

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **038979**(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2021.11.17

(21) Номер заявки
201391423

(22) Дата подачи заявки
2012.03.28

(51) Int. Cl. **C07K 16/30** (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 35/04 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

**(54) АНТИТЕЛА К АССОЦИИРОВАННОМУ С ПОЧКАМИ АНТИГЕНУ 1 И ИХ
АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ**

(31) 61/470,063; 61/533,346

(32) 2011.03.31; 2011.09.12

(33) US

(43) 2014.06.30

(86) PCT/CA2012/000296

(87) WO 2012/129668 2012.10.04

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

(72) Изобретатель:
Тремблэ Жилье Бернар, Морайтис
Анна Н., Сулеа Трейен, Филион
Марио (СА)

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

(56) WO-2010060186

RUDNICK, S.I. et al., "Influence of affinity and antigen internalization on the uptake and penetration of Anti-HER2 antibodies in solid tumors", Cancer Research, March 15, 2011, Vol. 71, No. 6, p. 2250-2259, ISSN: 0008-5472, the whole document

(57) В данном документе раскрыты новые антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с КААG1 и которые можно применять при лечении, выявлении и диагностике рака с клетками, экспрессирующими КААG1. Также раскрыты клетки, экспрессирующие антитела и антигенсвязывающие фрагменты, а также способы выявления и лечения рака при помощи антител и фрагментов. Типы рака, на которые может оказывать благоприятное воздействие лечение или выявление, включают карциному яичников, рак почек, рак легких, колоректальный рак, рак молочной железы, рак головного мозга и рак простаты, а также виды меланомы.

B1**038979****038979****B1**

Область настоящего изобретения

Настоящее изобретение относится к конкретным антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с ассоциированным с почками антигеном 1 (КААГ1), и их применению для лечения, выявления и диагностики рака. В частности, рассматривается доставка терапевтического средства к клеткам при помощи данных антител или антигенсвязывающих фрагментов.

Предшествующий уровень техники изобретения

Среди гинекологических злокачественных новообразований карцинома яичников является причиной наиболее высокой смертности, связанной с опухолями, у женщин в Соединенных Штатах (Jemal et al., 2005). Это четвертая основная причина связанной с раком смерти у женщин в США (Menon et al., 2005). В 2005 году Американское онкологическое общество установило в общей сложности 22220 новых случаев, и 16210 смертей было обусловлено данным заболеванием (Bonome et al., 2005). За последние 30 лет статистические данные остались на таком же высоком уровне - большинство женщин, у которых развивается карцинома яичников, умрут от данного заболевания (Chambers and Vanderhyden, 2006). Заболевание характеризуется пожизненным риском 1:70 и коэффициентом смертности >60% (Chambers and Vanderhyden, 2006). Высокий коэффициент смертности является следствием проблем, связанных с ранним определением карциномы яичников, при метастазировании злокачественной опухоли за пределы яичников. Фактически, у >80% пациенток заболевание диагностируют на более поздних стадиях (III или IV стадия) (Bonome et al., 2005). Такие пациентки имеют неблагоприятный прогноз, который отражается в <45% коэффициенте 5-летней выживаемости, несмотря на то, что 80-90% с самого начала реагируют на химиотерапию (Berek et al., 2000). Этот повышенный успех по сравнению с 20% коэффициентом 5-летней выживаемости в более ранние годы по меньшей мере частично обусловлен возможностью оптимально сокращать опухолевую ткань, когда она находится на яичнике, что является значительным прогностическим фактором для карциномы яичников (Bristow R.E., 2000; Brown et al., 2004). У пациенток, у которых диагностировали заболевание на ранней стадии (I стадия), коэффициент 5-летней выживаемости варьирует от >90 (Chambers and Vanderhyden, 2006).

Карцинома яичников включает гетерогенную группу опухолей, которые происходят из поверхностного эпителия яичника или из поверхностных включений. Их классифицируют на серозные, муцинозные, эндометриоидные, светлоклеточные типы и по типу Бреннера (переходные) в соответствии с различными типами эпителия в органах женских половых путей (Shin and Kurman, 2005). Среди них серозные опухоли составляют ~60% диагностируемых случаев карциномы яичников. Каждую гистологическую субкатегорию дополнительно разделяют на три группы: доброкачественная, промежуточная (пограничная опухоль или опухоль с низким злокачественным потенциалом (LMP)) и злокачественная, отражающие их клинический характер (Seidman et al., 2002). LMP представляет от 10 до 15% опухолей, диагностированных как серозные, и является загадкой, так как они демонстрируют атипичную структуру ядра и метастатическое поведение, а также они являются в значительной степени менее агрессивными, чем высокодифференцированные серозные опухоли. Коэффициент 5-летней выживаемости пациенток с опухолями LMP составляет 95% в отличие от <45% выживания при прогрессирующем высокодифференцированном заболевании за такой же период (Berek et al., 2000).

В настоящее время диагностику карциномы яичников выполняют, частично, посредством стандартного анализа по истории болезни пациенток и выполнением физических, ультразвуковых и рентгенологических обследований и гематологического скрининга. Описаны две альтернативные методики для раннего гематологического выявления серозных биомаркеров. Один подход представляет собой анализ серологических образцов при помощи масс-спектрометрии для обнаружения белков или фрагментов белков неизвестного типа, который выявляет наличие или отсутствие рака (Mor et al., 2005; Kozak et al., 2003). Однако эта методика является дорогостоящей и не широкодоступной. Кроме того, наличие или отсутствие известных белков/пептидов в сыворотке выявляют с применением микрочипов с антителами, ELISA или других сходных подходов. Серологическое тестирование на белковый биомаркер, называемый СА-125 (раковый антиген - 125), уже давно широко применяют в качестве маркера на карциному яичников. Однако, несмотря на то, что клетки карциномы яичников могут продуцировать избыток таких белковых молекул, существуют некоторые другие виды рака, включая рак фаллопиевой трубы или эндометриальный рак (рак выстилки матки), 60% людей с раком поджелудочной железы и 20-25% людей с другими злокачественными опухолями с повышенным уровнем СА-125. Анализ на СА-125 дает на выходе только истинно положительный результат для приблизительно 50% пациенток с I стадией карциномы яичников и имеет 80% шанс отображения истинно положительных результатов для пациенток с II, III и IV стадией карциномы яичников. Другие 20% пациенток с карциномой яичников не демонстрируют какого-либо повышения концентраций СА-125. Кроме того, тест на повышенный СА-125 может указать на иную доброкачественную активность, не связанную с раком, такую как менструация, беременность или эндометриоз. Следовательно, данный тест имеет очень ограниченное клиническое применение для выявления заболевания на ранней стадии, когда оно все еще поддается лечению, демонстрируя положительную прогностическую значимость (PPV) <10%. Даже с учетом ультразвукового скрининга СА-125, PPV повышается только до около 20% (Kozak et al., 2003). Таким образом, данный тест не является эффективным скрининг-тестом.

Несмотря на возросшие знания об этиологии заболевания, агрессивное циторедуктивное хирургическое вмешательство и современную комбинированную химиотерапию, произошло лишь небольшое изменение смертности. Неблагоприятные исходы связаны с (1) недостатком надлежащих скрининг-тестов для выявления заболевания на ранней стадии в сочетании лишь с едва различимым проявлением симптомов на данной стадии - диагноз часто ставят лишь после прогрессирования до более поздних стадий, при которых перитонеальная диссеминация рака ограничивает эффективное лечение, и (2) частым развитием устойчивости к стандартным химиотерапевтическим подходам, что ограничивает повышение коэффициента 5-летней выживаемости пациенток. Изначальная схема химиотерапии для карциномы яичников включает комбинацию карбоплатины (параплатины) и паклитаксела (таксола). Годы клинических испытаний доказали, что данная комбинация является наиболее эффективной после успешного хирургического вмешательства - уменьшает объем опухоли у приблизительно 80% женщин с впервые диагностированной карциномой яичников, и у 40-50% будет полная регрессия - но исследования продолжают поиск путей улучшения ответа у пациенток. Эффективность была повышена благодаря существующим в настоящее время абдоминальным инфузиям химиотерапевтических препаратов для нацеливания на труднодоступные клетки в сочетании с внутривенной доставкой. Тем не менее тяжелые побочные эффекты часто приводят к прерыванию курса лечения. Некоторые другие химиотерапевтические средства включают доксорубин, цисплатин, циклофосфамид, блеомицин, этопозид, винбластин, топотекана гидрохлорид, ифосфамид, 5-фторурацил и мелфалан. Совсем недавно клинические испытания продемонстрировали, что внутрибрюшинное введение цисплатина обеспечивает повышение выживаемости по сравнению с системной внутривенной химиотерапией (Cannistra and McGuire, 2007). Отличные коэффициенты выживаемости для женщин с заболеванием на ранней стадии, которые получают химиотерапию, дают серьезные основания для научно-исследовательских работ с целью разработать стратегии улучшения выявления карциномы яичников. Кроме того, открытие новых биомаркеров, связанных с карциномой яичников, приведет к разработке более эффективных терапевтических стратегий с минимальными побочными эффектами для последующего лечения карциномы яичников.

Несмотря на данные последние достижения в понимании и лечении карциномы яичников, 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. По мере увеличения количества проходящих клинических испытаний начинает обнаруживаться возможность применения моноклональных антител для терапии карциномы яичников (Oei et al., 2008; Nicodemus and berek, 2005). В большинстве из этих испытаний было изучено применение моноклональных антител, конъюгированных с радиоизотопами, такими как иттрий-90, или антител, которые нацеливаются на опухолевые антигены, которые уже идентифицированы у других типов рака. Примером этого является применение бевацизумаба, который нацелен на фактор роста сосудистого эндотелия (Burger, 2007). Существуют очень небольшое количество антигенов, специфических для карциномы яичников, которые на данный момент исследуются в качестве терапевтических целей для моноклональных антител. Некоторые примеры включают применение белка под названием B7-H4 (Simon et al., 2006) и согласно более поздним данным применение рецептора фоллиевой кислоты альфа (Ebel et al., 2007), при этом последний недавно вошел во II фазу клинических испытаний.

Ассоциированный с почками антиген 1 (KAAG1) изначально клонировали из библиотеки кДНК, полученной из линии клеток гипернефромы с антигеном B7 главного комплекса гистосовместимости, в качестве антигенного пептида, презентуемого цитотоксическим Т-лимфоцитам (Van den Eynde et al., 1999; номер доступа в Genbank Q9UBP8, SEQ ID NO: 28; 29). Было обнаружено, что локус, содержащий KAAG,1 кодирует два гена, транскрибируемых 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 транскрибируется 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 опубликованной патентной заявке № PCT/CA2007/001134 (полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки). Van den Eynde et al., также наблюдали экспрессию РНК при гипернефромах, колоректальных карциномах, меланом, саркомах, лейкозах, опухолях головного мозга, опухолях щитовидной железы, карциномах молочной железы, карциномах предстательной железы, карциномах пищевода, опухолях мочевого пузыря, карциномах легких и опухолях головы и шеи. Недавно, в результате исследований неравновесного сцепления было получено убедительное генетическое доказательство, демонстрирующее, что 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 виновника у пациентов с дислексией, 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).

Краткое описание изобретения

Настоящее изобретение относится к конкретным антителам к КААG1 и антигенсвязывающим фрагментам и их применению для лечения, выявления и диагностики злокачественного новообразования, содержащего опухолевые клетки, экспрессирующие КААG1 или вариант КААG1. Иллюстративные варианты осуществления такого злокачественного новообразования включают, например, карциному яичников, рак кожи, рак почек, колоректальный рак, саркому, лейкоз, рак головного мозга, рак щитовидной железы, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак пищевода, рак мочевого пузыря, рак легких и рак головы и шеи.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть особенно эффективны при воздействии на КААG1 или вариант КААG1, экспрессируемый на поверхности опухолевых клеток.

Фактически, антитела и антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения, по-видимому, обладают повышенной способностью связываться с КААG1-экспрессирующими опухолевыми клетками по сравнению, например, с антителами 3D3 и 3G10, раскрытыми в PCT/CA2009/001586 (полное содержание которой включено в данный документ при помощи ссылки). Данные антитела и антигенсвязывающие фрагменты также интернализируются и, следовательно, могут быть пригодны для доставки терапевтических средств в опухолевые клетки. Результаты, полученные авторами настоящего изобретения, позволяют предположить, что антитела и антигенсвязывающие фрагменты, обладающие необходимыми характеристиками (например, повышенным связыванием и интернализацией), обычно связываются с С-концевым участком КААG1, ограниченным аминокислотами 61-84. Тем не менее, хотя как антитела 3A4, так и антитела 3G10 связываются с одним и тем же участком, антитело 3A4, по-видимому, связывается с поверхностью опухолевых клеток более эффективно, чем антитело 3G10. В частности, раковые клетки, которые экспрессируют антиген КААG1, нуждаются в примерно 10-кратном меньшем количестве 3A4 по сравнению с 3G10 в экспериментах с применением проточной цитометрии, подходе, который измеряет непосредственное связывание антител с поверхностью клеток. Кроме того, в экспериментах по связыванию с применением поверхностного плазмонного резонанса было обнаружено, что аффинность 3A4 к КААG1 составляет менее 10 пмоль, в то время как антитела 3D3 и 3G10 демонстрировали аффинности более 200 нмоль (20-кратно меньшую аффинность). Таким образом, ожидается, что эти увеличения связывающей способности 3A4 перейдут в повышенную терапевтическую активность.

Настоящее изобретение в одном своем аспекте обеспечивает выделенное или практически очищенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, который может быть способен к специфическому связыванию с последовательностью, которая идентична по меньшей мере 10 (например, 10-20 или более) последовательным аминокислотам, расположенным между аминокислотами 61-84 КААG1 (SEQ ID NO: 29).

Настоящее изобретение также обеспечивает выделенные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, способные конкурировать с антителом или антигенсвязывающим фрагментом, описанным в данном документе.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение относится к конкретным антителами или антигенсвязывающим фрагментам с аминокислотными последовательностями, описанными в данном документе. Такие антитела или антигенсвязывающие фрагменты могут быть в форме моноклональных антител, поликлональных антител, химерных антител, гуманизированных антител и антител человека (выделенных), а также антигенсвязывающих фрагментов, обладающих характеристиками, описанными в данном документе. Также настоящим изобретением охватываются антитела и антигенсвязывающие фрагменты, содержащие пермутации легких и/или тяжелых цепей между моноклональным, химерным, гуманизированным антителом или антителом человека.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты настоящего изобретения могут, таким образом, содержать аминокислоты человеческих константных участков и/или каркасные аминокислоты антитела человека.

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 три CDR, обозначенных в данном документе как CDRL1 или L1, CDRL2 или L2 и CDRL3 или L3, фланкированные каркасными участками. Переменный участок тяжелой цепи содержит три CDR, обозначенных в данном документе как CDRH1 или H1, CDRH2 или H2 и CDRH3 или H3, фланкированные каркасными участками. CDR гуманизированных антител настоящего изобретения были идентифицированы при помощи определений по Kabat и Chotia (например, CDRH2, изложенный в SEQ ID NO: 56). Однако другие авторы (Abhinandan and Martin, 2008) применили модифицированные подходы, в общих чертах основанные на Kabat и Chotia, что в результате привело к очерчиванию более коротких CDR (например, CDRH2, изложенного в SEQ ID NO: 6).

Термин "антигенсвязывающий фрагмент", применяемый в данном документе, относится к одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность связываться с антигеном (напри-

мер, КААG1, секретируемой формой КААG1 или его вариантами). Было показано, что антигенсвязывающая функция антитела может осуществляться фрагментами интактного антитела. Примеры связывающих фрагментов, охватываемых термином "антигенсвязывающий 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, соединенных посредством дисульфидного мостика 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). Такие одноцепочечные антитела также предполагаются как охватываемые термином "антигенсвязывающий фрагмент" антитела. Кроме того, антигенсвязывающие фрагменты включают химерные белки иммуноглобулинов со связывающим доменом, содержащие (i) полипептид со связывающим доменом (как, например, вариабельный участок тяжелой цепи, вариабельный участок легкой цепи или вариабельный участок тяжелой цепи, слитый с вариабельным 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 химерные белки иммуноглобулина со связывающим доменом дополнительно раскрыты в US 2003/0118592 и US 2003/0133939. Такие фрагменты антитела получают при помощи общепринятых способов, известных специалистам в данной области техники, и фрагменты подвергают скринингу на пригодность таким же образом, как и интактные антитела.

Термин "гуманизированное антитело" охватывает полностью гуманизированное антитело (т.е. каркасы являются 100% гуманизированными) и частично гуманизированное антитело (например, по меньшей мере один вариабельный домен содержит одну или несколько аминокислот из антитела человека, в то время как другие аминокислоты являются аминокислотами антитела, происходящего не от человека). Как правило, "гуманизированное антитело" содержит CDR антитела, происходящего не от человека (например, мыши, крысы, кролика, низшего примата и т.д.), и каркасы, которые идентичны каркасам естественного антитела человека или консенсусной последовательности антитела человека. В таком случае такие "гуманизированные антитела" характеризуют как полностью гуманизированные. "Гуманизированное антитело" может также содержать одну или несколько аминокислотных замен, которые не имеют сходство с заменами у антитела человека или консенсусной последовательности антитела человека. Такие замены включают, например, обратные мутации (например, повторное введение аминокислот, которых нет в антителе человека), которые могут сохранять характеристики антитела (например, аффинность, специфичность и т.д.). Такие замены обычно находятся в каркасном участке. "Гуманизированное антитело" необязательно также содержит по меньшей мере часть константного участка (Fc), который, как правило, является участком из антитела человека. Как правило, константный участок "гуманизированного антитела" идентичен таковому в антителе человека.

Термин "естественное антитело человека" относится к антителу, которое кодируется (кодируемое) репертуаром антител человека, т.е. последовательностью зародышевой линии.

Термин "химерное антитело" относится к антителу с вариабельным(и) участком(ами), происходящему не от человека, и константным участком человека.

Термин "гибридное антитело" относится к антителу, содержащему один его вариабельный участок тяжелой или легкой цепи (его тяжелой или легкую цепь) от определенных типов антитела (например, гуманизированного), в то время как другой вариабельный участок легкой или тяжелой цепи (тяжелая или легкая цепь) происходит от другого типа (например, мышинный, химерный).

В некоторых вариантах осуществления каркасный участок тяжелой цепи и/или легкой цепи гуманизированного антитела может содержать от 1 до 30 аминокислот из антитела, происходящего не от человека, которое стремятся гуманизировать, и оставшуюся часть, происходящую от естественного антитела человека или консенсусной последовательности антитела человека. В некоторых случаях гуманизированное антитело может содержать от одного до шести CDR, происходящих не от человека, и часто шесть CDR являются происходящими не от человека.

Естественное антитело человека, выбранное для гуманизации антитела, происходящего не от человека, может содержать вариабельный участок с трехмерной структурой, подобной структуре (совпадающей при наложении) (моделированного) вариабельного участка антитела, происходящего не от человека. В связи с этим гуманизированное антитело имеет больший шанс иметь трехмерную структуру, подобную структуре антитела, происходящего не от человека.

Вариабельный участок легкой цепи естественного антитела человека, выбранного с целью гуманизации, может иметь, например, в целом (по всему вариабельному участку легкой цепи) по меньшей мере 70, 75, 80% и т.д. идентичности с таковым антителом, происходящим не от человека. Кроме того, каркасный участок легкой цепи естественного антитела человека, выбранного с целью гуманизации, может иметь, например, по меньшей мере 70, 75, 80, 85% и т.д. идентичности последовательности с каркасным участком легкой цепи антитела, происходящего не от человека. В некоторых вариантах осуществления естественное антитело человека, выбранное с целью гуманизации, может иметь такое же или практически такое же число аминокислот в его определяющем комплементарность участке легкой цепи по сравнению с таковым в определяющем комплементарность участке легкой цепи антитела, происходящего не от человека.

Вариабельный участок тяжелой цепи естественного антитела человека, выбранного с целью гуманизации, может иметь, например, в целом (по всему вариабельному участку тяжелой цепи) по меньшей мере 60, 70, 75, 80% и т.д. идентичности с таковым антителом, происходящим не от человека. Также, в соответствии с настоящим изобретением аминокислотные остатки каркасного участка, происходящего от человека, тяжелой цепи гуманизированного антитела могут происходить от каркасного участка тяжелой цепи естественного антитела человека, обладающего по меньшей мере 70, 75, 89% и т.п. идентичностью с каркасным участком тяжелой цепи антитела, происходящего не от человека. В некоторых вариантах осуществления естественное антитело человека, выбранное с целью гуманизации, может иметь такое же или практически такое же число аминокислот в его определяющем комплементарность участке тяжелой цепи по сравнению с таковым определяющим комплементарность участком тяжелой цепи антитела, происходящего не от человека.

Естественное антитело человека, которое выбирают для гуманизации антитела, происходящего не от человека, может содержать вариабельный участок с трехмерной структурой подобной структуре (совпадающей при наложении) (моделированного) вариабельного участка антитела, происходящего не от человека. В связи с этим гуманизированное или гибридное антитело имеет больший шанс иметь трехмерную структуру, подобную структуре антитела, происходящего не от человека.

Например, вариабельный участок тяжелой цепи естественного антитела человека, который может быть выбран с целью гуманизации, может иметь следующие характеристики: а) трехмерную структуру, подобную или идентичную (совпадающую при наложении) таковой тяжелой цепи антитела, происходящего не от человека, и/или б) каркасный участок с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70% идентична каркасному участку тяжелой цепи антитела, происходящего не от человека. Необязательно, аминокислотные остатки (их число) CDR тяжелой цепи (например, все три CDR) являются такими же или практически такими же, как и аминокислотные остатки (их число) CDR тяжелой цепи, происходящей не от человека.

Альтернативно, вариабельный участок легкой цепи естественного антитела человека, который может быть выбран с целью гуманизации, может иметь следующие характеристики: а) трехмерную структуру, подобную или идентичную (совпадающую при наложении) таковой легкой цепи антитела, происходящего не от человека, и/или б) каркасный участок с аминокислотной последовательностью, которая по меньшей мере на 70% идентична с каркасным участком легкой цепи антитела, происходящего не от человека. Необязательно, аминокислотные остатки (их число) CDR легкой цепи (например, все три CDR) являются такими же или практически такими же, как и аминокислотные остатки (их число) CDR легкой цепи, происходящей не от человека.

Обычный сайт связывания антигена находится в составе вариабельных участков, сформированных путем спаривания иммуноглобулина легкой цепи и иммуноглобулина тяжелой цепи. Структура вариабельных участков антитела является очень устойчивой и демонстрирует очень сходные структуры. Такие вариабельные участки обычно содержат сравнительно гомологичные каркасные участки (FR), прерываемые тремя гипервариабельными участками, называемыми определяющие комплементарность участки (CDR). Общая связывающая активность антигенсвязывающего фрагмента часто обуславливается последовательностью CDR. FR часто играют некоторую роль в точном моделировании и выравнивании CDR по трем измерениям для оптимального связывания антигена.

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

Дополнительный объем, применимость и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из неограничивающего подробного описания, приведенного ниже. Следует понимать, однако, что такое подробное описание, несмотря на то, что приводит иллюстративные варианты осуществления настоящего изобретения, приведено только в качестве примера, со ссылкой на сопровождающие графические материалы.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны результаты ELISA, в котором сравнивают связывание химерного антитела 3A4 к KAAG1 с контрольным антителом при инкубировании с повышающимися концентрациями рекомбинантного KAAG1 человека. Кривая связывания 3A4 показана при помощи линии, окрашенной в более

светлый цвет.

На фиг. 2 показана гистограмма, которая описывает результаты анализов ELISA для картирования специфичности эпитопа антитела 3A4 к КААG1. Результаты показали, что 3A4 взаимодействовал с последовательностью аминокислот, содержащейся на карбоксильном конце КААG1 между аминокислотами 61-84. Связывание 3A4 сравнили с 3C4, 3D3 и 3G10 антителами к КААG1, которые, как было известно, взаимодействуют с участками 1-35, 36-60 и 61-84 КААG1 соответственно.

На фиг. 3А показаны результаты проточной цитометрии, осуществленной на клетках SKOV-3 и TOV-21G карциномы яичника с антителом 3A4 к КААG1 (более темная линия) по сравнению с контрольным IgG (более светлая линия).

На фиг. 3В показаны результаты проточной цитометрии, осуществленной на клетках 293Е почки человека с антителом 3A4 к КААG1 (более темная линия) по сравнению с контрольным IgG (более светлая линия).

На фиг. 4 представлено выявление антигена КААG1 на поверхности клеток SKOV-3 при помощи проточной цитометрии с антителом 3A4 к КААG1. Флуоресцентный сигнал снижается со временем при инкубировании клеток при 37°C, что свидетельствует о том, что комплекс КААG1/антитело интернализировался в ходе инкубирования при инкубации клеток с 3A4.

