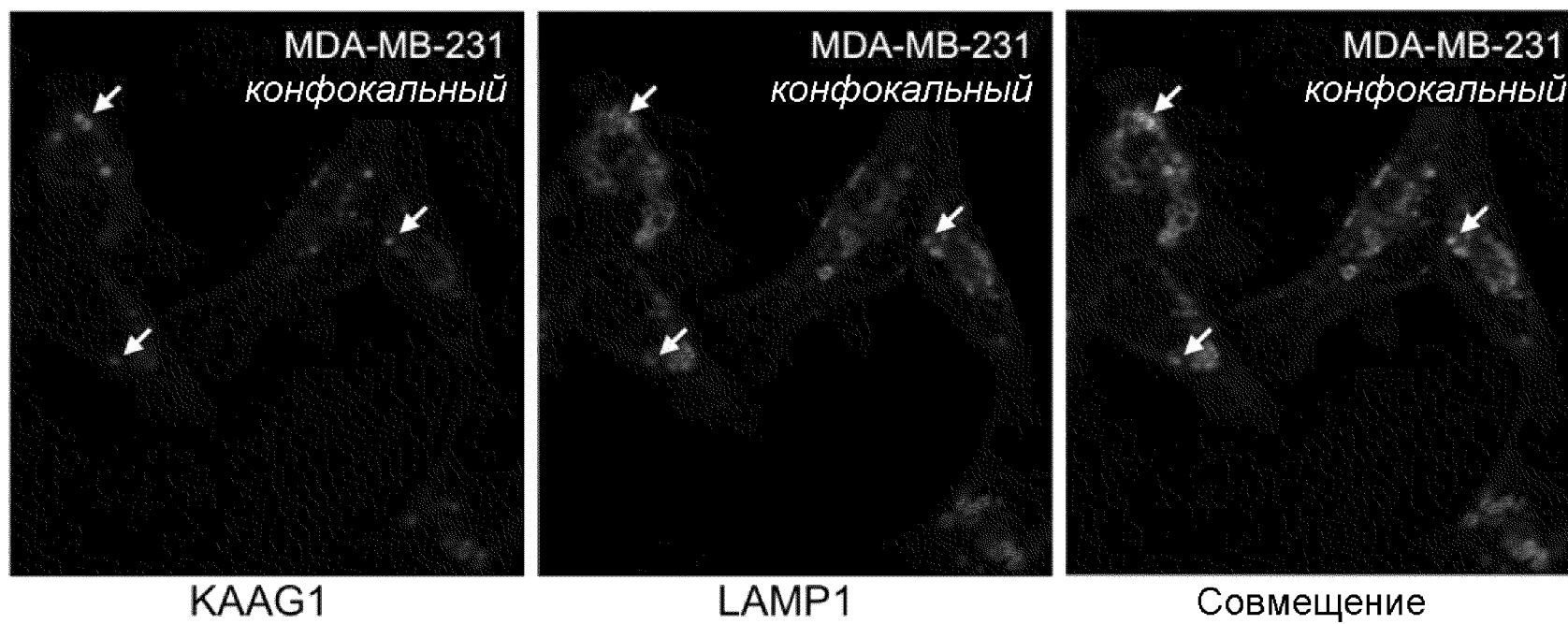
Фигура 14



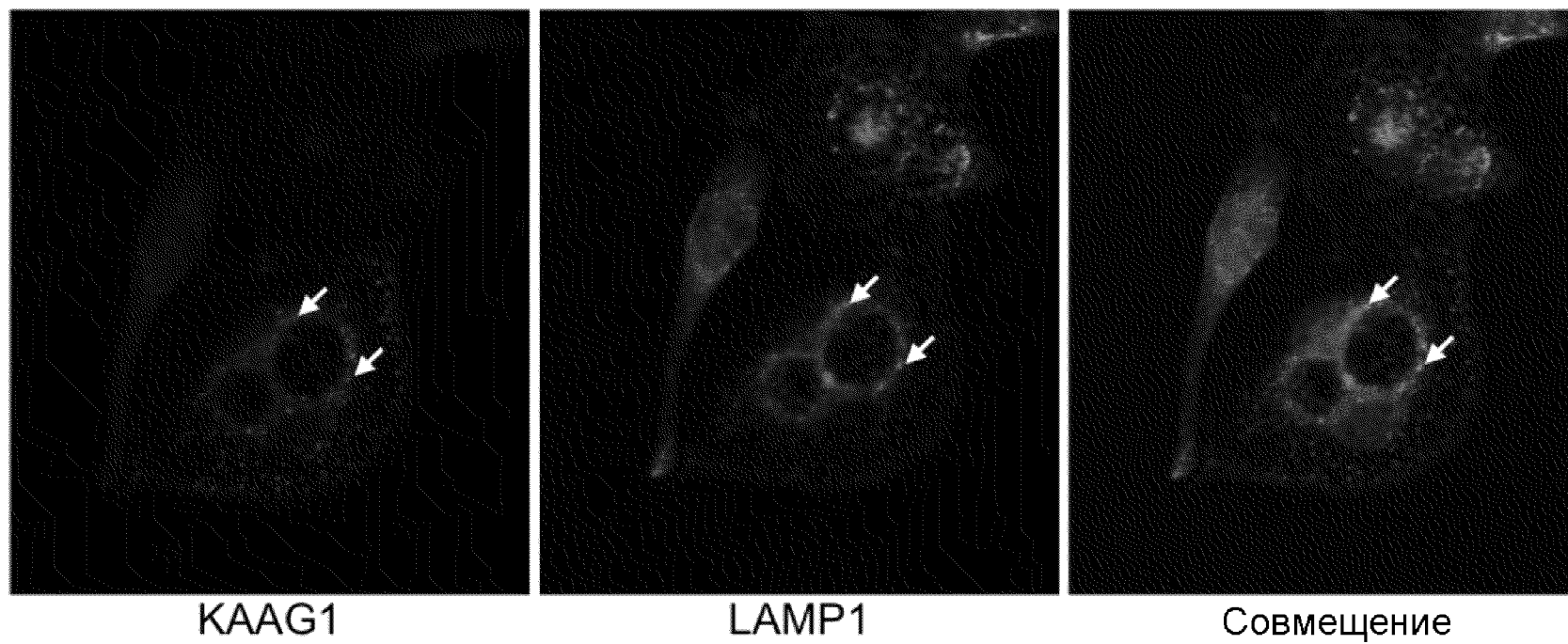
Фигура 15



Фигура 16



Фигура 17



ОТЧЕТ О ПАТЕНТНОМ ПОИСКЕ
(статья 15(3) ЕАПК и правило 42 Патентной инструкции к ЕАПК)

Номер евразийской заявки:

201992513

А. КЛАССИФИКАЦИЯ ПРЕДМЕТА ИЗОБРЕТЕНИЯ:

A61K 39/395 (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

Согласно Международной патентной классификации (МПК)

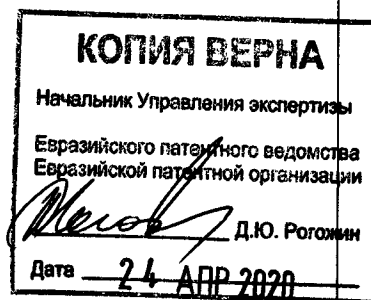
Б. ОБЛАСТЬ ПОИСКА:

Просмотренная документация (система классификации и индексы МПК)
A61K31/7088; A61K39/00; A61K39/395; A61K48/00; C07K16/18; C07K16/30; C12N15/13; G01N33/574
C07K 16/18, A61P 35/00, A61P 35/04

Электронная база данных, использовавшаяся при поиске (название базы и, если, возможно, используемые поисковые термины)
ЕАПАТИС, Espacenet, Patentscope, PubMed, NCBI

В. ДОКУМЕНТЫ, СЧИТАЮЩИЕСЯ РЕЛЕВАНТНЫМИ

Категория*	Ссылки на документы с указанием, где это возможно, релевантных частей	Относится к пункту №
Y	WO 2010/060186 (ALETHIA BIOTHERAPEUTICS INC, CA) Стр. 4, стр. 65 Стр. 6, п. 125 формулы изобретения Стр. 5, стр. 64 Стр. 59, п. 128 формулы изобретения Стр. 60 Стр. 63 Формула изобретения п. 169, 170 П. 157-158 SEQ ID NOs: 74-90	1-2, 3 4 3 7 8 9 1-2 3 5-6
Y	WO 2011/054112 (ALETHIA BIOTHERAPEUTICS INC, CA) Стр. 4, стр. 79 Стр. 6 Формула изобретения п. 59, 60 П. 79, 80 П. 42 SEQ ID NOs: 178, 179, 182, 183	1-2 4 1-2 3 7,8 5-6