На фиг. 5 показана интернализация антитела 3A4 к КААG1 и его совместная локализация с LAMP1, белком, ассоциированным с эндосомальными и лизосомальными мембранами.

На фиг. 6А и 6В графически отображены результаты анализа FACS опухолевых клеток, на которые воздействовали различными антителами к КААG1.

На фиг. 7 схематически представлены две возможные модели ориентации КААG1 в клеточной мембране.

На фиг. 8 представлена молекулярная модель (ленточная схема) мышинового варибельного домена 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 у легкой цепи и H1, H2 и H3 у тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым.

На фиг. 9А показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh1Hh1 (т.е. гуманизированной легкой цепи 1 и гуманизированной тяжелой цепи 1) варибельных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 у легкой цепи и H1, H2 и H3 у тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышинового каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh1 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 1, а Hh1 обозначал тяжелую цепь варианта 1.

На фиг. 9В показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh1Hh2 (т.е. гуманизированной легкой цепи 1 и гуманизированной тяжелой цепи 2) варибельных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 в легкой цепи и H1, H2 и H3 в тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышинового каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh1 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 1, а Hh2 обозначал тяжелую цепь варианта 2.

На фиг. 9С показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh1Hh3 (т.е. гуманизированной легкой цепи 1 и гуманизированной тяжелой цепи 3) варибельных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 в легкой цепи и H1, H2 и H3 в тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышинового каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh1 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 1, а Hh3 обозначал тяжелую цепь варианта 3.

На фиг. 9D показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh1Hh4 (т.е. гуманизированной легкой цепи 1 и гуманизированной тяжелой цепи 4) варибельных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 у легкой цепи и H1, H2 и H3 у тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышинового каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh1 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 1, а Hh4 обозначал тяжелую цепь варианта 4.

На фиг. 9Е показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh2Hh1 (т.е. гуманизированной легкой цепи 2 и гуманизированной тяжелой цепи 1) варибельных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 в легкой цепи и H1, H2 и H3 в тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышинового каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh2 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 2, а Hh1 обозначал тяжелую цепь варианта 1.

На фиг. 9F показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh2Hh2 (т.е. гуманизированной легкой цепи 2 и гуманизированной тяжелой цепи 2) варибельных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 в легкой цепи и H1, H2 и H3 в тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышинового каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh2 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 2, а Hh2 обозначал тяжелую цепь варианта 2.

На фиг. 9G показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh2Hh3 (т.е. гуманизиро-

ванной легкой цепи 2 и гуманизированной тяжелой цепи 3) переменных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 в легкой цепи и H1, H2 и H3 в тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышиного каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh2 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 2, а Hh3 обозначал тяжелую цепь варианта 3.

На фиг. 9H показаны молекулярные модели гуманизированного антитела Lh2Hh4 (т.е. гуманизированной легкой цепи 2 и гуманизированной тяжелой цепи 4) переменных доменов 3A4. Петли CDR окрашены в черный и обозначены L1, L2 и L3 в легкой цепи и H1, H2 и H3 в тяжелой цепи. Каркасный участок показан серым. Боковые цепи остатков, мутировавших из мышиного каркаса в человеческий каркас, представлены в виде шаростержневой модели. Lh2 обозначал гуманизированную легкую цепь варианта 2, а Hh4 обозначал тяжелую цепь варианта 4.

На фиг. 10A показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных доменов 3A4 мышиных 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 мышиными аминокислотами, представлены подчеркнутыми для гуманизированных последовательностей.

На фиг. 10B показано выравнивание аминокислотных последовательностей переменных доменов 3A4 мышиных и гуманизированных тяжелых цепей. Тяжелая цепь имеет четыре гуманизированных варианта (Hh1-Hh4). CDR показаны жирным и обозначены CDRH1, CDRH2 и CDRH3. Обратные мутации в каркасных участках человека, которые являются мышиными аминокислотами, представлены подчеркнутыми для гуманизированных последовательностей.

На фиг. 11A 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 $\geq 0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 11B показано выравнивание переменного участка тяжелой цепи 3A4 мыши (SEQ ID NO: 2) с вариантом переменного участка легкой цепи (SEQ ID NO: 38) при помощи программы ClustalW2 (Larkin M.A., et al. (2007), ClustalW и ClustalX версия 2. Bioinformatics, 2007, 23(21):2947-2948), в которой "*" (звездочка) указывает на положения, которые имеют отдельный, полностью сохраненный остаток, где ":" (двоеточие) указывает на консервативность между группами с сильно схожими свойствами - подсчет $>0,5$ по матрице Gonnet PAM 250 и где "." (точка) обозначает консервативность между группами с мало схожими свойствами - подсчет $\geq 0,5$ по матрице Gonnet PAM 250.

На фиг. 12A представлена карта плазмиды pKCR5-3A4-HC-Variant 1. Тяжелые цепи гуманизированных вариантов 3A4 клонировали таким же образом в сайт Hind III pK-CR5. Следовательно, полученные в результате плазмиды идентичны pKCR5-3A4-HC-Variant 1, за исключением последовательности переменного домена тяжелой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 12B представлена карта плазмиды pMPG-CR5-3A4-LC-Variant 1. Легкие цепи гуманизированных вариантов 1 и 2 антитела 3A4 клонировали таким же способом в сайт BamHI pMPG-CR5. Следовательно, полученная в результате плазмиды идентична pMPG-CR5-3A4-LC-Variant 1, за исключением последовательности переменного домена легкой цепи иммуноглобулина.

На фиг. 13 представлен анализ получения антитела после временной трансфекции в клетках CHO. Супернатант (13 дней после трансфекции) клеток CHOcTA, трансфицированных различными комбинациями легких или тяжелых цепей гуманизированного антитела 3A4, проанализировали при помощи вестерн-блоттинга. Количественный анализ антитела, полученного в супернатантах, определили после сканирования бэндов вестерн-блоттинга против разбавления известного стандарта (очищенного антитела IgG человека). Mг маркер молекулярного веса (кДа).

На фиг. 14 представлено графическое отображение результатов гель-фильтрации в Superdex G75 образца рекомбинантного КААГ1. КААГ1 ввели в ходе гель-фильтрации и разделили при 0,4 мл/мин. Наивысший пик между фракциями 15-19.

На фиг. 15 представлена таблица, в которой перечислены константы скорости и аффинности для мышиных и гуманизированных вариантов антитела 3A4.

На фиг. 16А изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости ассоциации (K_a) гуманизированных антител.

На фиг. 16В изображена гистограмма, иллюстрирующая скорости диссоциации (K_d) гуманизированных антител.

На фиг. 16С изображена гистограмма, иллюстрирующая аффинные константы (K_D) гуманизированных антител.

На фиг. 17А проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с КААГ1 в 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 фиг. 17В проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с КААГ1 в ELISA. На данной фигуре продемонстрировано 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 фиг. 18 проиллюстрировано связывание вариантов гуманизированного 3A4 с КААГ1 на поверхности раковых клеток. На данной иллюстрации продемонстрирована сравнительная связывающая активность гуманизированных и мышинных антител 3A4 на неприменимых клетках карциномы яичника SKOV-3.

Подробное описание изобретения

Экспрессия и биологическая активность КААГ1 в раковых клетках.

Настоящее изобретение относится к применению антител для нацеливания на опухоли, обнаруживаемые при различных типах рака, в частности карциноме яичников. Для того чтобы направить антитела к опухолям, нужно осуществить определение опухолеспецифических антигенов, которые экспрессируются на клеточной поверхности раковых клеток. Существует несколько методик, которые доступны для определения опухолеспецифических антигенов, и способ, который применяли для определения КААГ1 в опухолях яичников, новаторская платформа для обнаружения, называемая субтрактивной транскрипционной амплификацией мРНК (STAR), описана в публикации патентной заявки № PCT/CA2007/001134, опубликованной под № WO/2007/147265 27 декабря 2007 г.

Анализ STAR-библиотек карциномы яичников дал множество генов, которые кодируют секретруемые белки и клеточно-поверхностные белки. Один из них, называемый AB-0447, содержал открытую рамку считывания, которая кодировала полипептид из 84 аминокислот, соответствующий SEQ ID NO: 29, который закодировали с помощью кДНК из 885 пар оснований с нуклеотидной последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 28. При поиске общедоступных баз данных выявили, что нуклеотидная последовательность AB-0447 была идентична последовательности гена, называемого КААГ1. Биоинформационный анализ дал прогноз в отношении белка, заякоренного в мембране, у которого его функциональный домен выставлен во внеклеточное пространство. КААГ1 изначально клонировали из библиотеки клеток рака почки в качестве антигена клеточной поверхности, результат, который подтверждает его мембранную локализацию. Дополнительно, исследование авторов настоящего изобретения показало, что белок был процессирован на своем аминоконце, результат, который указывал на расщепление функционального сигнального пептида по 30 и 34 аминокислоте или между ними. Кроме того, временная экспрессия полноразмерной кДНК приводила к выявлению расщепленного КААГ1 в культуральной среде. Данное последнее обнаружение указывало на то, что данный белок, заякоренный в мембране, может быть выброшен из клеток при его высоких уровнях экспрессии. В отличие от этого, экспрессия укороченного по аминоконцу мутанта КААГ1 приводила к удерживанию белка внутри клетки. В настоящее время не существуют опубликованных данных, которые проливали бы какой-либо свет на его функцию, и никогда ранее не сообщалось о сверхэкспрессии КААГ1 при карциноме яичников, как раскрыто настоящим изобретением.

Авторы настоящего изобретения, таким образом, исследовали, можно ли КААГ1 применять для диагностики и терапии на основе антител.

Было построено несколько моделей, основанных на клетках карциномы яичников, как, например, TOV-21G, TOV-112D, OV-90 и другие, и они хорошо известны специалистам в данной области техники. Такие клетки являются частью коллекции линий клеток карциномы яичников, полученных от пациенток с опухолями яичников или из жидкости асцитов. Такие линии клеток были подвергнуты детальному анализу, включая общие наборы экспрессирующихся генов на микрочипах, что делает их отличными клеточными моделями для карциномы яичников человека. Свойства роста, наборы экспрессирующихся генов и реакция на химиотерапевтические лекарственные средства указали на то, что такие линии клеток являются очень показательными относительно поведения *in vivo* опухоли яичников (BenoTt et al., 2007). RT-PCR анализ общей РНК, выделенной из таких линий клеток карциномы яичников, показал, что транскрипт КААГ1 слабо экспрессировался в линиях клеток, полученных от первичных опухолей. В отличие от этого, линии клеток, полученные из асцитической жидкости, имели высокие уровни экспрессии КААГ1. Повышенная экспрессия КААГ1 в клетках из асцитической жидкости свидетельствовала о том, что окружающая среда клеток влияет на регуляцию гена КААГ1. Асцитные клетки, ассоциированные с прогрессирующим заболеванием, и такой паттерн экспрессии означают, что повышенные уровни КААГ1 ассоциированы с "безъякорным" ростом клеток. В соответствии с этим последним обстоятельством было обнаружено, что экспрессия КААГ1 значительно повышается в линиях клеток, полученных от первичных опухолей, когда такие клетки были культивированы как сфероиды в 3D-культурах. Такие сфероиды были подробно охарактеризованы и, как было обнаружено, отражают многие связанные с опухолями свойства *in vivo* (Cody et al., 2008). Таким образом, было обнаружено, что экспрессия КААГ1 значительно повышалась в моделях, которые имитируют развитие опухоли, в частности в ходе развития

карциномы яичников.

При помощи демонстрации того, что экспрессия КААG1 регулируется в клетках карциномы яичника, функцию этого гена в поведении клеток карциномы яичника исследовали в клеточном анализе. Для такого эффекта применили РНК-интерференцию (RNAi) для нокаутирования экспрессии эндогенного гена КААG1 в линиях клеток карциномы яичников и обнаружили, что пониженная экспрессия КААG1 приводит к значительному уменьшению миграции клеток, как определено в стандартном анализе на подвижность клеток, на примере анализа заживления раны (или царапины). Такой тип анализа позволяет измерить скорость, с которой клетки заполняют обнаженный участок в слившийся монослой. Пониженная экспрессия КААG1 приводит к уменьшению выживаемости линий клеток карциномы яичника, которую измеряли при помощи оценки клоногенности, как, например, анализом выживаемости колонии. Специалисты в данной области техники могут применять другие способы для оценки необходимости КААG1 в поведении раковых клеток, в частности, клеток карциномы яичника.

Исходя из экспрессии КААG1 в большей части опухолей яичников, его ограниченной экспрессии в нормальных тканях, и соответствия между уровнями экспрессии и повышенной злокачественностью, и предполагаемой биологической роли КААG1 в поведении линий клеток карциномы яичников, КААG1 выбрали в качестве терапевтической мишени для разработки антител для выявления, предупреждения и лечения карциномы яичников. Экспрессия КААG1 при видах рака, отличных от карциномы яичников, также подтолкнула заявителя к оценке терапевтических или диагностических антител для определений другого вида рака.

Настоящее изобретение, вследствие этого, обеспечивает антитела к КААG1 и их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически нацеливаются на КААG1 и которые можно применять, например, в качестве конъюгата антитела-лекарственного средства.

Такие антитела и антигенсвязывающие фрагменты включают, например, моноклональные антитела, поликлональные антитела, химерные антитела, гуманизированные антитела, фрагменты антител, одноцепочечные антитела, доменные антитела и полипептиды с антигенсвязывающим участком.

Антитела и антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с КААG1.

Антитела изначально были выделены из Fab-библиотек по их специфичности к представляющему интерес антигену.

Вариабельные участки антител или антигенсвязывающих фрагментов, описанные в данном документе, можно слить с константными участками необходимых видов, таким образом делая возможным узнавание антитела эффекторными клетками необходимых видов. Константный участок может иметь происхождение, например, от подтипа IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Клонирование или синтез константного участка в рамке с вариабельным участком хорошо известны специалисту в данной области и могут быть осуществлены, например, при помощи методики рекомбинантной ДНК. Таким образом, антитела, содержащие константный участок антитела человека, а также антитела или антигенсвязывающие фрагменты, содержащие каркасные аминокислоты антитела человека, также охватываются настоящим изобретением.

Настоящее изобретение, таким образом, предлагает в иллюстративном варианте осуществления выделенное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащий вариабельный участок легкой цепи с:

- а) последовательностью CDRL1, содержащей SEQ ID NO: 8 или изложенной в SEQ ID NO: 8;
- б) последовательностью CDRL2, содержащей SEQ ID NO: 9 или изложенной в SEQ ID NO: 9; или
- с) последовательностью CDRL3, содержащей SEQ ID NO: 10 или изложенной в SEQ ID NO: 10.

Выделенное антитело и антигенсвязывающий фрагмент может также содержать вариабельный участок тяжелой цепи с:

- а) последовательностью CDRH1, содержащей SEQ ID NO: 5 или изложенной в SEQ ID NO: 5;
- б) последовательностью CDRH2, содержащей SEQ ID NO: 6 или изложенной в SEQ ID NO: 6; или
- с) последовательностью CDRH3, содержащей SEQ ID NO: 7 или изложенной в SEQ ID NO: 7.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать любой отдельный CDR или комбинацию из CDR1, CDR2 и/или CDR3 вариабельного участка легкой цепи. CDR3 может быть выбран конкретнее. Комбинация может включать, например, CDRL1 и CDRL3; CDRL1 и CDRL2; CDRL2 и CDRL3 и CDRL1, CDRL2 и CDRL3.

В другом иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать любой отдельный CDR или комбинацию из CDR1, CDR2 и/или CDR3 вариабельного участка тяжелой цепи. CDR3 может быть выбран конкретнее. 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 его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать по меньшей мере два CDR из CDRL1, CDRL2 или CDRL3.

Также в соответствии с настоящим изобретением антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Дополнительно, в соответствии с настоящим изобретением антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать:

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

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут более предпочтительно содержать один CDRL1, один CDRL2 и один CDRL3.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут более предпочтительно содержать один CDRH1, один CDRH2 и один CDRH3.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут содержать один CDRH1, один CDRH2 и один CDRH3.

В соответствии с настоящим изобретением антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут также содержать один CDRH1, один CDRH2 или один CDRH3.

В тех случаях, когда доступен только один из варибельного участка легкой цепи или варибельного участка тяжелой цепи, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно восстановить при помощи скрининга библиотеки комплементарных варибельных 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).

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

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

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

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

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

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

В другом аспекте настоящее изобретение относится к полипептиду, антителу или антигенсвязывающему фрагменту, содержащему (на одной полипептидной цепи или на отдельных полипептидных цепях) по меньшей мере один определяющий комплементарность участок варибельного участка легкой цепи и по меньшей мере один определяющий комплементарность участок варибельного участка тяжелой цепи одного из антител или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе.

Настоящее изобретение относится в другом аспекте к антителам к КААГ1, которые могут содержать (на одной полипептидной цепи или на отдельных полипептидных цепях) все шесть определяющих комплементарность участков (CDR) антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе.

Вариантное антитело и антигенсвязывающие фрагменты.

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

Как используется в данном документе, термин "вариантный" применяют к любой последовательности, описанной в данном документе, и он включает, например, вариантный CDR (или CDRL1, CDRL2, CDRL3, CDRH1, CDRH2 и/или CDRH3), варибельный участок вариантной легкой цепи, варибельный участок вариантной тяжелой цепи, вариантную легкую цепь, вариантную тяжелую цепь, вариантное антитело, вариантный антигенсвязывающий фрагмент и вариант КААГ1.

Вариантные антитела или антигенсвязывающие фрагменты, охватываемые настоящим изобретением, представляют собой такие, 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, вставлен-

ный на его место.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения могут иметь переменный участок легкой цепи и/или переменный участок тяжелой цепи, как описывалось выше, и могут дополнительно содержать аминокислоты константного участка, такие как, например, аминокислоты константного участка человеческого антитела.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения могут содержать, например, константный участок IgG1 человека.

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

Представляющий интерес сайт для замещающего мутагенеза включает гиперпеременные участки (CDR), но также предполагаются модификации в каркасном участке или даже в константном участке. Консервативные замены могут быть осуществлены при помощи обмена аминокислоты (из CDR, переменной цепи, антитела и т.д.) из одной из перечисленных ниже групп (группа 1-6) на другую аминокислоту аналогичной группы.

Другие иллюстративные варианты осуществления консервативных замен показаны в табл. 1А под заголовком "Предпочтительные замены". Если такие замены в результате дают нежелательное свойство, то могут быть введены более существенные изменения, обозначенные "иллюстративные замены" в табл. 1А или которые дополнительно описаны ниже по отношению к классам аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

В данной области техники известно, что варианты могут быть получены замещающим мутагенезом, и они сохраняют биологическую активность полипептидов настоящего изобретения. Такие варианты имеют по меньшей мере один удаленный аминокислотный остаток в своей аминокислотной последовательности и другой остаток, вставленный на его место. Например, один представляющий интерес сайт для замещающего мутагенеза может включать сайт, в котором определенные остатки, получены из различных видов, являются идентичными. Примеры замен, обозначенных как "консервативные замены", показаны в табл. 1А. Если такие замены в результате дают нежелательное изменение, то вводят другой тип замен, обозначенных как "Иллюстративные замены" в табл. 1А или которые дополнительно описаны в данном документе по отношению к классам аминокислот, а продукты подвергнуты скринингу.

Существенные модификации в функции или иммунологической идентичности выполняют путем выбора 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 основе общих свойств боковых цепей:

(группа 1) гидрофобные: норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile);

(группа 2) нейтральные гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr);

(группа 3) кислые: аспаргиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu);

(группа 4) основные: аспаргин (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

Вариантное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут иметь существенное аминокислотное сходство и/или идентичность последовательности в своей аминокислотной последовательности по сравнению с таковой аминокислотной последовательности исходного антитела или антигенсвязывающего фрагмента. Степень сходства между двумя последовательностями основана на доле идентичностей (идентичных аминокислот) и консервативной замены.

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

Процентная идентичность будет, таким образом, свидетельствовать об аминокислотах, которые идентичны по сравнению с исходным пептидом 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 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.

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

Другие иллюстративные варианты осуществления вариантов представляют собой такие, которые

имеют по меньшей мере 90% идентичности последовательности с последовательностью, описанной в данном документе, и 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99 или 100% сходство последовательности с исходной последовательностью или частью исходной последовательности.

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

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

В целях краткости заявитель приводит в данном документе табл. 1B, показывающую 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 1B

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

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

Иллюстративные варианты осуществления антитела или антигенсвязывающего 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: 4.

Такой вариабельный участок легкой цепи может содержать последовательность CDRL1, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 8, последовательность CDRL2, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 9, и последовательность CDRL3 по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 10.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRL1, которая может быть по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 8.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRL1, которая может быть на 100% идентична SEQ ID NO: 8.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRL2, по меньшей мере на 90% идентичную SEQ ID NO: 9.

В еще другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRL2, которая может быть на 100% идентична SEQ ID NO: 9.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRL3, которая может быть по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 10.

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRL3, которая может быть на 100% идентична SEQ ID NO: 10.

В иллюстративном варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может содержать вариабельный участок тяжелой цепи, содержащий последовательность, по меньшей мере на 70, 75, 80% идентичную SEQ ID NO: 2.

Такие вариабельные участки тяжелой цепи могут содержать последовательность CDRH1, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 5, последовательность CDRH2, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 6, и последовательность CDRH3, по меньшей мере на 80% идентичную SEQ ID NO: 7.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRH1, которая может быть по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 5.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRH1, которая может быть на 100% идентична SEQ ID NO: 5.

В еще другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRH2, которая может быть по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 6.

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRH2, которая может быть на 100% идентична SEQ ID NO: 6.

В еще дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRH3, которая может быть по меньшей мере на 90% идентична SEQ ID NO: 7.

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения любое из приведенных в данном документе антител может содержать последовательность CDRH3, которая может быть на 100% идентична SEQ ID NO: 7.

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

Иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антигенсвязывающих фрагментов включают такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который изложен в SEQ ID NO: 30:

SEQ ID NO:30

DXVMTQTPLSLXVXXGXXASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNRFGSGV

PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDXGYYCFQGSHVPLTFGXGTXLEXK

где по меньшей мере одна из аминокислот, указанных X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 4.

Аминокислотная замена может быть, например, аминокислотой, обнаруженной в соответствующем положении естественного антитела человека или в консенсусной последовательности антитела человека. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антигенсвязывающего фрагмента включают такие, которые имеют вариабельный участок легкой цепи, который изложен в SEQ ID NO: 31:

SEQ ID NO:31

DX_{a1}VMTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLHNSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHTV

SNRFGSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K,

где X_{a1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a3} может быть A или P;

X_{a3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{a4} может быть L или P;

X_{a5} может быть кислой аминокислотой;

X_{a6} может быть Q или P;

X_{a7} может быть основной аминокислотой;

X_{a3} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a9} может быть A или Q;

X_{a10} может быть основной аминокислотой;

X_{a11} может быть гидрофобной аминокислотой;

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 4.

Дополнительный иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антигенсвяз-

зывающего фрагмента включает такие, которые имеют переменный участок легкой цепи, который изложен в SEQ ID NO: 32:

SEQ ID NO:32

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

где X_{A1} может быть V или I;

X_{A2} может быть A или P;

X_{A3} может быть S или T;

X_{A4} может быть L или P;

X_{A5} может быть D или E;

X_{A6} может быть Q или P;

X_{A7} может быть K или Q;

X_{A8} может быть L или V;

X_{A9} может быть A или Q;

X_{A10} может быть R или K или

X_{A11} может быть L или I,

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 4.

В соответствии с вариантом осуществления вариант переменного домена легкой цепи может иметь последовательность, которая изложена в SEQ ID NO: 33 или 34:

SEQ ID NO:33

DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK.

SEQ ID NO:34

DVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFGSGVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIK.

Иллюстративные варианты осуществления вариантного антитела или антигенсвязывающих фрагментов включают те, которые имеют переменный участок тяжелой цепи, который изложен в SEQ ID NO: 35.

SEQ ID NO:35

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYFTDDYMSWVXQXXGXXLEWXXGDPYNGDTNYN
QKFKGXXXXTXDXSXSTAYMXLXSLXSEDXAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTVTVSS,

где по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 2.