P,X	WO 2012/129668 (ALETHIA BIOTHERAPEUTICS INC, CA) Стр. 4 Стр. 5-6 Стр. 17, 35-37 Стр. 37 Формула изобретения, п. 32-33 П. 47-48 SEQ ID NOs: 5, 56, 7-10	1-2, 3 4 7-8 9 1-2 3 5-6



☐ последующие документы указаны в продолжении

* Особые категории ссылочных документов:

«А» - документ, определяющий общий уровень техники
«D» - документ, приведенный в евразийской заявке
«Е» - более ранний документ, но опубликованный на дату подачи евразийской заявки или после нее
«О» - документ, относящийся к устному раскрытию, экспонированию и т.д.
«Р» - документ, опубликованный до даты подачи евразийской заявки, но после даты испрашиваемого приоритета"

«Т» - более поздний документ, опубликованный после даты приоритета и приведенный для понимания изобретения
«Х» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий новизну или изобретательский уровень, взятый в отдельности
«У» - документ, имеющий наиболее близкое отношение к предмету поиска, порочащий изобретательский уровень в сочетании с другими документами той же категории
«&» - документ, являющийся патентом-аналогом
«L» - документ, приведенный в других целях

Дата проведения патентного поиска: **22/04/2020**

Уполномоченное лицо:
Заместитель начальника Управления экспертизы
Начальник отдела химии и медицины

Сотласовано в электронном виде

А.В.Чебан