Аминокислотная замена может быть, например, аминокислотой, обнаруженной в соответствующем положении естественного антитела человека или в консенсусной последовательности антитела человека. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

Другой иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антигенсвязывающего фрагмента включают такие, которые имеют переменный участок тяжелой цепи, который изложен в SEQ ID NO: 36:

SEQ ID NO.:36

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYFTDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}LEWXX_{b11}
GDPYNGDTNYNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDX_{b22}AV
YYCARDPGAMDYWGQGTXX_{b23}TVTVSS,

где X_{b1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b2} может быть P или A;

X_{b3} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b4} может быть V или K;

X_{b5} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b6} может быть основной аминокислотой;

X_{b7} может быть S или A;

X_{b8} может быть H или P;

X_{b9} может быть основной аминокислотой;

X_{b10} может быть S или G;

X_{b11} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b12} может быть основной аминокислотой;

X_{b13} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b14} может быть I или T;
 X_{b15} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b16} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b17} может быть K или T;
 X_{b18} может быть нейтральной гидрофобной аминокислотой;
 X_{b19} может быть Q или E;
 X_{b20} может быть N или S;
 X_{b21} может быть T или R;
 X_{b22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой или
 X_{b23} может быть S или L;

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 2.

Дополнительный иллюстративный вариант осуществления вариантного антитела или антигенсвязывающего фрагмента включает такие, которые имеют вариабельный участок тяжелой цепи, который изложен в SEQ ID NO: 37:

SEQ ID NO.:37

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

где X_{B1} может быть I или V;

X_{B2} может быть P или A;
 X_{B3} может быть M или V;
 X_{B4} может быть V или K;
 X_{B5} может быть M или V;
 X_{B6} может быть K или R;
 X_{B7} может быть S или A;
 X_{B8} может быть H или P;
 X_{B9} может быть K или Q;
 X_{B10} может быть S или G;
 X_{B11} может быть I или M;
 X_{B12} может быть K или R;
 X_{B13} может быть A или V;
 X_{B14} может быть I или T;
 X_{B15} может быть L или I,
 X_{B16} может быть V или A;
 X_{B17} может быть K или T;
 X_{B18} может быть S или T;
 X_{B19} может быть Q или E;
 X_{B20} может быть N или S;
 X_{B21} может быть T или R;
 X_{B22} может быть S или T или
 X_{B23} является S или L,

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 2.

В соответствии с вариантом осуществления вариант вариабельного домена тяжелой цепи может иметь последовательность, которая изложена в любой из SEQ ID NO: 38-41:

SEQ ID NO:38

$QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY$
 $NQKFKGRVTITADTSTAYMELSSLRSEDAVYYCARDPGAMDYWGQGTTLTVSS.$

SEQ ID NO:39

$QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYN$

QKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

SEQ ID NO:40

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQ

KFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

SEQ ID NO:41

QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQ

KFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS.

Продуцирование антител в клетках.

Антитела к КААG1, которые раскрыты в данном документе, можно получить при помощи ряда способов, которые знакомы специалистам в данной области техники, как, например, способ с использованием гибридомы или способами рекомбинантной ДНК.

В иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к КААG1 (например, антитело, которое конкурирует с антителами, раскрытыми в данном документе) можно получить с помощью традиционной методики с использованием гибридомы, в котором мышь иммунизируют антигеном, выделяют клетки селезенки, сливают с миеломными клетками без экспрессии HGPRT и отбирают гибридные клетки при помощи среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимин (НАТ).

В дополнительном иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитела к КААG1 можно получить при помощи способов рекомбинантной ДНК.

Для экспрессии антител к КААG1 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 у конкретного хозяина. 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 *in vitro* методики рекомбинантной ДНК, 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 устойчивую экспрессию в клеточных линиях. Например, нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина, описанные в данном документе, могут быть трансформированы в линию клеток при помощи векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные источники репликации и/или эндогенные элементы экспрессии и селективируемый 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 каждую любую из легких и тяжелых цепей иммуноглобулина, описанных в данном документе, можно лигировать в отдельный вектор экспрессии и отдельно экспрессировать каждую цепь. 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 связанной системы 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 нуклеиновой кислоты 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 иммуоферментные 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 и т.д.) и/или экспрессии полипептида из клеточной культуры. Продуцируемый клеткой полипептид может секретироваться или может удерживаться внутриклеточно, 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 перетасовку 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 паттерны гликозилирования, изменяют предпочтение в использовании кодонов, производят сплайс-варианты и т.п.

Кроме того, штамм клеток-хозяев можно выбрать по его способности необходимым образом модулировать экспрессию вставленных последовательностей или процессировать экспрессированный полипептид. Такие модификации полипептида включают, без ограничения, ацетилирование, карбоксилирование, гликозилирование, фосфорилирование, липидирование и ацилирование. В иллюстративном варианте осуществления могут быть необходимыми антитела к КАAG1, которые содержат специальные структуры или паттерны гликозилирования. Посттрансляционный 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 посттрансляционных активностей (например, CHO, HeLa, MDCK, HEK293 и W138), доступны коммерчески и из Американской коллекции типовых культур (ATCC) и могут быть выбраны для обеспечения надлежащей модификации и процессинга экспрессированного полипептида.

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

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

Специалисты в данной области 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, как, 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 и его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения могут быть сконъюгированы с выявляемым фрагментом (т.е. предназначенным для выявления или диагностики) или с терапевти-

ческим фрагментом (для терапевтических целей).

"Выявляемый фрагмент" представляет собой фрагмент, выявляемый при помощи спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических и/или других физических средств. Выявляемый фрагмент может быть связан напрямую и/или опосредованно (например, посредством связи, как, например, без ограничений, DOTA или NHS связь) с антителами и их антигенсвязывающими фрагментами настоящего изобретения при помощи способов, хорошо известных в данной области техники. Можно применять широкий спектр выявляемых фрагментов, при этом выбор зависит от необходимой чувствительности, облегчения конъюгации, требований к устойчивости и доступности оборудования. Подходящий выявляемый фрагмент включает, без ограничения, флуоресцентную метку, радиоактивную метку (например, без ограничения, ^{125}I , In^{111} , Tc , I^{131} и включая позитронно-активные изотопы для PET-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. Выявляемый фрагмент может выступать причиной и/или производить выявляемый сигнал, таким образом обеспечивая выявление сигнала от выявляемого фрагмента.

В другом иллюстративном варианте осуществления настоящего изобретения антитело или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть связаны (модифицированы) с терапевтическим фрагментом (например, лекарственным средством, цитотоксичным фрагментом, противораковым средством).

В иллюстративном варианте осуществления антитело к КААГ1 и антигенсвязывающие фрагменты могут содержать химиотерапевтическое, цитотоксичное средство или противораковое лекарственное средство (например, малую молекулу). Такие химиотерапевтические или цитотоксичные 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 иных случаях химиотерапевтическое, цитотоксичное средство или противораковое лекарственное средство может состоять, наряду с другими известными специалистам в данной области техники, из 5-фторурацила, адриамицина, иринотекана, таксанов, эндотоксина представителей рода *Pseudomonas*, рицина, ауристатиона (например, монометилауристатиона Е, монометилауристатиона F), майтанзиноидов (например, мертанзина) и других токсинов.

Кроме того, для осуществления способов настоящего изобретения, и как известно в данной области техники, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения (конъюгированное или нет) можно применять в сочетании со второй молекулой (например, вторичным антителом и т.д.), которые способны специфически связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом настоящего изобретения и которые могут нести необходимый выявляемый, диагностический или терапевтических фрагменты.

Фармацевтические композиции антител и их применение.

Также настоящим изобретением охватываются фармацевтические композиции антител к КААГ1 или антигенсвязывающих фрагментов (конъюгированных или нет). Фармацевтическая композиция может содержать антитело к КААГ1 или антигенсвязывающий фрагмент и может также включать фармацевтически приемлемый носитель.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к композиции, которая может содержать антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, и носитель.

Настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, которая может содержать антитело или антигенсвязывающий фрагмент, описанные в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель.

В дополнение к активным ингредиентам, фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители, включая воду, PBS, солевые растворы, виды желатина, 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, метабисульфит натрия), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), вещества-наполнители или модификаторы концентрации (например, лактоза, маннит),

ковалентное связывание полимеров, как, например, полиэтиленгликоля с белком, комплексообразование с ионами металлов или введение материала в или на препараты в виде частиц полимерных соединений, как, например, полимолочной кислоты, полигликолевой кислоты, гидрогели 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 очистки *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, покрытые 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% солевой 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 летучими маслами и лактатом. Внутривенные среды включают жидкие и питательные подкрепители, подкрепители электролитов, 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 в клеточной культуре, либо в животных моделях, таких как мыши, крысы, кроли, собаки или свиньи. Животную модель можно применять для определения интервала 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 ED_{50} (доза, терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD_{50} (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, кроли, 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.

Термин "лечение" в целях настоящего раскрытия относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, при этом у объекта замедляется (уменьшается) целевое патологическое состояние или расстройство. Нуждающиеся в лечении включают уже имеющих расстройство, а также тех, которые склонны иметь расстройство, или тех, у которых расстройство необходимо предупредить. В частности, нуждающиеся субъекты включают субъектов с повышенным уровнем одного или нескольких маркеров рака.

Антитела к KAAG1 и их антигенсвязывающие фрагменты могут оказывать терапевтические эффекты при лечении различных типов рака, как, например, карциномы яичников, рака почек, рака толстой кишки, рака легких, меланомы и т.д. В иллюстративном варианте осуществления антитела и фрагменты оказывают терапевтические эффекты при карциноме яичников. В более конкретном варианте осуществления субъект может иметь, например, рецидивирующую карциному яичников. В еще одном варианте осуществления субъект может иметь, например, метастазирующий рак.

В иных случаях антитела и фрагменты к KAAG1 могут блокировать взаимодействие KAAG1 с его белковыми партнерами. Антитела к KAAG1 настоящего изобретения можно, в частности, применять для доставки терапевтического фрагмента к клетке, экспрессирующей KAAG1.

Антитела к KAAG1 и их антигенсвязывающие фрагменты могут оказывать терапевтические эффек-

ты при лечении различных типов карциномы яичников. Источником различных гистотипов карциномы яичников могут послужить несколько различных типов клеток. Наиболее распространенная форма карциномы яичников состоит из опухолей, которые образуются в слое эпителиальных клеток яичника или фаллопиевой трубы. Такие виды эпителиальной карциномы яичников включают серозные опухоли, опухоли эндометрия, муцинозные опухоли, светлоклеточные опухоли и пограничные опухоли. В других вариантах осуществления антитела к КААG1 и их антигенсвязывающие фрагменты оказывают эффекты при лечении других типов карциномы яичников, таких как карцинома яичников зародышевой линии и зародышевого шнура.

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

Настоящее изобретение в дополнительном аспекте относится к способу ингибирования роста клетки, экспрессирующей КААG1, способу, который может включать приведение в контакт клетки с эффективным количеством антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе.

Настоящее изобретение также охватывает способ лечения рака или ингибирования роста клеток, экспрессирующих КААG1, у млекопитающего, способ может включать введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, например, конъюгированного с описанным в данном документе терапевтическим фрагментом, нуждающемуся в этом субъекту.

В дополнительных аспектах настоящее изобретение предоставляет способ лечения, диагностические способы и способ выявления при помощи антитела или антигенсвязывающего фрагмента настоящего изобретения и применение таких антител или антигенсвязывающего фрагмента в производстве фармацевтической композиции или лекарственного средства для таких целей.

Вследствие этого настоящее изобретение относится к применению описанного в данном документе выделенного антитела или антигенсвязывающего фрагмента при (производстве фармацевтической композиции для) лечении рака.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, конкретнее, можно применять в отношении злокачественных опухолей, включая, например, злокачественную опухоль, обладающую способностью к метастазированию, и/или опухолевые клетки, которые характеризуются "безъякорным" ростом.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения также можно применять для диагностики рака. Диагностику рака можно осуществлять *in vivo* при помощи введения антитела или антигенсвязывающего фрагмента настоящего изобретения млекопитающему, которое имеет рак или подозревается на наличие рака. Диагностику также можно осуществить *ex vivo* путем приведения в контакт образца, полученного от млекопитающего, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом и выявления присутствия или отсутствия клеток (опухолевых клеток), экспрессирующих КААG1 или вариант КААG1.

Таким образом, настоящее изобретение также охватывает способ выявления рака или выявления клеток, экспрессирующих КААG1, у млекопитающего, способ может включать введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанного в данном документе, нуждающемуся в этом субъекту.

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

Другие иллюстративные варианты осуществления антител или антигенсвязывающих фрагментов, применяемых в способах выявления, являются такими, которые связываются с КААG1 или вариантом КААG1, экспрессируемым на поверхности опухолевых клеток.

Нуждающимися субъектами, которые получают благоприятное воздействие от лечения, выявления или диагностики, описанных в данном документе, являются такие, которые имеют рак или подозреваются на наличие рака, например карциномы яичника (например, серозной, эндометриоидной, светлоклеточной или муцинозной), рака кожи (например, меланом, плоскоклеточных карцином), рака почек (например, папиллярных карцином, виды светлоклеточного рака), колоректального рака (например, колоректальных карцином), саркомы, лейкоза, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака молочной железы (например, карцином молочной железы), рака простаты (например, карцином простаты), опухоли пищевода, опухоли мочевого пузыря, опухоли легких (например, легочных карцином) или опухоли шеи и головы, и, особенно если рак характеризуется злокачественностью и/или если клетки, экспрессирующие КААG1 или вариант КААG1, характеризуются "безъякорным" ростом.

Субъекты, имеющие рак, могут быть идентифицированы по снимкам, биопсии тканей, генетическому тестированию. Альтернативно, субъекты, имеющие рак, могут быть идентифицированы по наличию маркеров рака в их жидкостях организма при помощи стандартных анализов (например, ELISA и т.п.).

Настоящим изобретением, в частности, охватываются пациенты, имеющие или подозреваемые на наличие карциномы яичников (например, серозной, эндометриоидной, светлоклеточной или мусцинозной), или рака кожи (например, меланом, плоскоклеточных карцином), или рака почек (например, папиллярных карцином), и, особенно если рак характеризуется злокачественностью и/или если клетки, экспрессирующие КААG1 или вариант КААG1, характеризуются "безъякорным" ростом.

Другой аспект настоящего изобретения относится к способу выявления КААG1 (SEQ ID NO: 29), варианта КААG1, имеющего по меньшей мере 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 29, или секретированной формы или циркулирующей формы КААG1 или варианта КААG1, при этом способ может включать приведение в контакт клетки, экспрессирующей КААG1 или вариант КААG1, или образца (биопсии, сыворотки, плазмы, мочи и т.д.), содержащего или подозреваемого на содержание КААG1 или варианта КААG1, с описанными в данном документе антителом или антигенсвязывающими фрагментами и измерение связывания. Образец может происходить от млекопитающего (например, человека), который может иметь рак (например, карциному яичников, метастазирующий рак) или может подозреваться на наличие рака (например, карциномы яичников, метастазирующего рака). Образец может представлять собой образец ткани, полученный от млекопитающего, или супернатант клеточной культуры.

В соответствии с настоящим изобретением образец может быть образцом сыворотки, образцом плазмы, образцом крови, спермой или асцитной жидкостью, полученной от млекопитающего. Описанное в данном документе антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может преимущественно выявлять секретированную или циркулирующую форму (циркулирующую в крови) КААG1.

Способ может включать определение количества комплекса, образованного связанным с КААG1 или с вариантом КААG1 антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

Связывание антитела с антигеном будет обуславливать повышение предполагаемой молекулярной массы антигена. Таким образом, физическое изменение происходит при специфическом связывании антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном.

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

Если антитело включает, например, выявляемую метку, то комплекс антиген-антитело можно выявить по флюоресценции, излучаемой меткой, радиационному излучению метки, ферментативной активности метки, обеспеченной ее субстратом, или др.

Выявление и/или измерение связывания антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном может быть осуществлено при помощи ряда способов, известных в данной области техники. Связывание антитела или антигенсвязывающего фрагмента с антигеном можно отслеживать при помощи устройства, способного выявлять сигнал, излучаемый выявляемой меткой (радиационное излучение, флюоресценция, изменение цвета и т.д.). Такое устройство предоставляет данные, которые указывают на произошедшее связывание, и может также предоставлять показания в том, что касается количества антитела, связавшегося 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 антигенсвязывающих 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 CDR, вариабельных участков легкой цепи, вариабельных участков тяжелой цепи, легких цепей, тяжелых цепей.

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

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

- a) CDRL1, изложенный в SEQ ID NO: 8 или содержащий SEQ ID NO: 8;
- b) CDRL2, изложенный в SEQ ID NO: 9 или содержащий SEQ ID NO: 9;
- c) последовательность CDRL3, изложенную в SEQ ID NO: 10 или содержащую SEQ ID NO: 10.

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

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

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

- a) последовательность CDRH1, изложенную в SEQ ID NO: 5 или содержащую SEQ ID NO: 5;
- b) последовательность CDRH2, изложенную в SEQ ID NO: 6 или содержащую SEQ ID NO: 6; или
- c) последовательность CDRH3, изложенную в SEQ ID NO: 7 или содержащую SEQ ID NO: 7.

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

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

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

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

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

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

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

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

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей переменный участок легкой цепи, имеющий 70, 75, 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 4.

Еще другие аспекты настоящего изобретения относятся к нуклеиновой кислоте, кодирующей переменный участок тяжелой цепи, имеющий 70, 75, 80% идентичность последовательности с SEQ ID NO: 2.

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 *in vitro* методики рекомбинантной ДНК, методики синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке, которая может содержать описанные в данном документе нуклеиновую кислоту, антигена или антигенсвязывающий фрагмент.

Выделенная клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный участок легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую переменный 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 антигена или его антигенсвязывающего фрагмента.

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

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

Клетка может быть способна к экспрессии, сборке и/или секреции антигена или его антигенсвязывающего фрагмента.

вающего фрагмента.

Приведенные ниже примеры представлены для дополнительного описания деталей настоящего изобретения.

Примеры

Пример 1.

Данный пример описывает связывание антитела 3A4 с КААG1.

Антитела, которые связывают КААG1, получили с помощью методики фагового дисплея Alere. Подробное описание методики и способов получения таких антител можно найти в патенте США № 6057098. Кроме того, подробное описание получения антител к КААG1 можно найти в РСТ/CA2009/001586. Вкратце, методика использует строгий пэннинг фаговых библиотек, которые несут антигенсвязывающие фрагменты (Fab). Спустя несколько циклов пэннинга получали библиотеку под названием Omniclonal, которая была насыщена рекомбинантными Fab, содержащими вариabельные участки легкой и тяжелой цепей, которые связывались с КААG1 с очень высокой аффинностью и специфичностью.

Из этой библиотеки, более точно называемой Omniclonal AL0003 A2ZB, получали 96 отдельных рекомбинантных моноклональных Fab из *E. coli* и тестировали на связывание КААG1. Из данного 96-луночного планшета моноклональных антител, исходя из их высокой связывающей активности в отношении рекомбинантного КААG1 и их аффинности к КААG1 на поверхности клеток карциномы яичника, получали моноклональное антитело, обозначенные 3A4.

Нуклеотидные последовательности вариabельных участков тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина соответственно показаны в SEQ ID NO: 1 и 3, а полипептидные последовательности вариabельных участков тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина соответственно показаны в SEQ ID NO: 2 и 4. Определяющие комплементарность участки (CDR) тяжелой цепи иммуноглобулина 3A4 соответственно показаны в SEQ ID NO: 5, 6 и 7, а CDR легкой цепи иммуноглобулина 3A4 соответственно показаны в SEQ ID NO: 8, 9 и 10.

За исключением возможности проведения исследования взаимодействия моноклональных антител с Fab фрагментами и белка КААG1, применение Fab ограничено в отношении проведения существенных *in vitro* и *in vivo* исследований для подтверждения биологической функции антигена. Таким образом, было необходимо перенести вариabельные участки легкой и тяжелой цепей, содержащиеся в Fab 3A4, в полные остовы антител для получения химерного IgG1 мыши-человека. Векторы экспрессии как для легкой, так и для тяжелой цепей 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. Краткий обзор методики описан в данном документе.

Вектор экспрессии легкой цепи - существующая экспрессирующая плазмида млекопитающих, называемая рТТВН8G (Durocher et al., 2002), предназначенная для применения в системе для временной трансфекции 293E, модифицировали для встраивания вариabельного участка легкой цепи мыши. Полученная химерная легкая цепь мыши-человека содержала вариabельный 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: 11 и 12 соответственно). Нуклеотидная последовательность и соответствующая аминокислотная последовательность константного участка каппа человека показаны в SEQ ID NO: 13 и 14 соответственно. Полученный ПЦР-продукт длиной 321 пара оснований лигировали в рТТВН8G 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 вариabельные участки легкой цепи мыши. Последовательность конечной экспрессирующей плазмиды, называемой рТТВК1, показана в SEQ ID NO: 15. Исходя из последовательности вариabельного участка легкой цепи 3A4, показанной в SEQ ID NO: 3, сконструировали ПЦР-праймер, специфический к вариabельному участку легкой цепи, который включал на своем 5'-конце последовательность, идентичную по меньшей мере 20 парам оснований сигнального пептида VEGF A. Последовательность праймера показана в SEQ ID NO: 16. Обратный праймер (SEQ ID NO: 17) включал на своем 3'-конце последовательность, идентичную первым 20 парам оснований константного домена каппа человека. Как на ПЦР-фрагменты, так и на расщепленную рТТВК1 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 вариabельные участки легкой цепи мыши правильно вставлены в вектор экспрессии рТТВК1.

Вектор экспрессии тяжелой цепи - вектор экспрессии, который давал тяжелую цепь иммуноглобулина 3A4, конструировали аналогичным образом, как и описанную выше рТТВК1, для получения легких

цепей иммуноглобулинов. Плазмиду pYD11 (Durocher et al., 2002), которая содержит последовательность сигнального пептида IgGK человека, а также участки CH2 и CH3 Fc-домена человека IgG1, модифицировали путем лигирования последовательности кДНК, кодирующей константный участок C_H1 человека. ПЦР-праймеры OGS1769 и OGS1770 (SEQ ID NO: 18 и 19), сконструированные для содержания уникальных сайтов для рестрикционных эндонуклеаз, применяли для амплификации участка C_H1 IgG1 человека, содержащего нуклеотидную последовательность и соответствующую аминокислотную последовательность, показаны в SEQ ID NO: 20 и 21. После лигирования фрагмента длиной 309 пар оснований C_H1 человека непосредственно после последовательности сигнального пептида IgGK модифицированную плазмиду (SEQ ID NO: 22) назвали pYD15. Если выбранный переменный участок тяжелой цепи лигирован в вектор, то полученная плазида кодирует полную тяжелую цепь иммуноглобулина IgG1 с константными участками человека. ПЦР-праймеры, специфичные к переменному участку тяжелой цепи антитела 3A4 (SEQ ID NO: 1), сконструировали так, чтобы они включали на своем 5'-конце последовательность, идентичную по меньшей мере 20 парам оснований сигнального пептида IgGK. Последовательность данных праймеров показана в SEQ ID NO: 23. Обратный праймер (SEQ ID NO: 24) включал на своем 3'-конце последовательность, идентичную первым 20 парам оснований константного домена C_H1 человека. Как на ПЦР-фрагменты, так и на расщепленную pYD15 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 тяжелой цепи мыши правильно вставлены в вектор экспрессии pYD15.

Экспрессия химерного IgG1 3A4 человека в клетках 293E - полученные, как описано выше, векторы экспрессии, которые кодируют легкие и тяжелые цепи иммуноглобулинов, экспрессировали в клетках 293E с помощью системы для временной трансфекции (Durocher et al., 2002). Соотношение легкой к тяжелой цепи оптимизировали с тем, чтобы достигнуть наибольшего выхода антитела в среде для тканевой культуры, и, как обнаруживали, оно составило 9:1 (LH).

Связывание химерного 3A4 с КААG1 - для измерения относительного связывания моноклонального антитела 3A4 получили рекомбинантный КААG1 человека в клетках 293E с помощью методики для крупномасштабной временной трансфекции (Durocher et al., 2002; Durocher, 2004). Описание экспрессии и очистки рекомбинантного КААG1 человека в виде химерного белка с Fc приведено в PCT/CA2009/001586. Для осуществления связывания Fc-КААG1 с препаратом антитела к Fc-КААG1 пришили NHS-биотин (Pierce, Рокфорд, Иллинойс) и вносили 10 нг/лунка в 96-луночный планшет со стрептавидином на 1 ч при комнатной температуре для нанесения покрытия. Добавили очищенный химерный 3A4 с возрастающими концентрациями и инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. Связавшееся антитело выявили с помощью антитела к легкой каппа цепи человека, конъюгированного с HRP, в присутствии жидкого субстрата TMB ((Sigma-Aldrich Canada Ltd., Оквилл, Онтарио) и осуществили считывание результатов при 450 нм в ридере для титрационных микропланшетов. Как показано на фиг. 1, 3A4 взаимодействовал с иммобилизованным белком КААG1 дозозависимым образом. При инкубировании контрольного, несвязанного IgG с рекомбинантным КААG1 не наблюдали связывающую активность даже при самой высокой концентрации. Данный результат продемонстрировал, что 3A4 связывается с КААG1 человека. Связывание 3A4 сравнили со связыванием химерного 3D3 (описано в Tremblay и Filion (2009)), которое характеризуется иной специфичностью эпитопа (см. пример 2). Связывающая активность 3A4 очень похожа с 3D3 в данном типе анализа (см. фиг. 1).

Пример 2.

Данный пример описывает исследования по картированию эпитопа для определения того, с каким именно участком КААG1 связывается антитело 3A4.

Для дополнительного определения участков КААG1, которые связываются антителом 3A4, экспрессировали укороченных мутантов КААG1 и использовали их в ELISA. Что касается полноразмерного КААG1, укороченные версии амплифицировали с помощью ПЦР и лигировали в pYD5, расщепленную BamHI/HindIII. С помощью использованных праймеров объединили прямой олигонуклеотид с последовательностью, показанной в SEQ ID NO: 25, с праймерами SEQ ID NO: 26 и 27 с получением слитых с Fc фрагментов, которые заканчивались на аминоконцевом номере 60 и 35 КААG1 соответственно. Экспрессию этих рекомбинантных мутантов осуществили, как было описано выше для полноразмерного Fc-КААG1, и очистили с помощью протеин-А-агарозы.

Исходя из идей Tremblay и Filion (2009), стало известно, что со специфическими участками рекомбинантного КААG1 взаимодействовали другие антитела. Таким образом, антитело к КААG1 3C4, 3D3 и 3G10 взаимодействовало с участками 1-35, 36-60 и 61-84 КААG1 соответственно. Воспроизвели эти результаты по связыванию, и они показаны на фиг. 2. Для определения участка КААG1, который связывается антителом 3A4, осуществили ELISA с применением гибридов укороченного КААG1 с Fc согласно аналогичному протоколу, который был описан в примере 1. Единственными модификациями было применение иных биотинилированных укороченных мутантов Fc-КААG1. Результаты демонстрируют, что специфичность связывания 3A4 похожа с 3G10. У мутантов КААG1, у которых нет аминокислотных

последовательностей после аминокислоты 60, связывание 3A4 с КААG1 не происходит. Это указывает на то, что 3A4 взаимодействует с участком, ограниченным аминокислотами 61-84 КААG1 человека. Результаты наблюдений, что 3A4 и 3D3 имеют практически идентичную активность связывания при измерении с помощью ELISA (пример 1), но имеют очень отличающуюся специфичность эпитопа, позволяют предположить, что свойства связывания 3A4 в некоторой степени отличаются от 3D3.

Пример 3.

Данный пример описывает способность 3A4 связываться с КААG1 на поверхности клеток различных линий раковых клеток.

Проточную цитометрию применяли для выявления КААG1 на поверхности клеток различных линий клеток. Исходя из анализов экспрессии с помощью RT-PCR с применением специфических мРНК-праймеров для КААG1, ожидалось, что избранные линии раковых клеток будут экспрессировать белок КААG1. Для проверки этого использовали клетки карциномы яичника (SKOV-3 и TOV-21G) и контрольные линии клеток, которые демонстрировали очень небольшую экспрессию КААG1 (293E). Клетки собрали с помощью 5 mM EDTA, подсчитывали с помощью гемоцитометра и ресуспендировали в FCM-буфере (0,5% BSA, 10 мкг/мл козьей сыворотки в 1× PBS) с плотностью клеток 2×10^6 клеток/мл. Химерные 3A4 или контрольные IgG добавили к 100 мкл клеток в конечной концентрации 5 мкг/мл и инкубировали на льду в течение 2 ч. Клетки промывали в холодном PBS для удаления несвязавшихся антител, ресуспендировали в 100 мкл FCM-буфера, содержащего антитело к IgG человека, конъюгированное с FITC (разведение 1:200), в качестве вторичного антитела и инкубировали на льду в течение 45 мин. После еще одного этапа промывания в холодном PBS клетки ресуспендировали в 250 мкл FCM-буфера и анализировали с помощью проточного цитометра. Результаты этого эксперимента показаны на фиг. 3A и 3B. Инкубирование линий клеток с контрольным антителом дало гистограммы, которые соответствуют сигналу, обычно получаемому в случае, когда антитело покидает клетки. Это позволило получить фоновый сигнал с такими значениями FCM (фиг. 3A и 3B). И наоборот, инкубирование SKOV-3, TOV-21G с химерным антителом 3A4 дало сильный флуоресцентный сигнал (фиг. 3A). Это указывало на то, что антитело эффективно выявляет КААG1 на поверхности таких раковых клеток. Ожидалось, что клетки 293E, линия клеток почки человека, продемонстрирует очень незначительную экспрессию КААG1, и, действительно, гистограмма результатов FCM показала почти полное отсутствие сдвига по сравнению с контрольным антителом (см. фиг. 3B). Следовательно, 3A4 специфически выявляет КААG1 на поверхности раковых клеток. Активность 3A4 сравнили с 3D3, антителом к КААG1, которое описано в работах Tremblay и Filion (2009). Исходя из данной патентной заявки, было известно, что 3D3 может выявлять КААG1 на поверхности раковых клеток при измерении с помощью FCM. Это подтвердили инкубацией 3D3 в присутствии клеток SKOV-3 и TOV-21G (см. фиг. 3A). Флуоресцентный сигнал был не настолько высоким как для 3A4, что указывает на то, что 3A4 характеризуется отличной и повышенной способностью к выявлению КААG1 на поверхности клеток карциномы яичника. Другие результаты, полученные в нашей лаборатории, указывают на то, что 3A4 может выявлять КААG1 на поверхности раковых клеток в условиях, при которых в данном анализе 3D3 не проявлял активности (результаты не показаны). Все вместе, эти результаты наблюдения и различие в специфичности эпитопа 3A4 по сравнению 3D3 позволяют предположить, что эти антитела характеризуются различными свойствами по отношению к КААG1.

Пример 4.

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

Как продемонстрировано выше, антиген КААG1 выявляется посредством 3A4 на поверхности раковых клеток с помощью 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 позволяющий нацеливаться на клетки с помощью ADCC или CDC, iii) могут происходить события, связанные с передачей сигнала, которые проиллюстрированы с помощью эгоистических антител, iv) комплекс может быть интернализирован или v) комплекс может быть сброшен с клеточной поверхности. Для решения данного вопроса изучали поведение комплекса КААG1-антитело 3A4 на поверхности клеток. Клетки SKOV-3 высевали, промывали и инкубировали с 5 мкг/мл химерного антитела 3A4, как описано в примере 3. После промывания добавили полную среду OSE и клетки поместили в 37°C на срок до 90 мин. Клетки забрали через указанные промежутки времени (см. фиг. 4), быстро охладили, приготовили для цитометрии с конъюгированным с FITC антителом к IgG человека и результаты выразили в виде процента оставшейся средней интенсивности флуоресценции (средняя интенсивность флуоресценции, %). Как проиллюстрировано на фиг. 4, флуоресцентный сигнал быстро снизился за период 30-45 мин. Эти результаты показывают, что комплекс 3A4/КААG1 исчез с клеток, что указывало на то, что могла произойти интернализация комплекса. Предварительные исследования для выяснения механизма, ответственного за такое снижение флуоресценции клеточной поверхности, показали, что, судя по всему, комплекс интернализовался.

Эти результаты дополнительно подтвердили путем проведения иммунофлуоресценции на живых

клетках для того, чтобы узнать, можно ли наблюдать такую интернализацию с помощью микроскопии. Клетки SKOV-3 высевали на покровные стекла в полную среду (среда OSE (Wisent), содержащую 10% FBS, 2 mM глутамина, 1 mM пирувата натрия, 1× неосновных аминокислот и антибиотики). После того как клетки надлежащим образом закрепились, добавили свежую среду, содержащую химерное антитело к КААG1 3A4 в количестве 10 мкг/мл, и инкубировали при 37°C в течение 4 ч. Клетки промывали в PBS, затем фиксировали в 4% параформальдегиде (в PBS) в течение 20 мин. После промывания клетки пермеабилizировали при помощи 0,1% Triton X-100 в PBS в течение 5 мин. Блокировку осуществляли с помощью 1,5% сухого молока в PBS в течение 1 ч. Ассоциированный с лизосомами мембранный белок 1 (LAMP1, Chang et al., 2002) выявили путем инкубирования с антителом к LAMP1 (Santa Cruz, sc-18821, разведенное 1:100) в 1,5% молоке в PBS в течение 2 ч. После промывания в PBS добавляли все вместе вторичные антитела в 1,5% молока и инкубировали в течение 1 ч. Для химерных антител к КААG1 вторичным антителом было антитело осли к IgG (H+L) человека, конъюгированное с родамином Red-X, в разведении 1:300. Для антитела к LAMP1 вторичным антителом было антитело козы к IgG (H+L) мыши, конъюгированное с DyLight488, в разведении 1:300. Оба вторичных антитела получали от Jackson ImmunoResearch. Покровные стекла промывали в PBS и погружали в препятствующий обесцвечиванию реактив ProLong Gold с DAPI. Как видно на фиг. 5A, спустя 4 ч инкубирования при 37°C в присутствии клеток SKOV-3 карциномы яичника антитело 3A4 можно было выявить в комплексах в основном вблизи околоядерной области (стрелочками, в левой части фиг. 5A), что представляет собой типичные пути эндосомально-лизосомальной интернализации. Это наблюдение дополнительно подтвердили в случае, когда визуализировали лизосомальный маркер LAMP1 и обнаруживали, что он также экспрессировался в данных областях (стрелочками, в средней части фиг. 5A). Что важно, объединение двух изображений привело к появлению структур, что указывает на то, что 3A4 и антитела к LAMP1 присутствовали в одних и тех же структурах (стрелочками, в правой части фиг. 5A). Совместная локализация 3A4, которое связывается с КААG1 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 конъюгирован с антителом 3A4. Идентичные результаты наблюдали в другой линии раковых клеток TOV-21G (см. фиг. 5B).

Все вместе, эти исследования продемонстрировали, что антитела, специфичные к КААG1, такие как 3A4, можно применять в качестве конъюгата антитело-лекарственное средство (ADC). Таким образом, высокий уровень специфичности к карциноме яичников у КААG1 в сочетании с возможностью интернализации данной цели в клетки может способствовать разработке средств по типу ADC.

Пример 5.

Предпочтительное выявление КААG1 на поверхности раковых клеток.

Несмотря на то что были разработаны несколько антител, взаимодействующих с различными эпитопами белка КААG1, доступность этих эпитопов при экспрессии КААG1 на поверхности интактных раковых клеток не была полностью изучена. Биоинформационный анализ первичной аминокислотной структуры КААG1 (общее число аминокислот в белке человека составляет 84) не выявил каких-либо очевидных последовательностей, которые могли соответствовать трансмембранному домену, и поэтому не было полностью понятно то, как КААG1 заякоривается в клеточной мембране.

Было обнаружено, что полученные антитела к КААG1 связывались с тремя различными участками в белке КААG1 (см. PCT/CA2009/001586). Большинство антител взаимодействуют с аминокислотами 35-60 белка КААG1 и в данном описании проиллюстрированы посредством антител 3D3 и 3G12. Антитела, которые взаимодействуют с карбоксиконцом КААG1 между аминокислотами 61-84, проиллюстрированы посредством антитела 3A4. Наконец, антитела, которые взаимодействуют с аминоконцевым участком белка, которые проиллюстрированы посредством 3C4, продемонстрировали очень незначительное связывание с клетками, которые экспрессируют КААG1.

В настоящем документе показано, что при экспрессии КААG1 в клетках карбоксиконцевой участок (аминокислоты 61-84) выставлен во внеклеточное пространство и что антитела, которые нацеливаются на данный участок, являются наиболее эффективными при выявлении и потенциальном лечении положительных по КААG1 клеток. Антитела, которые связываются со срединным участком КААG1 (аминокислоты 35-60), также могут выявлять КААG1 на поверхности клеток, но в меньшей степени, чем антитела, которые взаимодействуют с карбоксиконцом.

Линии клеток карциномы яичника, такие как SKOV-3, положительны в отношении экспрессии КААG1. Эти клетки применяли для выявления экспрессии КААG1 путем проточной цитометрии, которая представляет собой способ, позволяющий выявлять белки клеточной поверхности, и хорошо известна специалистам в данной области техники. Вкратце, для каждого образца 100000 клеток инкубировали на льду в течение 1 ч с первичным антителом (либо с антителом к КААG1, либо с контрольным антителом) в концентрации 1 мкг/мл. Спустя несколько промываний ледяным PBS окрашенные клетки инкубировали с вторичным антителом, которое было сконъюгировано с флуорохромом (FITC), которое выявляет наличие первичного антитела, связанного с клетками. Спустя несколько дополнительных промывок клетки проанализировали посредством проточного цитометра. Выраженные на фиг. 6 результаты пока-

зывают количество сигналов (клеток), представлены на оси Y, и величину флуоресценции (флуоресцентный сигнал), - на оси X. При инкубировании клеток SKOV-3 с антителом 3A4 наблюдали большой сдвиг флуоресценции, что указывает на то, что на поверхности клеток (фиг. 6A) присутствовал избыточный белок КААG1 и что он эффективно распознавался этим антителом. В идентичных условиях антитела, которые взаимодействовали со срединным участком КААG1, 3G12 и 3D3 (фиг. 6A), были гораздо менее эффективны для выявления КААG1. При инкубировании клеток с повышенной концентрацией 3G12 или 3D3 на клеточной поверхности можно было выявить КААG1 (не показано). При инкубировании клеток либо с контрольным IgG (фиг. 6A), либо с 3C4 антителом к аминоконцу КААG1 (фиг. 6A) не наблюдали какой-либо сигнал. Эти результаты указывают на то, что антитела, взаимодействующие с карбоксиконцом КААG1, могут выявлять антиген на поверхности раковых клеток более эффективно, чем антитела, направленные к другим участкам КААG1. Это позволяет предположить, что карбоксиконец КААG1 представлен во внеклеточное (внешнее) пространство клетки. Похожие результаты получили для других линий раковых клеток, которые экспрессируют КААG1.

Также провели эксперимент на клетках SKOV-3, которые были пермеабелизированы посредством Triton X-100. Triton X-100, как правило, применяют для пермеабелизации клеточных мембран и высвобождения мембранных белков. При инкубации пермеабелизированных клеток с 3A4 и измерении в точном цитометре (см. фиг. 6B) сигнал был похож на сигнал, полученный от интактных клеток. К удивлению, при инкубации пермеабелизированных клеток с антителом 3G12, которое связывается со срединным участком КААG1 (фиг. 6B), сигнал был таким же сильным, как и для 3A4. Эти результаты указывают на то, что срединный участок КААG1, вероятно, находится в клеточной мембране или внутри клетки. Похожий результат получили с антителом 3D3, другим связывающимся со срединным участком фрагментом (фиг. 6B), но сигнал, полученный для 3D3, был не настолько сильным. Как и ранее, IgG-контроль не демонстрировал какой-либо выявляемый сигнал в данном анализе (фиг. 6B). Что интересно, инкубация клеток с антителом 3C4, которое связывается с аминоконцом КААG1, не давала какой-либо выявляемый сигнал (фиг. 6B). Этот последний результат позволяет предположить, что аминокончик КААG1, вероятно, отщепляется при транспорте белка к клеточной мембране.

В целом, данные эксперименты дают большее понимание структуры и ориентирования антигена КААG1 при его экспрессии на поверхности раковых клеток. Исходя из этих данных, предложены две модели структуры КААG1 на клеточной поверхности (фиг. 7). Согласно первой модели (фиг. 7, модель А) данные позволяют предположить, что срединная часть является собственно трансмембранным участком КААG1, который только частично выступает во внеклеточное пространство. Это делает карбоксиконец КААG1 легко выявляемым, а срединный участок более трудным для связывания. Согласно второй модели (фиг. 7, модель В) КААG1 заякорен в мембране с помощью другого белка, который сам по себе залегает в клеточной мембране. И снова, карбоксиконец будет легко доступным для антител, таких как 3A4, но взаимодействие КААG1 и белка-партнера сделает трудным доступ к срединному участку. Результаты, демонстрирующие, что антитела, состоящие как связывающегося с карбоксиконцом фрагмента (как проиллюстрировано посредством 3A4) и связывающегося со срединным участком фрагмента (как проиллюстрировано посредством 3G12 и 3D3), при тестировании в присутствии пермеабелизированных клеток согласуются с обеими моделями. Неспособность антитела 3C4 связываться с КААG1 у интактных или пермеабелизированных клеток, вероятно, является следствием отсутствия аминокислот, содержащихся в аминоконце зрелой процессированной мембранной формы КААG1, и обе модели согласуются с этим.

Эти результаты позволяют предположить, что антитела, которые нацелены на карбоксиконец КААG1 у раковых клеток, в частности участок, перекрываемый аминокислотами 61-84, являются наиболее пригодными для разработки антител для применений в качестве терапевтических средств для лечения разновидностей карцином, экспрессирующих КААG1. Кроме того, другие применения для антител к КААG1, которые связываются с карбоксиконцевым участком, включают диагностические вещества для выявления разновидностей карцином, экспрессирующих КААG1.

Антитела или антигенсвязывающие фрагменты со специфичностью связывания, сходной с антителом 3A4, можно получить или выделить путем иммунизации животного С-концевой частью КААG1 в соответствии со способами, известными в данной области техники, включая методику с применением гибридом, путем скрининга библиотеки антител или антигенсвязывающих фрагментов с С-концевой частью КААG1 и/или осуществления анализа конкурентного связывания выделенных антител или антигенсвязывающего фрагмента с описанным в данном документе антителом 3A4.

Пример 6.

Гуманизация путем конструирования мышиноного моноклонального антитела 3A4.

3D моделирование переменных участков мышиноного моноклонального антитела 3A4.

Данную задачу выполнили с помощью гомологичного моделирования. Наиболее похожие матричные структуры по отношению к последовательностям переменного участка легкой и тяжелой цепей мышиноного 3A4 (SEQ ID NO: 4 и 2) обнаружили с помощью BLAST-поиска по PDB. Для построения начальной модели переменного участка мышиноного 3A4 использовали следующие матричные структуры (коды PDB): 2IPU (цепь L) для легкой цепи и 1F11 (цепь H) для тяжелой цепи. Другие подходящие мат-

рицы можно обнаружить в записи 2DDQ в PDB для легкой цепи и в записях 3IY3, 1KTR, 2VXT, 1A6T и 1IG1 в PDB для тяжелой цепи. На данных матричных структурах в соответствии с последовательностями мышинового 3A4 произвели необходимые мутации, 7 мутаций в легкой цепи 2IPU и 17 мутаций плюс делеция трех остатков в тяжелой цепи 1F11. Мутантные структуры, соответствующие тяжелой и легкой цепям с переменными участками мышинового 3A4, собрали в двухцепочечные структуры антитела путем наложения тяжелой и легкой цепей с соответствующими матричными структурами. Полученную структуру собранного переменного участка 3A4 сначала совершенствовали путем минимизации энергии с помощью силового поля AMBER, а затем поэтапного освобождения от ограничений, начиная от петель CDR, которые были релаксированы первыми, до тяжелых атомов скелета в каркасном участке, которые были полностью релаксированы лишь на последней стадии. Петлю CDR-H3 в каждой структуре переменного участка антитела затем совершенствовали путем получения конформационного образца с минимизацией по Монте-Карло (MCM), в котором двугранные углы в участке CDR-H3 подбирали в каждом цикле MCM с последующей минимизацией энергии предварительно заданного участка, простирающегося на 10 Å вокруг изначальной конформации петли CDR-H3. Представление смоделированного переменного участка мышинового антитела 3A4 приведено на фиг. 8. Структуры человеческих или гуманизированных переменных последовательностей, которые наиболее похожи на каждую из переменных последовательностей 3A4, также определили из PDB, а затем наложили на смоделированные структуры переменных участков мышинового 3A4. Эти структуры включают записи 3QCT, 3AAZ, 1WT5 и 3M8O в PDB для легкой цепи и записи 1I9R, 3NFP, 1T04, 1ZA6, 3HC4, 2D7T и 1WT5 в PDB для тяжелой цепи. Эти структуры использовали для оценки при моделировании мутаций в каркасном участке для построения гуманизированных 3D-структур, исходя из смоделированной мышиной 3D-структуры.

Характеристика аминокислотных последовательностей мышинового 3A4 и смоделированной структуры.

Данный этап осуществляли для оценки показателя гуманизации, показателя предрасположенности контактировать с антигеном, для очерчивания CDR, канонических остатков, упаковки внутри цепи (граничные остатки VH/VL), упаковки переменных/константных участков (граничные остатки V_H/C_H и V_L/C_L), нестандартных каркасных остатков, потенциальных сайтов для N- и O-гликозилирования, погруженных остатков, остатков верньерной зоны и вблизи CDR. Для оценки данных свойств применяли доступные в Интернете ресурсы и локальное программное обеспечение.

Выбор наилучших каркасов тяжелой цепи и легкой цепи человека для мышинных CDR.

Это осуществляли с помощью стандартного сравнения гомологии последовательностей по отношению к локальной копии баз данных эмбриональных линий человека (VBASE) по отношению к другим библиотекам последовательностей (Genbank и SwissProt), а также набору каркасных консенсусных последовательностей человека. Поиски BLAST провели для отыскивания совпадений последовательностей с наивысшей гомологией только в каркасном участке (исключая, таким образом, CDR), при этом приводя в соответствие с длиной петель CDR. Каркасы человека, обнаруженные для легкой и тяжелой цепей антитела 3A4, соответствуют классам k2 и h1 соответственно. Помимо консенсусных последовательностей человека для данных классов, получили несколько каркасных последовательностей зародышевой линии человека, которые наиболее схожи с каркасными последовательностями 3A4.

Определение каркасных остатков для возвратных мутаций и разработка множественных гуманизированных вариантов.

Это важный этап, при помощи которого отмечают аминокислотные остатки, которые с особой осторожностью необходимо мутировать в соответствующие последовательности человека. Эти остатки представляют собой основные кандидаты для возвратных мутаций в мышинных последовательностях в случае потери аффинности. Это наиболее трудный и непредсказуемый этап гуманизации по схеме, особенно в отсутствие экспериментальной структуры комплекса антитело-антиген. Он основан на определении остатков в одной или нескольких из следующих категорий: канонические остатки, остатки CDR-H3, остатки верньерной зоны, нестандартные остатки, остатки вблизи CDR (в пределах 5 Å), упаковка внутри цепи и остатки сайта гликозилирования. Такие остатки могут прямо или опосредованно затрагивать сайт связывания антигена и аффинность. Показатель предрасположенности контактирования с антигеном, а также встречаемость аминокислот в базах данных зародышевых линий человека в каждом положении также очень важны при вынесении решения, можно ли безопасно мутировать определенный остаток из мышиной последовательности в последовательность человека. Гуманизация переменного участка легкой цепи антитела 3A4 включает 11 мутаций в его предложенном гуманизированном каркасе для 100% гуманизации каркаса. Гуманизация переменного участка тяжелой цепи антитела 3A4 включает 23 мутации в его предложенном гуманизированном каркасе для 100% гуманизации каркаса. Эти на 100% гуманизированные последовательности переменного участка обозначены Lvhl и Hvh1 соответственно (SEQ ID NO: 33 и 38). Также были сконструированы дополнительные гуманизированные последовательности, в которых несколько остатков из мышинных последовательностей 3A4 сохранили, исходя из тщательного структурного и сравнительного анализа последовательностей, которые показали высокую вероятность изменения антигенсвязывающей аффинности в случае введения мутаций в эти положения. Эти последовательности переменных участков обозначены Lvhl, Hvh2, Hvh3 и Hvh4 (SEQ ID NO: 34,

39, 40 и 41).

Два варианта гуманизированных легких цепей (включающие константный участок) в данном документе определены как Lh1 (SEQ ID NO: 43) и Lh2 (SEQ ID NO: 44). Четыре варианта гуманизированных тяжелых цепей (включающие константный участок) в данном документе определены как Hh1 (SEQ ID NO: 46), Hh2 (SEQ ID NO: 47), Hh3 (SEQ ID NO: 48) и Hh4 (SEQ ID NO: 49). Две гуманизированные легкие цепи и четыре гуманизированные тяжелые цепи можно собрать в восьми гуманизированных антител (Lh1Hh1, Lh1Hh2, Lh1Hh3, Lh1Hh4, Lh2Hh1, Lh2Hh2, Lh2Hh3 и Lh2Hh4). Молекулярные модели для этих комбинаций построили при помощи гомологичного моделирования, исходя из 3D модели варибельного участка мышиного 3A4, и они изображены на фиг. 9A-9H.

В случае гуманизированной последовательности LvH2 (SEQ ID NO: 34) легкой цепи 3A4 сохраняли каркасные остатки Val-L2 и Lys-L45 из мышиной последовательности, поскольку остаток L2 наполовину погружен, контактирует как с CDR-L1, так и с CDR-L3 и имеет предрасположенность к контакту с антигеном, в то время как остаток L45 взаимодействует с тяжелой цепью. Отмечали, что оба этих мышиных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности HvH2 (SEQ ID NO: 39) тяжелой цепи 3A4 сохраняли 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 вернейшей зоне, поддерживающей CDR-H2, и оба этих мышиных остатка могут встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности HvH3 (SEQ ID NO: 40) тяжелой цепи 3A4 сохраняли, возвратные мутации Ile-H2 и Lys-L73, и помимо них сохранили 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 вернейшую зону, поддерживающую CDR-H2, а также мышиный остаток H71 может встречаться в человеческих каркасах. В случае гуманизированной последовательности HvH4 (SEQ ID NO: 41) тяжелой цепи 3A4 включили все шесть возвратных мутаций гуманизированного варианта HvH3 плюс два дополнительных мышиных каркасных остатка Lys-H38 и Lys-H66, поскольку они являются наполовину погруженными остатками, близкими к CDR-H2. Полученные аминокислотные последовательности мышиных и гуманизированных цепей приведены в табл. 1. Выравнивание варибельных участков мышиных и гуманизированных легких цепей показано на фиг. 10A, а выравнивание варибельных участков мышиных и гуманизированных тяжелых цепей показано на фиг. 10B.

Фиг. 11A и 11B представляют собой выравнивание варибельного участка мышиной легкой цепи с варибельным участком на 100% гуманизированной легкой цепи и варибельного участка мышиной тяжелой цепи с варибельным участком на 100% гуманизированной тяжелой цепи соответственно. Данная фигура иллюстрирует аминокислоты, которые являются консервативными, и аминокислоты, которые были выбраны для замены.

Пример 7.

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. Ввели полноразмерные антитела или Fab-фрагменты и позволили провзаимодействовать с иммобилизованным КААГ1.

Построение плазмиды, кодирующей химерные (мышиные) 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: 50, и 3'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 51; легкая цепь, 5'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 52, и 3'-олиго, кодируемый SEQ ID NO: 53. Полученные ПЦР-продукты расщепили с помощью Hind III и клонировали в pK-CR5 (SEQ ID NO: 21), 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 (Hh1, Hh2, Hh3 и Hh4), заказали у GenScript (Пискаутауэй, 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 фиг. 12A 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: 55), предварительно дефосфорилированной при помощи фосфатазы из кишечника коровы (NEB) для предупреждения рецирку-

ляризации. На фиг. 12В изображена карта плазмиды pMPG-CR5-3A4-LC-variant1. Все варианты легкой цепи гуманизированного 3A4 построили аналогичным образом.

Исследование временной трансфекции.

Плазмидную ДНК выделили из небольших культур *E. coli* с применением набора Mini-Prep (Qiagen Inc, Миссиссога, Онтарио) согласно рекомендациям производителя. Вкратце, 2 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, засеяли одной колонией, забранной 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 с применением протоколов, буферов и колонок, поставляемых с набором. ДНК элюировали с помощью 50 мкл стерильной воды. Плазмидную ДНК выделили из большой культуры *E. coli* с применением набора Plasmid Plus Maxi (Qiagen Inc, Миссиссога, Онтарио) согласно рекомендациям производителя. 200 мл LB среды, содержащей 100 мкг/мл ампициллина, засеяли одной свежей колонией *E. coli* и инкубировали в течение ночи при 37°C с интенсивным помешиванием (250 об/мин). Бактерии (130 мл культуры для тяжелой цепи и 180 мл культуры для легкой цепи) осаждали центрифугированием при 6000×g, в течение 15 мин, при 4°C и выделяли плазмиду с применением протоколов, буферов и колонок, поставляемых с набором. Чистые плазмиды ресуспендировали в стерильном 50 мМ Tris, pH 8, и количественно оценили путем измерения оптической плотности при 260 нм. Перед трансфекцией очищенную плазмиду простерилизовали экстракцией с фенолом/хлороформом с последующим осаждением этанолом. Плазмиды ресуспендировали в стерильном 50 мМ Tris, pH 8, и количественно оценивали по оптической плотности при 260 нм.

Перед трансфекцией клетки (CHO-сТА) промывали посредством PBS и ресуспендировали в концентрации $4,0 \times 10^6$ клеток/мл в ростовой среде (CD-CHO, Invitrogen) без сульфата декстрана в течение 3 ч в суспензионной культуре. Для каждой комбинации плазмид 45 мл клеток трансфицировали путем медленного добавления 5 мл среды CD-CHO, дополненной 10 мкг/мл каждой плазмиды и 50 мкг/мл полиэтиленimina (PEI Max; Polysciences). Конечная концентрация составила 1 мкг/мл каждой плазмиды и 5 мкг/мл PEI. Через 2 ч клетки трансфицировали при 30°C. На следующие 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 очищали супернатант путем центрифугирования и профильтровали через 0,22 мкм фильтр.

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

Очистка антитела.

15 мл супернатанта от трансфицированных образцов клеток CHO концентрировали центрифугированием с применением кассеты Amicon Ultra (Ultracell-50k) при 1500 об/мин. Сконцентрированное антитело (550 мкл) очистили с помощью набора Nab spin kit Protein A Plus (Thermo Scientific) согласно рекомендациям производителя. Очищенные антитела затем обессолили с помощью 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 ресуспендировали в равном объеме Laemmli 2× и нагревали при 95°C в течение 5 мин, и охлаждали на льду.

Строили стандартную кривую с помощью известного количества очищенной каппа IgG1 человека из плазмы с миеломой человека (Athens Research). Образцы разделяли на полиакриламидном геле Novex с 10% Tris-глицин (Invitrogen Canada Inc., Берлингтон, Онтарио) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-N (Amersham Bioscience Corp., Бэ-д'Юрфе, Квебек) на 1 ч при силе тока 275 мА. Мембрану фиксировали в течение 1 ч в 0,15% Tween 20, 5% обезжиренного молока в PBS и инкубировали в течение 1 ч с антителом козы к IgG человека (H+L), конъюгированным с Cy5 (Jackson, № по каталогу 109-176-099). Проявляли сигнал и определяли количество путем сканирования при помощи сканера Turphoon Trio+ (GE Healthcare). Как показано на фиг. 13, все комбинации вариантов гуманизированного антитела 3A4 экспрессировались в клетках CHO.

Пример 8.

Кинетический анализ мышинового и гуманизированного антитела 3A4.

Источники.

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

Гель-фильтрация.

Белок КАAG1 в концентрации 3,114 мг/мл и объемом 220 мкл ввели в колонку Superdex G75. Раз-

деление выполнили при 0,4 мл/мин, в подвижном буфере HBST (см. ниже) без Tween 20. Объем собранных фракций составил 500 мкл. Концентрацию КААГ1 в каждой фракции определили по OD_{280} с помощью коэффициента удлинения 5500 и MW 8969. На фиг. 14 представлен профиль гель-фильтрации КААГ1. Небольшой пик возможного агрегата представляет собой элюат на уровне около 11 мл. Элюат белка на уровне 13 мл использовали в качестве аналита для анализа SPR (фракции 15-19).

Анализы с биосенсорами SPR.

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 мышиногo 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 аналита (горизонтальное). Сразу после активации в направлении подачи аналита 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 иммобилизовалось примерно 8000 резонансных единиц (RU). Оставшиеся активные группы заблокировали посредством 300 с введения 1 M этаноламина со скоростью 30 мкл/мин в направлении подачи аналита, и это также обеспечивает создание ложно активированных промежуточных сигналов для холостого контроля. Скрининг вариантов 3A4 на связывание с КААГ1 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 КААГ1 в направлении подачи аналита. 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 разбавили 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 последовали два введения буфера в направлении подачи аналита для стабилизации фонового уровня, а затем ввели очищенный при помощи гель-фильтрации КААГ1. Для типичного скрининга в отдельные каналы для аналита одновременно вводили пять концентраций КААГ1 (8, 2,66, 0,89, 0,29 и 0,098 nM) и буферный контроль со скоростью 50 мкл/мин в течение 120 с с 600 с фазой диссоциации, что дало набор сенсограмм связывания с буферным эталоном для каждого из захваченных вариантов 3A4. Комплексы поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека, - 3A4 разбили путем 18 с подачи 0,85% фосфорной кислоты в течение 18 с при 100 мкл/мин для подготовки поверхности, специфической к Fc-фрагменту IgG человека, к следующему циклу введения. Сенсограммы выровняли и сопоставили 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 определили путем приближения упомянутых сенсограмм к модели связывания Langmuir 1:1 с применением локального R_{max} , а константы аффинности (K_D M) вывели из полученных констант скорости (k_d с⁻¹/ k_a M⁻¹·с⁻¹).

Определение констант скорости и аффинности.

На фиг. 15 подытожены константы скорости ассоциации (k_a , 1/M·с) и диссоциации (k_d , 1/с), а также константы аффинности (K_D , M) для взаимодействия КААГ1 с очищенным мышинным 3A4, мышинным 3A4, которое временно экспрессировалось в качестве химерного, и временно экспрессируемыми гуманизированными вариантами. Эти константы графически представлены на фиг. 16. Константы скорости ассоциации очень сходны с чистыми исходными, химерными и гуманизированными вариантами 3A4 (фиг. 16A). Константы скорости диссоциации сходны с временно экспрессируемыми химерами при сравнении с исходными 3A4, что указывает на то, что процедура трансфекция не изменила параметры взаимодействия КААГ1 с антителом (фиг. 16B). Тем не менее все гуманизированные варианты похоже имели слегка измененную скорость диссоциации, т.е. более быструю скорость диссоциации (фиг. 16B). Это отражено в константах аффинности (фиг. 16C). 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 аффинности связывания отличается лишь в 4 раза между наихудшим вариантом (H1L1, 0,47 nM), у которого не было сохраненных мышинных остатков, и наилучшим вариантом, у которого было 10 сохраненных мышинных остатков (H4L2, 0,1 nM). Наконец, было обнаружено, что аффинность связывания у всех вариантов с КААГ1 является субнаномолярной, а наилучший вариант (H4L2, 0,1 nM) демонстрировал аффинность приблизительно в 6 раз слабее, чем мышинное антитело (LcHc, 0,057 nM). В целом, данные результаты указывают на то, что гуманизация была успешной, поскольку все варианты проявляли очень высокую аффинность к КААГ1.

Пример 9.

Связывание гуманизированных вариантов 3A4 с КААG1 в ELISA.

Также применили способы ELISA для сравнения связывающей активности гуманизированных вариантов 3A4 с мышинным антителом 3A4. Рекомбинантный КААG1 человека внесли в 96-луночные планшеты для нанесения покрытия на ночь, промыли и инкубировали в течение 1 ч при RT с повышающимися количествами мышинных или гуманизированных вариантов 3A4. После другого цикла этапов промывки в лунки добавили антитело к антителу человека, конъюгированное с HRP, и калориметрически измерили связанное антитело 3A4 при Abs₄₅₀. Как показано на фиг. 17A, гуманизированные варианты (Lh1Nh1, Lh1Nh2, Lh1Nh3 и Lh1Nh4) проявляли очень сходное связывание с КААG1 при сравнении с мышинным 3A4 (LcHc). Этот результат указывал на то, что все четыре варианта гуманизированной тяжелой цепи были сопоставимы с исходной тяжелой цепью h3A4 при сборке с вариантом L1 гуманизированной легкой цепи. На фиг. 17B 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 в сравнении с мышинным 3A4. Это согласовывалось с данными SPR (см. пример 3), из которых видно, что вариант 4 тяжелой цепи характеризовался наивысшей аффинностью к КААG1. Взятые вместе, эти данные по связыванию демонстрируют, что все гуманизированные варианты в данном анализе взаимодействуют с КААG1 человека. Несмотря на то что существовали тонкие различия, связывание в ELISA согласовывалось с результатами SPR.

Пример 10.

Связывание гуманизированных вариантов 3A4 на поверхности раковых клеток.

Применили проточную цитометрию для оценки способности гуманизированных вариантов 3A4 взаимодействовать с КААG1, экспрессируемым на поверхности раковых клеток. В связи с этим клетки карциномы яичника SKOV-3, которые, как показали 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 либо с 3,0, 0,3 мг/мл, либо 0,3 мг/мл антител в течение 1 ч. После трех этапов промывания клетки инкубировали с вторичным антителом, антителом к IgG человека, конъюгированным с FITC, в течение 1 ч на льду. Флуоресценцию на клеточной поверхности измерили в проточном цитометре, и значения показаны в гистограмме на фиг. 18. Как показано, все варианты могли выявлять КААG1 на поверхности непремеабиллизированных клеток, и наиболее сильные сигналы получили 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 (фиг. 18, см. Lh1Nh4 и Lh2Nh4) взаимодействовали с КААG1 на поверхности клеток с наивысшей активностью. Фактически, Lh1Nh4 и Lh2hh4, по-видимому, демонстрировали слегка улучшенное связывание на клеточной поверхности с КААG1 по сравнению с мышинным антителом 3A4 (LcHc).

Публикации (содержание которых включено в данный документ по ссылке)приведены ниже.

Ссылки

- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ and Thun MJ. Cancer statistics, 2005. CA Cancer J Clin 2005; 55: 10-30.
- Menon U, Skates SJ, Lewis S, Rosenthal AN, Rufford B, Sibley K, Macdonald N, Dawnay A, Jeyarajah A, Bast RC Jr, Oram D and Jacobs IJ. Prospective study using the risk of ovarian cancer algorithm to screen for ovarian cancer. J Clin Oncol. 2005; 23(31):7919-26.
- Bonome T, Lee JY, Park DC, Radonovich M, Pise-Masison C, Brady J, Gardner GJ, Hao K, Wong WH, Barrett JC, Lu KH, Sood AK, Gershenson DM, Mok SC and Birrer MJ. Expression profiling of serous low malignancy potential, low grade, and high-grade tumors of the ovary. Cancer Res 2005; 65: 10602-10612.
- Chambers, A and Vanderhyden, B. Ovarian Cancer Biomarkers in Urine. Clin Cancer Res 2006; 12(2): 323-327.
- Berek et al. Cancer Medicine. 5th ed. London: B.C. Decker, Inc.; 2000. pp. 1687-1720.
- Bristow R.E. Surgical standards in the management of ovarian cancer. Curr Opin Oncol 2000; 12: 474-480.
- Brown E, Stewart M, Rye T, Al-Nafussi A, Williams AR, Bradburn M, Smyth J and Gabra H. Carcinosarcoma of the ovary: 19 years of prospective data from a single center. Cancer 2004; 100: 2148-2153.
- Shih L-M and Kurman RJ. Molecular Pathogenesis of Ovarian Borderline Tumors: New Insights and Old Challenges. Clin Cancer Res 2005; 11(20): 7273-7279.
- Seidman JD, Russell P, Kurman RJ. Surface epithelial tumors of the ovary. In: Kurman RJ, editor. Blaustein's pathology of the female genital tract. 5th ed. New York: Springer-Verlag; 2002. pp. 791-904.
- Cannistra SA and McGuire WP. Progress in the management of gynecologic cancer. J. Clin. Oncol. 2007; 25(20): 2865-2866.
- Oei AL, Sweep FC, Thomas CM, Boerman OC, Massuger LF. The use of monoclonal antibodies for the treatment of epithelial ovarian cancer. Int. J. Oncol. 2008; 32(6): 1145-1157.
- Nicodemus CF and Berek JS. Monoclonal antibody therapy of ovarian cancer. Expert Rev. Anticancer Ther. 2005; 5(1): 87-96.
- Burger RA. Experience with bevacizumab in the management of epithelial ovarian cancer. J. Clin. Oncol. 2007; 25(20): 2902-2908.
- Simon I, Zhuo S, Corral L, Diamandis EP, Sarno MJ, Wolfert RL, Kim NW. B7-H4 is a novel membrane-bound protein and a candidate serum and tissue biomarker for ovarian cancer.

Cancer Res. 2006; 66(3): 1570-1575.

- Ebel W, Routhier EL, Foley B, Jacob S, McDonough JM, Patel RK, Turchin HA, Chao Q, Kline JB, Old LJ, Phillips MD, Nicolaides NC, Sass PM, Grasso L. Preclinical evaluation of MORab-003, a humanized monoclonal antibody antagonizing folate receptor-alpha. Cancer Immun. 2007; 7: 6-13.
- Van den Eynde BJ, Gaugler B, Probst-Kepper M, Michaux L, Devuyst O, Lorge F, Weynants P, Boon T. A new antigen recognized by cytotoxic T lymphocytes on a human kidney tumor results from reverse strand transcription. J. Exp. Med. 1999; 190(12): 1793-1799.
- Sooknanan R, Tremblay GB, Filion M. Polynucleotides and polypeptide sequences involved in cancer. 2007; PCT/CA2007/001134 published under No. WO/2007/147265 on December 27, 2007.
- Schumacher J, Anthoni H, Dahdouh F, König IR, Hillmer AM, Kluck N, Manthey M, Plume E, Warnke A, Remschmidt H, Hülsmann J, Cichon S, Lindgren CM, Propping P, Zucchelli M, Ziegler A, Peyrard-Janvid M, Schulte-Körne G, Nöthen MM, Kere J. Strong genetic evidence of *DCDC2* as a susceptibility gene for dyslexia. Am. J. Hum. Genet. 2006; 78: 52-62.
- Cope N, Harold D, Hill G, Moskvina V, Stevenson J, Holmans P, Owen MJ, O'Donovan MC, Williams J. Strong evidence that *KIAA0319* on chromosome 6p is a susceptibility gene for developmental dyslexia. Am. J. Hum. Genet. 2005; 76: 581-591.
- Mor G, Visintin I, Lai Y, Zhao H, Schwartz P, Rutherford T, Yue L, Bray-Ward P and Ward DC Serum protein markers for early detection of ovarian cancer. PNAS 2005; 102: 7677-7682.
- Kozak KR, Amneus MW, Pusey SM, Su F, Luong MN, Luong SA, Reddy ST and Farias-Eisner R. Identification of biomarkers for ovarian cancer using strong anion-exchange ProteinChips: potential use in diagnosis and prognosis. PNAS 2003; 100: 12343-12348.
- Benoît MH, Hudson TJ, Maire G, Squire JA, Arcand SL, Provencher D, Mes-Masson AM, Tonin PN. Global analysis of chromosome X gene expression in primary cultures of normal ovarian surface epithelial cells and epithelial ovarian cancer cell lines. Int. J. Oncol. 2007; 30(1): 5-17.
- Cody NA, Zietarska M, Filali-Mouhim A, Provencher DM, Mes-Masson AM, Tonin PN. Influence of monolayer, spheroid, and tumor growth conditions on chromosome 3 gene expression in tumorigenic epithelial ovarian cancer cell lines. BMC Med. Genomics 2008; 1(1): 34.
- Buechler J, Valkirs G, Gray J. Polyvalent display libraries. 2000; U.S. 6,057,098.
- Durocher Y, Kamen A, Perret S, Pham PL. Enhanced production of recombinant proteins by transient transfection of suspension-growing mammalian cells. 2002; Canadian patent

application No. CA 2446185.

- Durocher Y. Expression vectors for enhanced transient gene expression and mammalian cells expressing them. 2004; U.S. patent application No. 60/662,392.
- Tremblay GB, Filion M. Antibodies that specifically block the biological activity of a tumor antigen. 2009; PCT/CA2009/001586.
- Durocher Y, Kamen A, Perret S, Pham PL. Enhanced production of recombinant proteins by transient transfection of suspension-growing mammalian cells. 2002; Canadian patent application No. CA 2446185.
- Durocher Y. Expression vectors for enhanced transient gene expression and mammalian cells expressing them. 2004; U.S. patent application No. 60/662,392.
- Chang MH, Karageorgos LE, Meikle PJ. CD107a (LAMP-1) and CD107b (LAMP-2). 2002; J Biol Regul Homeost Agents. **16**:147-51.
- Abhinandan, KR and Martin, ACR. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. 2008; Mol Immunol, **45**, 3832-3839.

Последовательности, на которые ссылаются в описании, приведены ниже.

Последовательности

SEQ ID NO:1 – нуклеотидная последовательность варибельного участка тяжелой цепи 3A4.

CAGATCCAGTTGGTGCAATCTGGACCTGAGATGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATG
TCCTGTAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTGACGACTACATGAGCTGGGTGAAACAGAGCC
ATGGAAGAGCCTTGAGTGGATTGGAGATATTAATCCTTACAACGGTGATACTAACTACAAC
CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCATATTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGC
AGCTCAACAGCCTGACATCGGAAGACTCAGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGACCCGGGGG
STATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:2 – полипептидная последовательность варибельного участка тяжелой цепи 3A4.

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYNQ
KFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS

SEQ ID NO:3 – нуклеотидная последовательность варибельного участка легкой цепи 3A4.

GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGGCTGTCAGTCTTGAGATCAAGCCTCCA
TCTCTTGACAGATCTAGTCAGAGCCTTCTACATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAATGGTAC
CTTCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCCACACAGTTTCAACCGATTTTCTG
GGGTCCCAGACAGATTCAAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCAC
GTTCCGGTGTGGGACCAGGCTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO:4 – полипептидная последовательность варибельного участка легкой цепи 3A4.

DVVMQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLHSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFSQVP
DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTRLELK

SEQ ID NO:5 – полипептидная последовательность CDR1 тяжелой цепи 3A4.
GYFTDDYMS

SEQ ID NO:6 – полипептидная последовательность CDR2 тяжелой цепи 3A4.
DINPYNGDTN

SEQ ID NO:7 – полипептидная последовательность CDR3 тяжелой цепи 3A4.
DPGAMDY

SEQ ID NO:8 – полипептидная последовательность CDR1 легкой цепи 3A4.
RSSQSLHSGNTYLE

SEQ ID NO:9 – полипептидная последовательность CDR2 легкой цепи 3A4.
TVSNRFS

SEQ ID NO:10 – полипептидная последовательность CDR3 легкой цепи 3A4.
FQGS HVPLT

SEQ ID NO:11 – OGS1773
GTAAGCAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC

SEQ ID NO:12 – OGS1774
GTAAGCGCTAGCCTAACACTCTCCCTGTTGAAGC

SEQ ID NO:13 - нуклеотидная последовательность константных участков каппа цепи человека.

GCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAA
CTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAA
GGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAA
GGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTT
CAACAGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:14 - полипептидная последовательность константных участков каппа цепи человека.

AVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:15
CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGT
GAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCAAAAACGA
GGAGGATTTGATATTCACCTGGCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCAC
TTTGCCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTAAACGGATCTCTAGCGAAT
TCATGAACTTTCTGCTGTCTTGGGTGCATTGGAGCCTTGCTTGCTGCTCTACCTCCACCAT
GCCAAGTGGTCCCAGGCTTGAGACGGAGCTTACAGCGCTGTGGCTGCACCATCTGTCTTC
ATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGA
ATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGG
TAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG
CACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCAC
CCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAGGGTAC
CGCGGCCGCTTCGAATGAGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATTTATTT
TCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGAGGGCA

AATCATTTGGTCGAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCGCCGGACGAACATA
ACCTGACTACGGCATCTCTGCCCCCTTCTCGCGGGGCAGTGCATGTAATCCCTTCAGTTGG
TTGGTACAACCTTGCCAACTGGGCCCTGTTCCACATGTGACACGGGGGGGGACCAACACA
AAGGGGTTCTCTGACTGTAGTTGACATCCTTATAAATGGATGTGCACATTTGCCAACACTGA
GTGGCTTTCATCCTGGAGCAGACTTTGCAGTCTGTGGACTGCAACACAACATTGCCTTTAT
GTGTAACCTCTGGCTGAAGCTCTTACACCAATGCTGGGGGACATGTACCTCCCAGGGGCC
CAGGAAGACTACGGGAGGCTACACCAACGTCAATCAGAGGGGCCTGTGTAGCTACCGATA
AGCGGACCCTCAAGAGGGCATTAGCAATAGTGTATAAGGCCCTTGTAAACCCTAAAC
GGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGTAGTATATACTATCCAGACTAACCCCTAATTCAATAGCA
TATGTTACCCAACGGGAAGCATATGCTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAA
CAGCGATATCTCCACCCCATGAGCTGTCACGGTTTTATTACATGGGGTCAGGATCCAC
GAGGGTAGTGAACCATTTTAGTCACAAGGGCAGTGGCTGAAGTCAAGGAGCGGGCAGTG
AACTCTCCTGAATCTTCGCCTGCTTCTTATTCTCCTTCGTTTAGCTAATAGAATAACTGCTG
AGTTGTGAACAGTAAGGTGTATGTGAGGTGCTCGAAAACAAGGTTTCAGGTGACGCCCCCA
GAATAAAATTTGGACGGGGGGTTCAGTGGTGGCATTGTGCTATGACACCAATATAACCCTC
ACAAACCCCTTGGGCAATAAATACTAGTGTAGGAATGAAACATTCTGAATATCTTTAACAATA
GAAATCCATGGGGTGGGGACAAGCCGTAAAGACTGGATGTCCATCTCACACGAATTTATGG
CTATGGGCAACACATAATCCTAGTGCAATATGATACTGGGGTTATTAAGATGTGTCCCAGGC
AGGGACCAAGACAGGTGAACCATGTTGTTACACTCTATTTGTAACAAGGGGAAAGAGAGTG
GACGCCGACAGCAGCGGACTCCACTGTTGTCTCTAACACCCCCGAAAATTAAACGGGGC
TCCACGCCAATGGGGCCCATAAACAAAGACAAGTGCCACTCTTTTTTTTGAATTTGTGGA
GTGGGGGCACGCGTCAGCCCCACACGCCGCCCTGCGGTTTTGGACTGTAAAATAAGGGT
GTAATAACTTGGCTGATTGTAACCCCGCTAACCACTGCGGTCAAACCACTTGCCACAAAA
CCACTAATGGCACCCCGGGGAATACCTGCATAAGTAGGTGGCGGGGCCAAGATAGGGGC
GCGATTGCTGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCCAAGCACAGG
GTTGTTGGTCCTCATATTCAGAGGTCGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTTGCCATGGT
AGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATA
GGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGC
TATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTAT
CCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCATATGCTATCCT
AATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATACTACCCAAAT
ATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATC
TGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTG
GGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGT
AGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAG
CATATGCTATCCTCACGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATTCTTGAAGACGAAAGG
GCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTATGATAATAATGGTTTCTTAGACGTACG
GTGGCACTTTTCGGGGAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCA

ATTGGCTCATGTCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAA
TCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGTTACATAACTTACGGT
AAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCCATTGACGTCAATAATGACGTA
TGTTCCCATAGTAACGCCAATAGGGACTTTCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGT
AAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCGCCCCCTATTGACGT
CAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCCT
ACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTA
CACCAATGGGCGTGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTGAC
GTCAATGGGAGTTTGTTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCGAAATGTCGTAATAACCC
CGCCCCGTTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTGACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGC
TCGTTTAGTGAACCGTCAGATCCTCACTCTCTTCGCGATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTG
TTGGGCTCGCGGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCTTGATCGGAAACC
CGTCGGCCTCCGAACGCTACTCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGG
ATCGGAAACCTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCAC
CGTGGCGGGCGGCAGCGGTGGCGGTGCGGGTTGTTTCTGCGGAGGTGCTGCTGATGA
TGTAATTAAAGTAGGCGGT

SEQ ID NO:16 – OGS18500

ATGCCAAGTGGTCCCAGGCTGATGTTGTGATGACCCAAACTCC

SEQ ID NO:17 – OGS2084

GGGAAGATGAAGACAGATGGTGCAGCCACAGTCCG

SEQ ID NO:18 – OGS1769

GTAAGCGCTAGCGCCTCAACGAAGGGCCCATCTGTCTTTCCCTGGCCCC

SEQ ID NO:19 – OGS1770

GTAAGCGAATTCACAAGATTTGGGCTCAACTTTCTTG

SEQ ID NO:20 - нуклеотидная последовательность участка CH1 иммуноглобулина человека.

GCCTCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG
GGCACAGCAGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTC
GTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTC
AGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGAC
CTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCC
AAATCTTGT

SEQ ID NO:21 - полипептидная последовательность участка CH1 иммуноглобулина человека.

AATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAA
GAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCC
TGTTTTTGCTCACCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCA
CGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTGCCCCCG
AAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
GTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTG
AGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAG
TGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGGAGGA
CCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCAACATGGGGGATCATGTAACCTGCCTTGATCGTT
GGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATGCCTGCAG
CAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAACCTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCA
ACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTT
CCGGTGCGTGGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATC
ATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGGG
AGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCACTGATTA
AGCATTGGTAACTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAACTTCATT
TTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAACG
TGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATC
CTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCCGCTACCAGCGGTGGTT
TGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAACCTGGCTTCAGCAGAGCGC
AGATACCAAACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTA
GCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATA
AGTCGTGTCTTACCGGGTTGGAAGTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTGCG
GCTGAACGGGGGGTTCTGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACTGA
GATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAGAAAGGCGGACA
GGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGA
AACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTTGCGCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTT
GTGATGCTCGTCAGGGGGGCGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACG
GTTCTGCGCTTTTCTGCGCCTTTTGTCTACATGTTCTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTG
TGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCG
AGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAAACCGCCTCTC
CCCGCGCGTTGGCCGATTCAATATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCGACTGGAAAGCG
GGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCACCCAGGCTTTAC
ACTTTATGCTTCCGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGA
AACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTCTAGCTAGAGGTGACCAATTCTCATGTTTGAC
AGCTTATCATCGCAGATCCGGGCAACGTTGTTGCATTGCTGCAGGCGCAGAACTGGTAGGT
ATGGCAGATCTATACATTGAATCAATATTGGCAATTAGCCATATTAGTCATTGGTTATATAGC
ATAAATCAATATTGGCTATTGGCCATTGCATACGTTGTATCTATATCATAATATGTACATTTAT

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVTVPPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC

SEQ ID NO:22

CTTGAGCCGGCGGATGGTCGAGGTGAGGTGTGGCAGGCTTGAGATCCAGCTGTTGGGGT
GAGTACTCCCTCTCAAAAGCGGGCATTACTTCTGCGCTAAGATTGTCAGTTTCCAAAAACGA
GGAGGATTTGATATTCACCTGGCCGATCTGGCCATACACTTGAGTGACAATGACATCCAC
TTTGCCTTTCTCTCCACAGGTGTCCACTCCCAGGTCCAAGTTTGCCGCCACCATTGGAGACA
GACACACTCTGCTATGGGTACTGCTGCTCTGGGTTCCAGGTTCCACTGGCGGAGACGGA
GCTTACGGGGCCATCTGTCTTTCCCTGGCCCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCAC
AGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACT
CTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACAT
CTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCAAATCT
TGTGAATTACTIONCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCTGGGGGACCGTCA
GTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCA
CATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG
ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACG
TACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCTGCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTAC
AAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCA
AAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCA
AGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCGACATCGCCGTGG
AGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAATAACAAGACCACGCTCCCGTGTGGACT
CCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACCCTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGG
GGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAG
CCTCTCCCTGTCTCCCGGAAATGATCCCCGACCTCGACCTCTGGCTAATAAAGGAAATT
TATTTTCATTGCAATAGTGTGTTGGAATTTTTGTGTCTCTCACTCGGAAGGACATATGGGA
GGGCAAAATCATTGGTGCAGATCCCTCGGAGATCTCTAGCTAGAGCCCCGCCCGGACG
AACTAAACCTGACTACGGCATCTCTGCCCTTCTTCGCGGGGCAGTGATGTAATCCCTTC
AGTTGGTTGGTACAACTTGCCAACTGAACCCTAAACGGGTAGCATATGCTTCCCGGGTAGT
AGTATATACTATCCAGACTAACCCTAATCAATAGCATATGTTACCCAACGGGAAGCATATG
CTATCGAATTAGGGTTAGTAAAAGGGTCCTAAGGAACAGCGATGTAGGTGGGCGGGCCAA
GATAGGGGCGCGATTGCTGCGATCTGGAGGACAAATTACACACACTTGCGCCTGAGCGCC
AAGCACAGGGTTGTTGGTCTCATATTCACGAGGTGCTGAGAGCACGGTGGGCTAATGTT
GCCATGGGTAGCATATACTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTG
GGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGG
TAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAG
CATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTATCCGGGTAGCAT
ATGCTATCCTAATAGAGATTAGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATATA

CTACCCAAATATCTGGATAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCT
AATCTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAAT
CTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATTTATATCTGGGTAGCATAGGCTATCCTAATCTA
TATCTGGGTAGCATATGCTATCCTAATCTATATCTGGGTAGTATATGCTATCCTAATCTGTAT
CCGGGTAGCATATGCTATCCTCACGATGATAAGCTGTCAAACATGAGAATTAATCTTGAAG
ACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAATGGTTTCTTA
GACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATTTGTTATTTTTCTAAA
TACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAA
AAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATCCCTTTTTTGCGGCATTTT
GCCTTCTGTTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT
GGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTT
CGCCCCGAAGAACGTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATT
ATCCCGTGTTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTGCGCGCATACACTATTCTCAGAATGAC
TTGGTTGAGTACTACCAGTACAGAAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAAT
TATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGAT
CGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGACAACATGGGGGATCATGTAACTCGCCTT
GATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGAGCGTGACACCACGATG
CCTGCAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTC
CCGGCAACAATTAATAGACTGGATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTC
GGCCCTTCCGGCTGGCTGGTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCG
CGGTATCATTGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACG
ACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTCA
CTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATTGATTTAAA
CTTCATTTTTAATTTAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATC
CCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTT
CTTGAGATCCTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACACCGCTACCA
GCGGTGGTTTGTGCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCA
GCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAA
GAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAAGTGGCTGCTGCC
AGTGCGGATAAGTCGTGTCTTACCGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCG
CAGCGGTGCGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCACACAGCCAGCTTGGAGCGAACGACCTA
CACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCATTGAGAAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGGAG
AAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCGCACGAGGGAGC
TTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTGCGGTTTCGCCACCTCTGACTTGA
GCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGCGGAGCCTATGAAAAACGCCAGCAACGC
GGCCTTTTTACGGTTTCTGGCCTTTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTCTCGCTTAT
CCCCTGATTCTGTGGATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGAG
CCGAACGACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGTACATTTATATTGGCTCATG

TCCAATATGACCGCCATGTTGACATTGATTATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGG
 GTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCCGCGTTACATAACTTACGGTAAATGGCCCGC
 CTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGT
 AACGCCAATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAAACTGCCCAC
 TTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGCCAAGTCCGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTA
 AATGGCCCGCCTGGCATTATGCCCAGTACATGACCTTACGGGACTTTCTACTTGGCAGTA
 CATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACACCAATGGGC
 GTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCGAAGTCTCCACCCCATTTGACGTCAATGGGAG
 TTTGTTTTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCCAAAATGTCGTAATAACCCGCCCCGTTGA
 CGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGA
 ACCGTGAGTCTCTACTCTCTTCCGCATCGCTGTCTGCGAGGGCCAGCTGTTGGGCTCGC
 GGTTGAGGACAACTCTTCGCGGTCTTTCCAGTACTCTTGGATCGGAAACCCGTCGGCCTC
 CGAACGGTACTCCGCCACCGAGGGACCTGAGCGAGTCCGCATCGACCGGATCGGAAAAC
 CTCTCGAGAAAGGCGTCTAACCAGTCACAGTCGCAAGGTAGGCTGAGCACCGTGGCGGGC
 GGCAGCGGGTGGCGGTGCGGGTTGTTTCTGGCGGAGGTGCTGCTGATGTAATTAAG
 TAGGCGGT

SEQ ID NO:23 – OGS1879

GGGTTCCAGGTTCCACTGGCCAGATCCAGTTGGTGCAATCTGG

EQ ID NO:24 – OGS1810

GGGGCCAGGGGAAAGACAGATGGGCCCTTCGTTGAGGC

SEQ ID NO:25

GTAAGCGGATCCATGGATGACGACGCGGCGCCC

SEQ ID NO:26

GTAAGCAAGCTTAGGCCGCTGGGACAGCGGAGGTGC

SEQ ID NO:27

GTAAGCAAGCTTGGCAGCAGCGCCAGGTCCAGC

SEQ ID NO:28

GAGGGGCATCAATCACACCGAGAAGTCACAGCCCTCAACCACTGAGGTGTGGGGGGTA
 GGGATCTGCATTTCTTCATATCAACCCACACTATAGGGCACCTAAATGGGTGGCGGTGG
 GGGAGACCGACTCACTTGAGTTTCTTGAAGGCTTCCTGGCCTCCAGCCACGTAATTGCCCC
 CGCTCTGGATCTGGTCTAGCTTCCGGATTCCGTGGCCAGTCCGCGGGGTGTAGATGTTCC
 TGACGGCCCCAAAGGTGCCTGAACGCCGCCGGTCACCTCCTCAGGAAGACTTCGAAGC
 TGGACACCTTCTTCTCATGGATGACGACGCGCGCCCCGCGTAGAAGGGGTCCCCGTTGC
 GGTACACAAGCACGCTCTTCACGACGGGCTGAGACAGGTGGCTGGACCTGGCGCTGCTGC
 CGCTCATCTTCCCCGCTGGCCGCCGCTCAGCTCGCTGCTTCGCGTCGGGAGGCACCTCC
 GCTGTCCCAGCGCCTCACCGCACCCAGGGCGCGGGATCGCCTCCTGAAACGAACGAGA
 AACTGACGAATCCACAGGTGAAAGAGAAGTAACGGCCGTGCGCCTAGGCGTCCACCCAGA
 GGAGACACTAGGAGCTTGCAGGACTCGGAGTAGACGCTCAAGTTTTTACCCTGGCGTGC
 ACAGCCAATCAGGACCCGAGTGCGCGCACACACACAGGTTACCTGCTACGGGCAGAAT
 CAAGGTGGACAGCTTCTGAGCAGGAGCCGGAACGCGCGGGGCCTTCAAACAGGCACGC
 CTAGTGAGGGCAGGAGAGGAGGACGCACACACACACACACAAATATGGTGAAAC
 CCAATTTCTTACATCATATCTGTGCTACCCTTTCCAAACAGCCTA

SEQ ID NO:29

MDDDAAPRVEGVPVAVHKHALHDGLRQVAGPGAAAHLPRWPPQLAASRREAPPLSQRPH
 RTQGAGSPPETNEKLTNPQVKEK

SEQ ID NO:30 – (вариантный варибельный участок легкой цепи)

DXVMTQTPLSLXVXXGXASISCRSSQSLLHSNGNTYLEWYLQKPGQSPXLLIHTVSNRFSGV
 PDRFSGSGSDFTLKISRVEAEDXGVYYCFQGSHPVPLTFGXGTXLEXK

где по меньшей мере одна из аминокислот, указанных X, является аминокислотной заменой (консервативной или не консервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 4. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

SEQ ID NO:31 – (вариантный вариабельный участок легкой цепи)

DX_{a1}VMTQTPLSLX_{a2}VX_{a3}X_{a4}GX_{a5}X_{a6}ASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{a7}LLIHTV

SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{a8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{a9}GTX_{a10}LEX_{a11}K

где X_{a1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a2} может быть A или P;

X_{a3} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой;

X_{a4} может быть L или P;

X_{a5} может быть кислой аминокислотой;

X_{a6} может быть Q или P;

X_{a7} может быть основной аминокислотой;

X_{a8} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{a9} может быть A или Q;

X_{a10} может быть основной аминокислотой;

X_{a11} может быть гидрофобной аминокислотой;

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO:32 – (вариантный вариабельный участок легкой цепи)

DX_{A1}VMTQTPLSLX_{A2}VX_{A3}X_{A4}GX_{A5}X_{A6}ASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPX_{A7}LLIHTV

SNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDX_{A8}GVYYCFQGSHVPLTFGX_{A9}GTX_{A10}LEX_{A11}K

где X_{A1} может быть V или I;

X_{A2} может быть A или P;

X_{A3} может быть S или T;

X_{A4} может быть L или P;

X_{A5} может быть D или E;

X_{A6} может быть Q или P;

X_{A7} может быть K или Q;

X_{A8} может быть L или V;

X_{A9} может быть A или Q;

X_{A10} может быть R или K или

X_{A11} может быть L или I,

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 4.

SEQ ID NO:33 – (вариантный вариабельный участок легкой цепи 1: Lvh1)

DIVMTQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFSGV

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKEIK

SEQ ID NO:34 – (вариантный вариабельный участок легкой цепи 2: Lvh2)

DVVMQTPLSLPVTGPGEASISCRSSQSLLSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFSGV

DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGTKEIK

QXQLVQSGXEXXKPGASVKXSCKASGYTFDDYMSWVXQXGXGXXLEWXXGDPINPYNGDTN

QKFKGXXXXTXDXSSTAYMXLSLXSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTXTVTVSS

где по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 2. Аминокислотная замена может быть, например, консервативной.

SEQ ID NO:36 – (вариантный вариабельный участок тяжелой цепи)

QX_{b1}QLVQSGX_{b2}EX_{b3}X_{b4}KPGASVKX_{b5}SCKASGYTFDDYMSWVX_{b6}QX_{b7}X_{b8}GX_{b9}X_{b10}LEWXX_{b11}

GDINPYNGDTNQNQKFKGX_{b12}X_{b13}X_{b14}X_{b15}TX_{b16}DX_{b17}SX_{b18}STAYMX_{b19}LX_{b20}SLX_{b21}SEDXX_{b22}AV

YYCARDPGAMDYWGQGTXX_{b23}VTVSS

где X_{b1} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b2} может быть P или A;

X_{b3} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b4} может быть V или K;

X_{b5} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b6} может быть основной аминокислотой;

X_{b7} может быть S или A;

X_{b8} может быть H или P;

X_{b9} может быть основной аминокислотой;

X_{b10} может быть S или G;

X_{b11} может быть гидрофобной аминокислотой;

X_{b12} может быть основной аминокислотой;
 X_{b13} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b14} может быть I или T;
 X_{b15} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b16} может быть гидрофобной аминокислотой;
 X_{b17} может быть K или T;
 X_{b18} может быть нейтральной гидрофобной аминокислотой;
 X_{b19} может быть Q или E;
 X_{b20} может быть N или S;
 X_{b21} может быть T или R;
 X_{b22} может быть нейтральной гидрофильной аминокислотой или
 X_{b3} может быть S или L;

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO:37 – (вариантный вариабельный участок тяжелой цепи)

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

где X_{B1} может быть I или V;

X_{B2} может быть P или A;
 X_{B3} может быть M или V;
 X_{B4} может быть V или K;
 X_{B5} может быть M или V;
 X_{B6} может быть K или R;
 X_{B7} может быть S или A;
 X_{B8} может быть H или P;
 X_{B9} может быть K или Q;
 X_{B10} может быть S или G;
 X_{B11} может быть I или M;
 X_{B12} может быть K или R;
 X_{B13} может быть A или V;
 X_{B14} может быть I или T;
 X_{B15} может быть L или I;
 X_{B16} может быть V или A;
 X_{B17} может быть K или T;
 X_{B18} может быть S или T;
 X_{B19} может быть Q или E;
 X_{B20} может быть N или S;
 X_{B21} может быть T или R;
 X_{B22} может быть S или T или
 X_{B23} может быть S или L;

по меньшей мере одна аминокислота, указанная X, является аминокислотной заменой (консервативной или неконсервативной) по сравнению с соответствующей аминокислотой в полипептиде, изложенном в SEQ ID NO: 2.

SEQ ID NO:38 – (вариантный вариабельный участок 1 тяжелой цепи: Hvh1)
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY
 NQKFKGKRVITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:39 – (вариантный вариабельный участок 2 тяжелой цепи: Hvh2)
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYN
 QKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:40 – (вариантный вариабельный участок 3 тяжелой цепи: Hvh3)
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQ
 KFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO:41 – (вариантный вариабельный участок 4 тяжелой цепи: Hvh4)
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQ
 KFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO: 42 мышинная легкая (каппа) цепь 3A4
 DVVMTQTPLSLAVSLGDQASISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRFGV
 PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHPVPLTFGAGTRLELKRTVAAPSVFIFPPSD
 EQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKAD
 YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:43 вариант 1 гуманизированной легкой (каппа) цепи 3A4; Lh1
 DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRFGV
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:44 вариант 2 гуманизированной легкой (каппа) цепи 3A4; Lh2
 DVVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSQSLLSHNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYTVSNRFGV
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHPVPLTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSLTLSKADY
 EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:45 тяжелая (Igg1) цепь мышинного 3A4
 QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSWVKQSHGKSLEWIGDINPYNGDTNYN
 QKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNLSLTSSEDAVYYCARDPGAMDYWGQGSVTVSSASTKGPS
 VFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:46 вариант 1 гуманизированной тяжелой (Igg1) цепи 3A4; Hh1
 QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY
 NQKFKGKRVITADTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP
 SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT
 TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDT
 LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
 WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD
 IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ
 KSLSLSPGK

SEQ ID NO:47 вариант 2 гуманизированной тяжелой (Igg1) цепи 3A4; Hh2
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNYN
 QKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPS
 VFLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT

VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:48 вариант 3 гуманизированной тяжелой (Igg1) цепи 3A4; Hh3
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVRQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQ
 KFKGRATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:49 вариант 4 гуманизированной тяжелой (Igg1) цепи 3A4; Hh4
 QIQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDDYMSWVKQAPGQGLEWIGDINPYNGDTNYNQ
 KFKGKATLTVDKSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCARDPGAMDYWGQGTLLTVSSASTKGPSV
 FPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV
 PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTL
 MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW
 LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
 VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK
 SLSLSPGK

SEQ ID NO:50
 ATACCCAAGCTTGCCACCATGGAGACAGACACAC

SEQ ID NO:51
 ATACCCAAGCTTCATTTCCCGGAGACAGGGAG

SEQ ID NO:52
 ATACCCAAGCTTGGGCCACCATGAACTTTCTGCTGTCTTGG

SEQ ID NO:53
 ATACCCAAGCTTCTAACTCTCCCTGTTGAAG

SEQ ID NO:54 pK-CR5
 CTAAATTGTAAGCGTTAATATTTTGTAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTT
 TTTAACCAATAGGCCGAAATCGGCAAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAG

GGTTGAGTGTTGTTCCAGTTTGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGT
CAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCAGGGCGATGGCCCACTACGTGAACCATCACCTAATC
AAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCTAAAGGGAGCCCCCG
ATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGAAGAAAGCGA
AAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACGCTGCGCGTAACCACCACA
CCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCCATTCGCCATTAGGCTGCGCAA
CTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGG
GATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA
AAACGACGGCCAGTGAGCGCGCGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCCACC
GCGGTGGCGGCCGCTCTAGAAGTAGTGGATCCACATCGGCGCGCCAAATGATTTGCCCTC
CCATATGTCTTCCGAGTGAGAGACACAAAAAATCCAACACACTATTGCAATGAAAAATAA
TTTCCTTTATTAGCCAGAGGTGAGATTTAAATAAGCTTGCTAGCAGATCTTTGGACCTGGG
AGTGAGACACCTGTGGAGAGAAAGGCCAAAGTGGATGTCATTGTCACCTCAAGTGTATGGCCA
GATCGGGCCAGGTGAATATCAAATCCTCCTCGTTTTTGGAACTGACAATCTTAGCGCAGA
AGTAATGCCCCGCTTTTGAGAGGGAGTACTCACCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCAC
ACCTCACCTCGACCATCCGCCGTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCAC
CTCCGCCAGAAACAACCCCGACCGCCACCCGCTGCCGCCCGCCACGGTGCTCAGCCTAC
CTTGCGACTGTGACTGGTTAGACGCCTTTCTCGAGAGGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGG
ACTCGCTCAGGTCCCTCGGTGGCGGAGTACCGTTCGGAGGCCGACGGGTTCCGATCCA
AGAGTACTGGAAGACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCTC
GCAGACAGCGATGCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGCTTCTA
TGGAGGTCAAAACAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCATCTGACGGTTCACTAAACGAGCT
CTGCTTATATAGGCCTCCACCGTACACGCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTTATAATA
CAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAAT
ACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAA
TACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAA
GGTTGTGCGAGTGAAGACGAAAGGGTTCATTAAGGCGCGCCGTCGACCTCGAGGGGGGGC
CCGGTACCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATTGCGCGCTTGGCGTAATCATGGT
CATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATTCCACACAACATACGAGCCGG
AAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCATATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTG
CGCTCACTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGC
CAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTTGCGTATTGGGCGCTCTCCGCTTCTCGCTCACTGAC
TCGCTGCGCTCGGTGTTTCGGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATA
CGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAA
AAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCT
GACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAA
AGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCG
CTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAC

GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAAC
 CCCCCGTTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACATATCGTCTTGAGTCCAACCCGG
 TAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT
 ATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGGA
 CAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAGAGTTGGTAGCTC
 TTGATCCGGCAAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTTGTGTTGCAAGCAGCAGATT
 ACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGGTCTGACGCTC
 AGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCAC
 CTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATAGTAAACTTG
 GTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGT
 CATCCATAGTTGCTGACTCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATC
 TGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGC
 AATAAACAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTC
 CATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCCGCAGTTAATAGTTTGC
 GCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATGGCTTC
 ATTCAGCTCCGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAA
 GCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCGCAAGTGTATCAG
 TCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCT
 GTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGCGACCGAGTTGCT
 CTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAGTGCTCAT
 CATTGGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGT
 TCGATGTAACCCACTCGTGACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTTTACACGCGTTTC
 TGGGTGAGCAAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAA
 ATGTTGAATACTCATACTCTTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCT
 CATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACAT
 TTCCCCGAAAAGTGCCAC

SEQ ID NO:55 pMPG-CR5

GTCGACGATACCGTGCACTTAATTAAGCGCGCTCGACCAAATGATTTGCCCTCCCATATGT
 CCTTCCGAGTGAGAGACACAAAAATTCCAACACACTATTGCAATGAAAAATAATTTCTTT
 ATTAGCCAGAGGTCGAGGTGCGGGGATCCGTTTAACTTGGACCTGGGAGTGGACACCTG
 TGGAGAGAAAGGCAAGTGGATGTCATTGTCACCTCAAGTGTATGGCCAGATCGGGCCAGG
 TGAATATCAAAATCCTCCTCGTTTTTGGAACTGACAACTTAGCGCAGAAAGTAATGCCCGCT
 TTTGAGAGGGAGTACTACCCCAACAGCTGGATCTCAAGCCTGCCACACCTCACCTCGAC
 CATCCGCCGTCTCAAGACCGCCTACTTTAATTACATCATCAGCAGCACCTCCGCCAGAAAC
 AACCCCGACCGCCACCCGCTGCCGCCGCCACGGTGCTCAGCCTACCTTGCAGTGTGA
 CTGGTTAGACGCTTTCTCGAGAGTTTTCCGATCCGGTCGATGCGGACTCGCTCAGGTC
 CCTCGGTGGCGGAGTACCGTTCCGAGGCCGACGGTTTTCCGATCCAAGAGTACTGGAAA
 GACCGCGAAGAGTTTGTCTCAACCGCGAGCCCAACAGCTGGCCCTCGCAGACAGCGAT

GCGGAAGAGAGTGACCGCGGAGGCTGGATCGGTCCCGGTGTCTTCTATGGAGGTCAAAA
CAGCGTGGATGGCGTCTCCAGGCGATCTGACGGTTCACTAAACGAGCTCTGCTTATATAG
GCCTCCCACCGTACACGCCCTACCTCGACCCGGGTACCAATCTTATAATAACAAACAGACCAG
ATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCA
GATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACC
AGATTGTCTGTTTGTATAATAACAAACAGACCAGATTGTCTGTTTGTAAAGTTGTCGAGTG
AAGACGAAAGGGTTAATTAAGGCGCGCCGTCGACTAGCTTGGCACGCCAGAAATCCGCGC
GGTGGTTTTTGGGGTTCGGGGGTGTTTGGCAGCCACAGACGCCCGGTGTTCTGTCTGCG
CCAGTACATGCGGTCCATGCCAGGCCATCCAAAAACCATGGGTCTGTCTGCTCAGTCCA
GTCGTGGACCAGACCCACGCAACGCCAAAATAATAACCCACGAACCATAAACCATTC
CCCATGGGGGACCCCGTCCCTAACCCACGGGGCCAGTGGCTATGGCAGGGCTGCCGCC
CCGACGTTGGCTGCGAGCCCTGGGCCTTCACCGAACTTGGGGGGTGGGGTGGGGAAAA
GGAAGAAACGCGGGCGTATTGGCCCCAATGGGGTCTCGGTGGGGTATCGACAGAGTGCC
AGCCCTGGGACCGAACCCCGGTTTATGAACAAACGACCCAACACCCGTGCGTTTTATTCT
GTCTTTTTATTGCCGTATAGCGCGGGTTCCTTCCGGTATTGTCTCCTTCCGTGTTTCAGTT
AGCCTCCCCCATCTCCCTATTCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTGGGGCGTCGGTTTCCA
CTATCGGCGAGTACTTCTACACAGCCATCGGTCCAGACGCCCGCGCTTCTGCGGGCGATT
TGTGTACGCCCGACAGTCCCGGCTCCGGATCGGACGATTGCGTCGCATCGACCCTGCGC
CCAAGCTGCATCATCGAAATTGCCGTCAACCAAGCTCTGATAGAGTTGGTCAAGACCAATG
CGGAGCATATACGCCCGGAGCCGCGCGATCCTGCAAGCTCCGGATGCCTCCGCTCGAA
GTAGCGCGTCTGCTGCTCCATACAAGCCAACACGGCCTCCAGAAGAAGATGTTGGCGAC
CTCGTATTGGGAATCCCGAACATCGCCTCGCTCCAGTCAATGACCGCTGTTATGCGGCC
ATTGTCCGTGAGGACATTGTTGGAGCCGAAATCCGCGTGCACGAGGTGCCGGAATTGCGG
GCAGTCTCGGCCCAAAGCATCAGCTCATCGAGAGCTGCGCGACGGACGCACTGACGG
TGTCGTCCATCACAGTTTGCCAGTGATACACATGGGGATCAGCAATCGCGCATATGAAATC
ACGCCATGTAGTGATTGACCGATTCTTGCGGTCCGAATGGGCCGAACCCGCTCGTCTG
GCTAAGATCGGCCGAGCGATCGCATCCATGGCCTCCGCGACCGGTGCGAGAACAGCGG
GCAGTTTCGGTTTCAGGCAGGTCTTGCAACGTGACACCCTGTGCACGGCGGGAGATGCAAT
AGGTCAGGCTCTCGCTGAATCCCAATGTCAAGCACTTCCGGAATCGGGAGCGCGGCCG
ATGCAAAGTGCCGATAAACATAACGATCTTTGTAGAAACCATCGGCGCAGCTATTTACCCG
CAGGACATATCCACGCCCTCCTACATCGAAGCTGAAAGCACGAGATTCTTCGCCCTCCGA
GAGCTGCATCAGGTCGGAGACGCTGTGCAACTTTTCGATCAGAACTTCTCGACAGACGT
CGCGGTGAGTTCAGGCTTTTTCATATCTATTGCCCCGGATCTGCGGCACGCTGTTGACG
CTGTTAAGCGGGTCGCTGCAGGGTCGCTCGGTGTTGAGGCCACACGCGTCACCTTAATA
TGCGAAGTGACCTGGGACCGCGCCGCCCGACTGCATCTGCGTGTTGCAATTGCGCAAT
GACAAGACGCTGGGCGGGTTTGTGTATCATAGAACTAAAGACATGCAATATATTTCTT
CCGGGGACACCGCCAGCAAACGCGAGCAACGGGCCACGGGGATGAAGCAGGGCATGGC
GGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGCTGGCGTTCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCC

CCATTATGATTCTTCTCGCTTCCGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATGCTGT
CCAGGCAGGTAGATGACGACCATCAGGGACAGCTTCAAGGATCGCTCGCGGCTCTTACCA
GCCTAACTTCGATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGATTTATGCCGCCTCGGCGAGCA
CATGGAACGGGTTGGCATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGT
TGGCTCGCGGTGCATGGAGCCGGGCCACCTCGACCTGAATGGAAGCCGGCGGCACCTCG
CTAACGGATTCACTACTCCAAGAATTGGAGCCAATCAATTCTTGGGAGAACTGTGAATGC
GCAAACCAACCCCTTGGCAGAACATATCCATCGCGTCCGCCATCTCCAGCAGCCGCACGCG
GCGCAGCAAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTC
CGCCCCCTGACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACA
GGACTATAAAGATACCAAGGCGTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCG
ACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCCCTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCT
CATAGCTCACGCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGT
GTGCACGAACCCCCGTTACGCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAG
TCCAACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTAC
ACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGAAAAAGAG
TTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTTTTTTGTTTGCAA
GCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTCTACGGGG
TCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA
GGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATG
AGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTG
TCTATTTCTGTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAG
GGCTTACCATCTGGCCCCAGTGCTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCA
GATTTATCAGCAATAAACCAGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACT
TTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAG
TTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTGCAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTT
TGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATG
TTGTGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCCG
CAGTGTTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTTCTACTGTGATGCCATCCGTA
AGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGTGTATGCGGC
GACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAACACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTT
TAAAAGTGCTCATCATTGAAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACTCTCAAGGATCTTACCGCT
GTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACTGATCTTCAGCATCTTTTACTT
TCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAATGCCGCAAAAAGGGAATAA
GGGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTCTTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATC
AGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACATATTTGAATGTATTTAGAAAAATAACAAATAGGG
GTTCCGCGCACATTTCCCCGAAAAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACATTATTATCATGA
CATTAACCTATAAAAAATAGGCGTATCAGAGGCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCATGTTG

ACAGCTTATCTCTAGCAGATCCGGAATTCCTCCCAATTTAAATGAGGACCTAACCTGT
 GGAAATCTACTGATGTGGGAGGCTGTAAGTACAAACAGAGGTTATTGGAATACTAGCA
 TGCTTAACCTTCATGCAGGGTCACAAAAAGTGCATGACGATGGTGGAGGAAAACCTATTC
 AGGCAGTAATTTCACTTCTTTGCTGTTGGTGGAGACCCCTGGAAATGCAGGGAGTGCTA
 ATGAATTACAGGACAAAGTACCCAGATGGTACTATAACCCCTAAAAACCAACAGCCAGT
 CCCAGGTAATGAATACTGACCATAAGGCCTATTTGGACAAAAACAATGCTTATCCAGTTGA
 GTGCTGGGTTCTGATCCTAGTAGAAATGAAAATACTAGGTATTTGGGACTTTCACAGGA
 GGGGAAATGTTCCCCAGTACTTCATGTGACCAACACAGCTACCACAGTGTTGCTAGATG
 AACAGGGTGTGGGGCCTCTTTGTAAGCTGATAGCCTGTATGTTTCAGCTGCTGATATTTG
 TGGCCTGTTTACTAACAGCTCTGGAACACAACAGTGGAGAGGCCTTGCAAGATATTTAAG
 ATCCGCCTGAGAAAAAGATCTGTAAAGAATCCTTACCTAATTTCTTTTGTCTAAGTGACCT
 TATAAACAGGAGAACCCAGAGAGTGGATGGGCAGCCTATGTATGGTATGGAATCCCAGGT
 AGAAGAGGTTAGGGTGTGTTGATGGCACAGAAAGACTTCCAGGGGACCCAGATATGATAAG
 ATATATTGACAAACAGGGACAATTGCAAAACAAAATGCTTTAAACAGGTGCTTTTATTGTAC
 ATATACATTTAATAAATGCTGCTTTTGTATAAGCCACTTTTAAGCTTGTTATTTGGGGGT
 GGTGTTTTAGGCCTTTTAAACACTGAAAGCCTTTACACAAATGCAACTCTTGACTATGGGG
 GTCTGACCTTTGGGAATGTTGAGCAGGGGCTGAAGTATCTGAGACTTGGGAAGAGCATTG
 TGATTGGGATTCAGTGCTTGATCCATGTCCAGAGTCTTCAGTTTCTGAATCCTCTTCTCTTG
 TAATATCAAGAATACATTTCCCATGCATATATTATTTTCATCCTTGAAAAAGTATACATACT
 TATCTCAGAAATCCAGCCTTTCTTCCATTCAACAATTCTAGAAGTAAACTGGGGTAGATG
 CTATTACAGAGGTAGAATGCTTCCTAAACCCAGAAATGGGGGATCTGC

SEQ ID NO:56 – полипептидная последовательность CDR2 гуманизированной тяжелой
 цепи 3A4 .

DINPYNGDTNYNQKFKG

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, способные специфически связываться с ассоциированным с почками антигеном 1 (КАAG1), имеющие варибельный участок тяжелой цепи, который содержит определяющие комплементарности участки (CDR), где CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6 или в SEQ ID NO: 56, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и варибельный участок легкой цепи, который содержит CDR, где CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10.

2. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок легкой цепи по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 4.

3. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи по меньшей мере на 90% идентичен SEQ ID NO: 2.

4. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок легкой цепи идентичен SEQ ID NO: 4.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи идентичен SEQ ID NO: 2.

6. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 32.

7. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36 или SEQ ID NO: 37.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 33 или в SEQ ID NO: 34.

9. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40 или SEQ ID NO: 41.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 41, и варибельный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 33.

11. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 38, и варибельный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 33.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где варибельный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 41, и варибельный участок легкой цепи является та-

ким, как изложенный в SEQ ID NO: 34.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 39, и переменный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 33.

14. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 40, и переменный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 33.

15. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 38, и переменный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 34.

16. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 39, и переменный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 34.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 40, и переменный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 34.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где переменный участок тяжелой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 2, и переменный участок легкой цепи является таким, как изложенный в SEQ ID NO: 4.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 49, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 43.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 46, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 43.

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 47, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 43.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 48, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 43.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 49, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 44.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 46, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 44.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 47, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 44.

26. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 48, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 44.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где тяжелая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 45, и легкая цепь является такой же, как изложенная в SEQ ID NO: 42.

28. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-27, где антитело является моноклональным антителом, химерным антителом, гибридным антителом, гуманизированным антителом.

29. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело является антителом человека.

30. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит человеческие каркасные участки и, необязательно, одну или несколько обратных мутаций в переменной области легкой цепи и/или переменной области тяжелой цепи, где одна или несколько обратных мутаций находятся в каркасном участке и соответствуют аминокислотам каркаса, обнаруженным в аминокислотной последовательности переменной области тяжелой цепи, указанной в SEQ ID NO: 2, и/или в аминокислотной последовательности переменной области легкой цепи, указанной в SEQ ID NO: 4 исходного мышиного антитела.

31. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.30, где обратные мутации в переменной области тяжелой цепи включают Ile в положении 2 и Lys в положении 73 и где указанное положение соответствует нумерации по Kabat.

32. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.31, включающие дополнительные обратные мутации в переменной области тяжелой цепи, где указанные дополнительные обратные мутации включают Ile в положении 48, Ala в положении 67, Leu в положении 69 и Val в положении 71 и где указанное положение соответствует нумерации по Kabat.

33. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.32, включающие дополнительные обратные мутации в переменной области тяжелой цепи, где указанные дополнительные обратные мутации содержат Lys в положении 38 и Lys в положении 66 и где указанное положение соответствует нумерации по Kabat.

34. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.30, где обратные мутации в переменной области легкой цепи содержат Val в положении 2 и Lys в положении 45 и где указанное положение соот-

ветствует нумерации по Kabat.

35. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.31, где обратные мутации в вариабельной области легкой цепи содержат Val в положении 2 и Lys в положении 45 и где указанное положение соответствует нумерации по Kabat.

36. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.32, где обратные мутации в вариабельной области легкой цепи включают Val в положении 2 и Lys в положении 45 и где указанное положение соответствует нумерации по Kabat.

37. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.33, где обратные мутации в вариабельной области легкой цепи включают Val в положении 2 и/или Lys в положении 45 и где указанное положение соответствует нумерации по Kabat.

38. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.30-37, где антителом или его антигенсвязывающим фрагментом является гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

39. Конъюгат для нацеливания на опухолевые клетки, экспрессирующие ассоциированный с почками антиген 1 (KAAG1), содержащий:

а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит определяющие комплементарность участки (CDR), где CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6 или в SEQ ID NO: 56, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR, где CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

б) терапевтический фрагмент, подходящий для лечения рака, такой как цитотоксическое средство, противораковое средство или химиотерапевтическое средство.

40. Конъюгат по п.39, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются такими же, как изложено в любом из пп.2-38.

41. Конъюгат по п.39 или 40, где цитотоксическое средство содержит ауристатин.

42. Конъюгат по п.41, где ауристатин содержит монометилауристатин Е или монометилауристатин F.

43. Конъюгат для обнаружения опухолевых клеток, экспрессирующих ассоциированный с почками антиген 1 (KAAG1), содержащий:

а) антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющий вариабельный участок тяжелой цепи, который содержит определяющие комплементарность участки (CDR), где CDRH1 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 5, CDRH2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 6 или в SEQ ID NO: 56, и CDRH3 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 7, и вариабельный участок легкой цепи, который содержит CDR, где CDRL1 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 8, CDRL2 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 9, и CDRL3 имеет аминокислотную последовательность, изложенную в SEQ ID NO: 10; и

б) выявляемую метку, такую как флуоресцентная метка, радиоактивная метка, активная метка для ядерного магнитного резонанса, люминесцентная метка, хемилюминесцентная метка, хромофорная метка, ферментная метка, квантовые точки и/или наночастица.

44. Конъюгат по п.43, в котором антитело или его антигенсвязывающий фрагмент являются такими же, как изложено в любом из пп.2-38.

45. Нуклеиновая кислота, кодирующая вариабельный участок легкой цепи и вариабельный участок тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38.

46. Набор нуклеиновых кислот для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38, содержащий первую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область легкой цепи, и вторую нуклеиновую кислоту, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи указанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

47. Вектор экспрессии, который содержит нуклеиновую кислоту по п.45.

48. Набор векторов экспрессии, включающий набор нуклеиновых кислот по п.46.

49. Выделенная клетка для экспрессии антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38, содержащая нуклеиновую кислоту по п.45, набор нуклеиновых кислот по п.46, вектор по п.47 или набор векторов по п.48.

50. Фармацевтическая композиция для лечения рака, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-38 или конъюгат по любому из пп.39-42 и фармацевтически приемлемый носитель.

51. Композиция для обнаружения раковых клеток, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-38 или конъюгат по любому из пп.43, 44 и фармацевтически приемлемый разбавитель, консервант, растворитель, эмульгатор или вспомогательное средство.

52. Способ лечения рака, содержащего клетки, экспрессирующие KAAG1 или вариант KAAG1, об-

ладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29, при этом способ включает введение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38 или конъюгата по любому из пп.39-42 нуждающемуся в этом субъекту.

53. Способ выявления опухоли, содержащей клетки, экспрессирующие КАAG1 или вариант КАAG1, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29, при этом способ включает введение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38 или конъюгата по любому из пп.43-44 нуждающемуся в этом субъекту и выявление клеток опухоли, связывающихся с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

54. Способ по п.52 или 53, отличающийся тем, что нуждающийся субъект выбран из субъекта, имеющего карциному яичников или у которого подозревают наличие карциномы яичников, субъекта, имеющего рак кожи или у которого подозревают наличие рака кожи, субъекта, имеющего рак почек или у которого подозревают наличие рака почек, субъекта, имеющего колоректальный рак или у которого подозревают наличие колоректального рака, субъекта, имеющего саркому или у которого подозревают наличие саркомы, субъекта, имеющего лейкоз или у которого подозревают наличие лейкоза, субъекта, имеющего рак головного мозга или у которого подозревают наличие рака головного мозга, субъекта, имеющего рак щитовидной железы или у которого подозревают наличие рака щитовидной железы, субъекта, имеющего рак молочной железы или у которого подозревают наличие рака молочной железы, субъекта, имеющего рак простаты или у которого подозревают наличие рака простаты, субъекта, имеющего рак пищевода или у которого подозревают наличие рака пищевода, субъекта, имеющего рак мочевого пузыря или у которого подозревают наличие рака мочевого пузыря, субъекта, имеющего рак легких или у которого подозревают наличие рака легких, и субъекта, имеющего рак головы и шеи или у которого подозревают наличие рака головы и шеи.

55. Способ выявления КАAG1 или варианта КАAG1, обладающего по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29, при этом способ включает приведение в контакт клетки, экспрессирующей КАAG1 или вариант КАAG1, или образца, подозреваемого в содержании КАAG1 или варианта КАAG1, с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-38 или конъюгата по любому из пп.43, 44 и выявление антитела или антигенсвязывающего фрагмента помощью второго антитела или выявляемой метки, присоединенной к нему.

56. Набор для лечения рака, содержащий контейнеры, включающие антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-38 или конъюгат по любому из пп.39-42.

57. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38 для производства лекарственного препарата для лечения рака с клетками, экспрессирующими КАAG1 или вариант КАAG1.

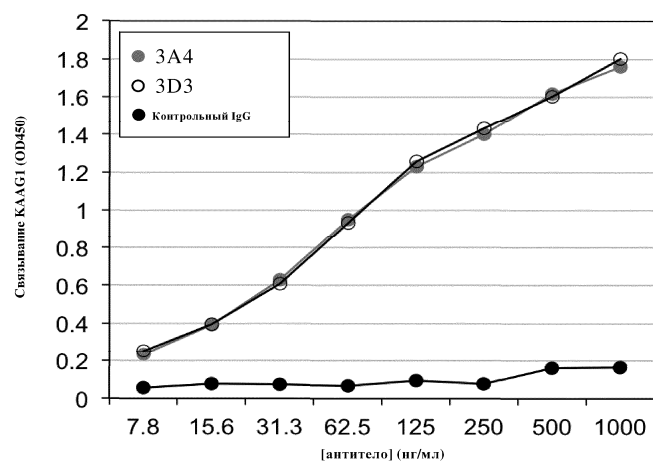
58. Применение конъюгата по любому из пп.39-42 для производства лекарственного препарата для лечения рака с клетками, экспрессирующими КАAG1 или вариант КАAG1.

59. Применение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38 для диагностики рака с клетками, экспрессирующими КАAG1 или вариант КАAG1, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29, или для выявления клеток, экспрессирующих КАAG1 или вариант КАAG1, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29.

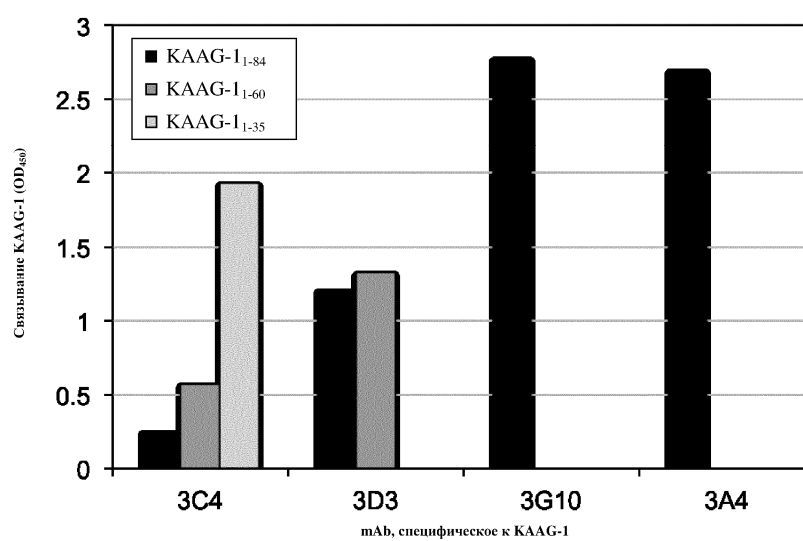
60. Применение конъюгата по любому из пп.43, 44 для диагностики рака с клетками, экспрессирующими КАAG1 или вариант КАAG1, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29, или для выявления клеток, экспрессирующих КАAG1 или вариант КАAG1, обладающий по меньшей мере 80% идентичностью с SEQ ID NO: 29.

61. Применение по любому из пп.57-60, отличающееся тем, что рак выбран из группы, состоящей из карциномы яичников, рака кожи, рака почек, колоректального рака, саркомы, лейкоза, рака головного мозга, рака щитовидной железы, рака молочной железы, рака простаты, рака пищевода, рака мочевого пузыря, рака легких и рака головы и шеи.

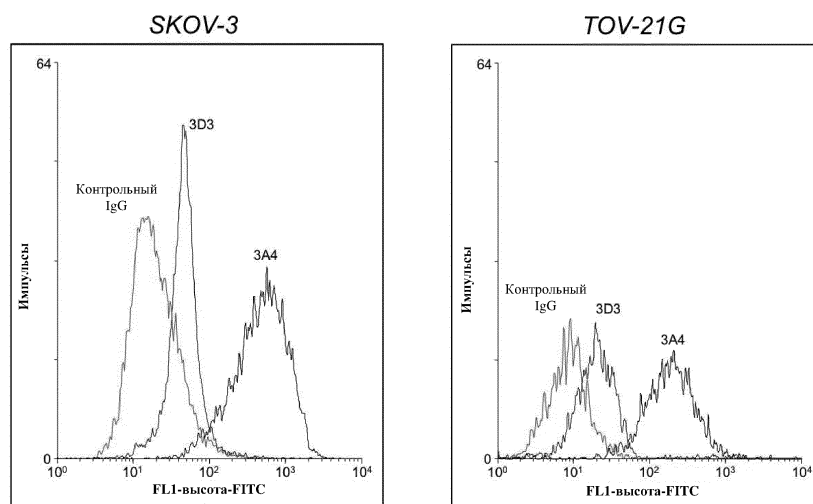
62. Набор для получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, способных специфически связываться с КАAG1, содержащий первый контейнер, включающий нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии, кодирующий вариабельный участок легкой цепи, и второй контейнер, включающий нуклеиновую кислоту или вектор экспрессии, кодирующий вариабельный участок тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-38.



Фиг. 1

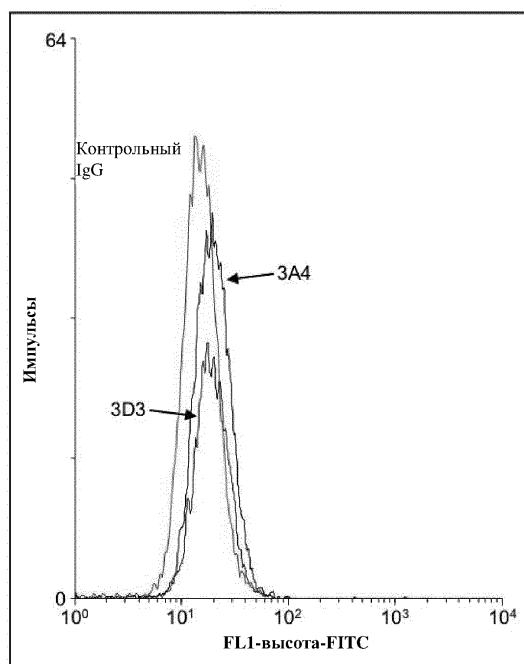


Фиг. 2

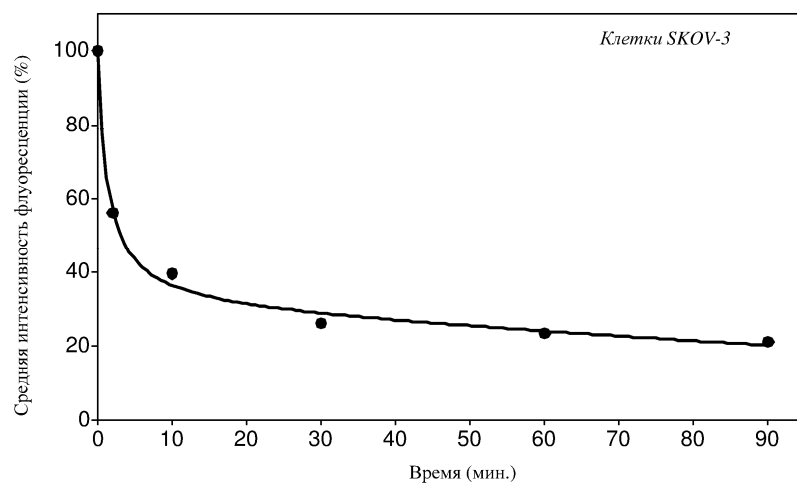


Фиг. 3А

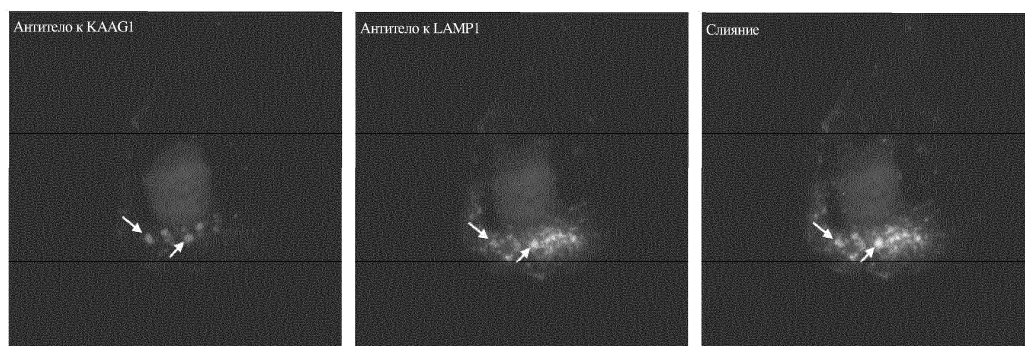
293E



Фиг. 3В

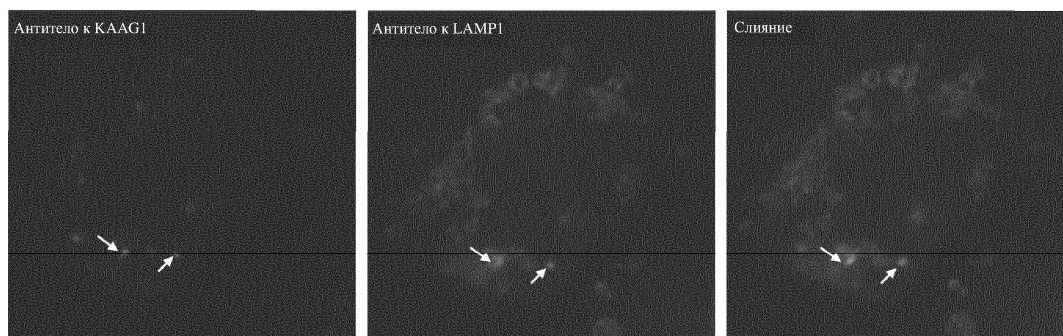


Фиг. 4



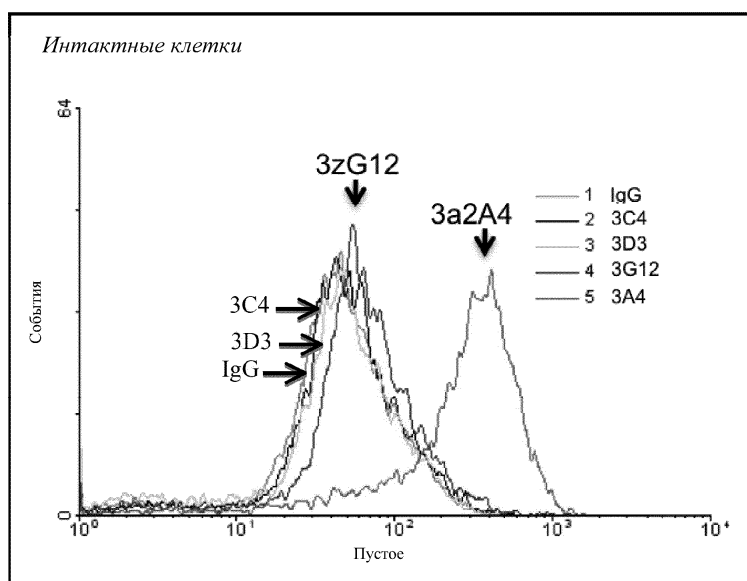
Клетки SKOV-3

Фиг. 5А

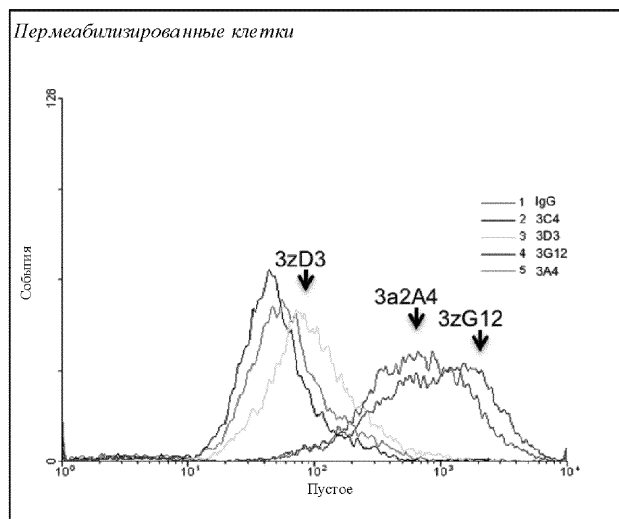


Клетки TOV-21G

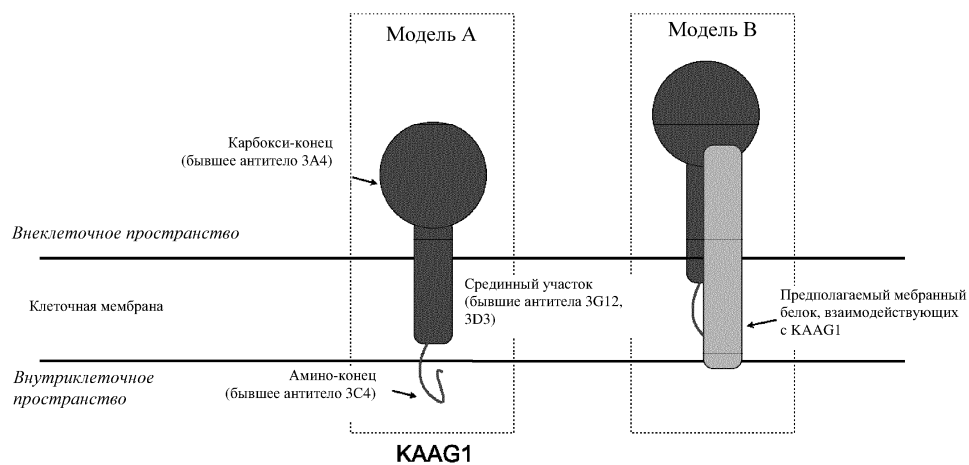
Фиг. 5B



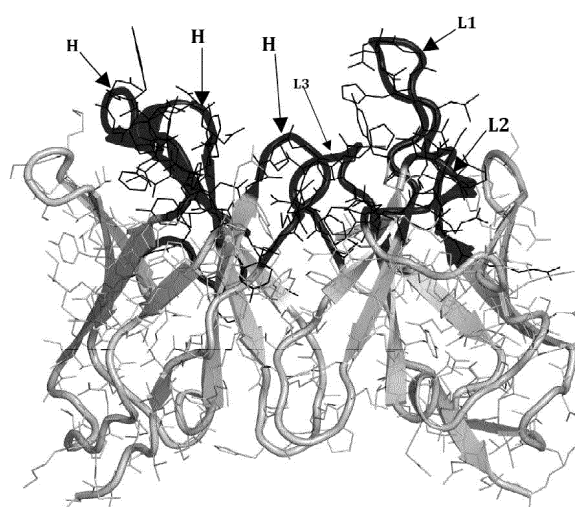
Фиг. 6А



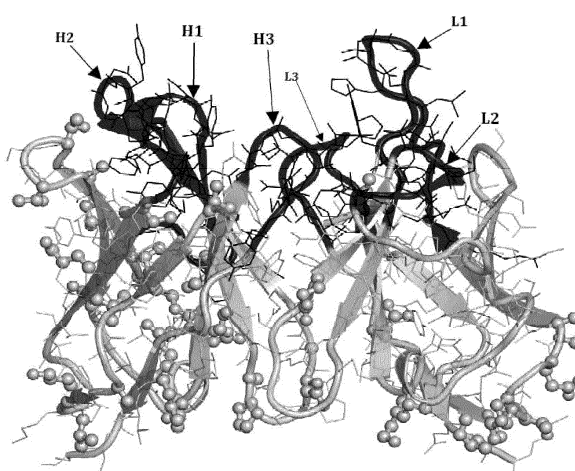
Фиг. 6B



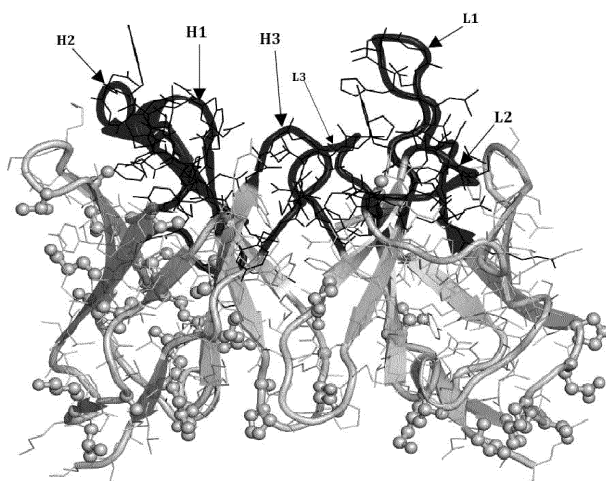
Фиг. 7



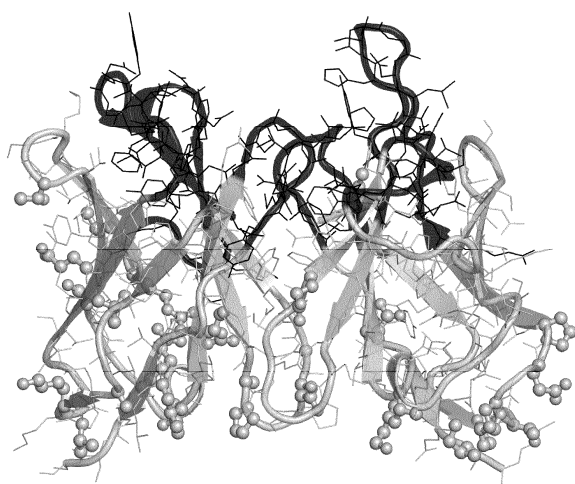
Фиг. 8



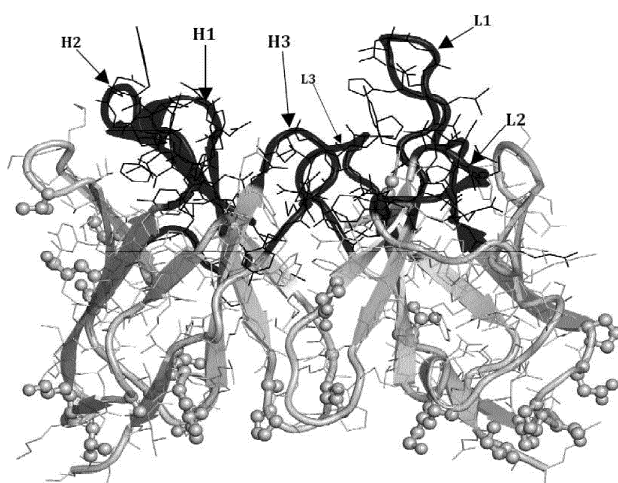
Фиг. 9А



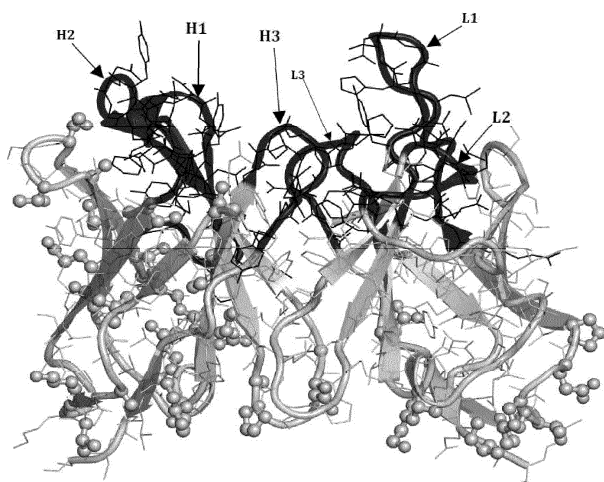
Фиг. 9В



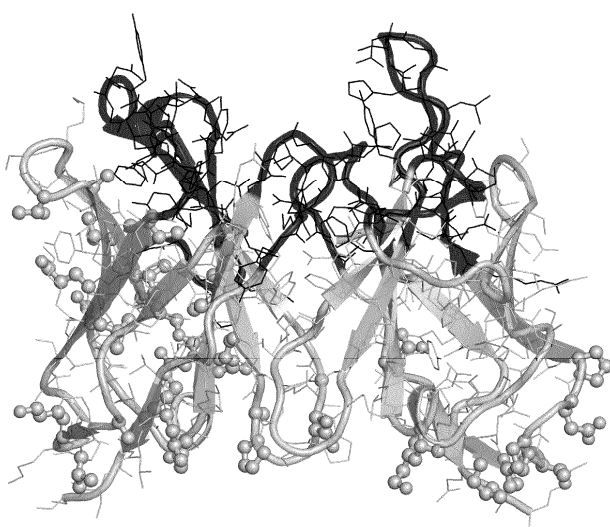
Фиг. 9С



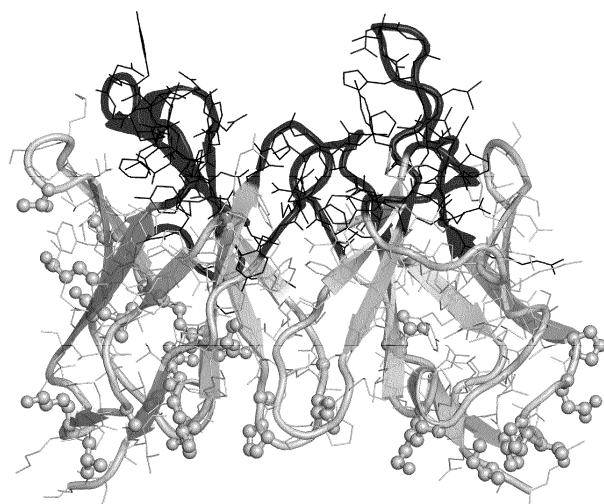
Фиг. 9D



Фиг. 9Е



Фиг. 9F



Фиг. 9G

[illegible][illegible]

Выравнивание переменных участков легкой цепи

```

VL мыши                               DVVMTQTPLSLAVSLGDAQASISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIHTVSNRF 60
SEQ ID NO.33                          DIVMTQTPLSLPVTPEGPASISCRSSQSLHNSGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYTVSNRF 60
                                     *:*****.*: *: *****:***:*****
VL мыши                               SGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPLTFGAGTRLELK 112
SEQ ID NO.33                          SGVPRDRFSGSGSGTDFTLKISRVEADGVYYCFQGSHVPLTFGGQTKLEIK 112
                                     *****:*****:*****

```

Выравнивание переменных участков тяжелой цепи

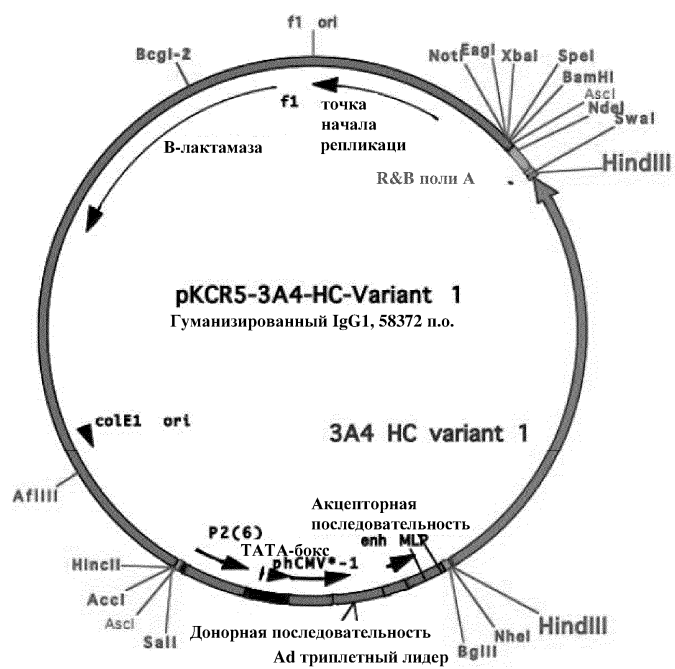
VH мыши
SEQ ID NO.38

QIQLVQSGPEMVKPGASVKMSCKASGYTFTDDYMSVWKQSHGKSLIEWIGDINPYNGDTNY 60
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTDDYMSVVRQAPGQGLEWMGDINPYNGDTNY 60
*:*****.*:*****:*****:*****:*. *:.*:*****:*****

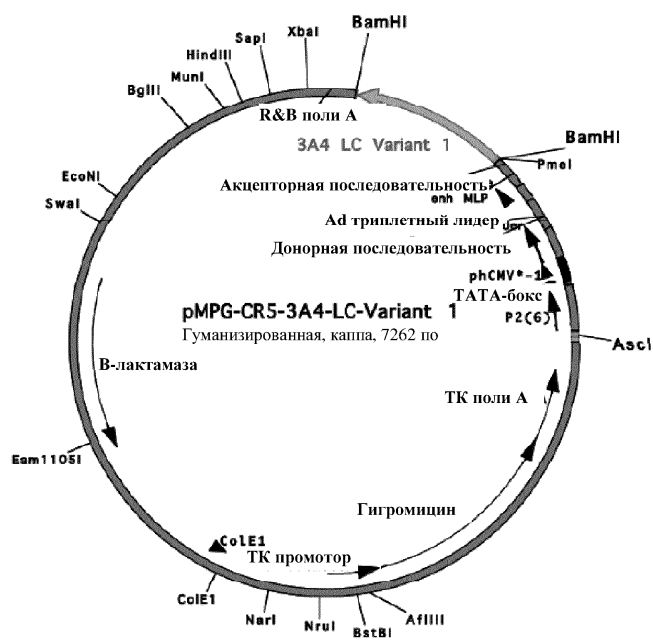
VH мыши
SEQ ID NO.38

NQKFKGKAILTVDKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS 116
NQKFKGRVTTADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARDPGAMDYWGQGTSTVTVSS 116
*:*****.*:*****:*****:*****:*. *:.*:*****:*****

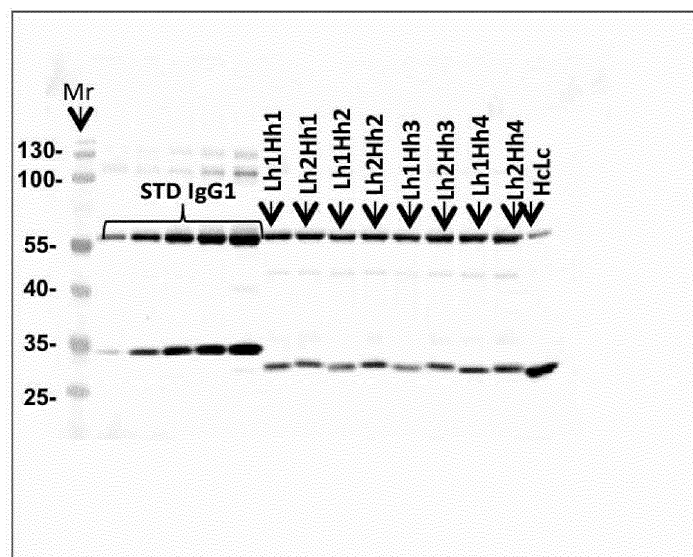
- 62 -



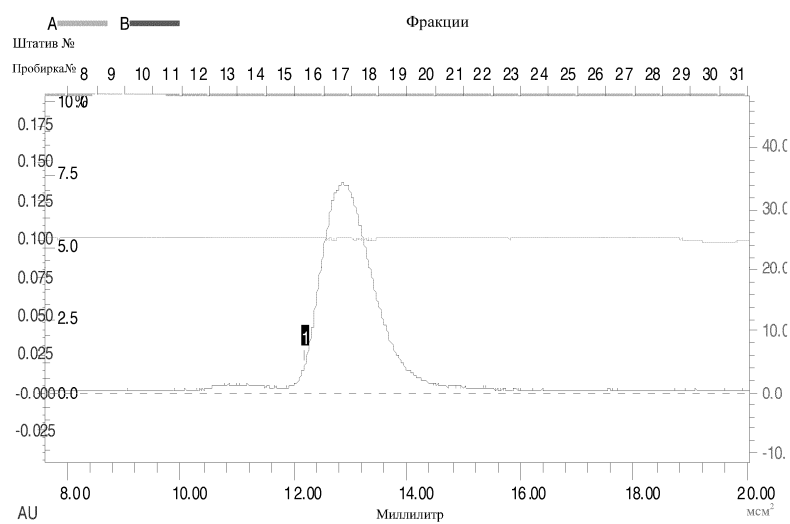
Фиг. 12А



Фиг. 12В



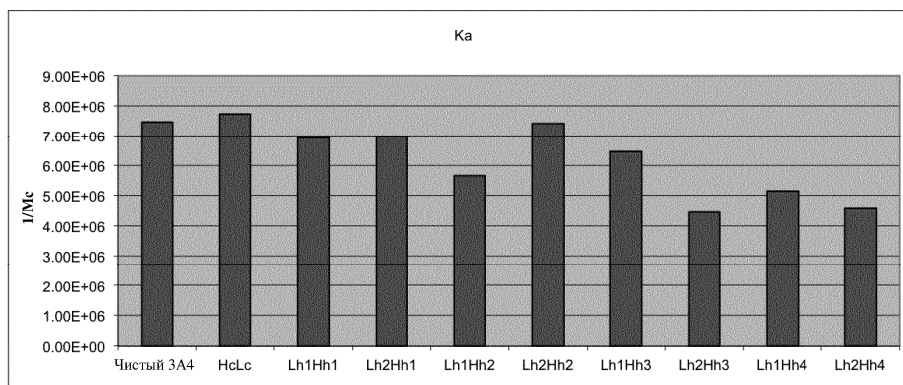
Фиг. 13



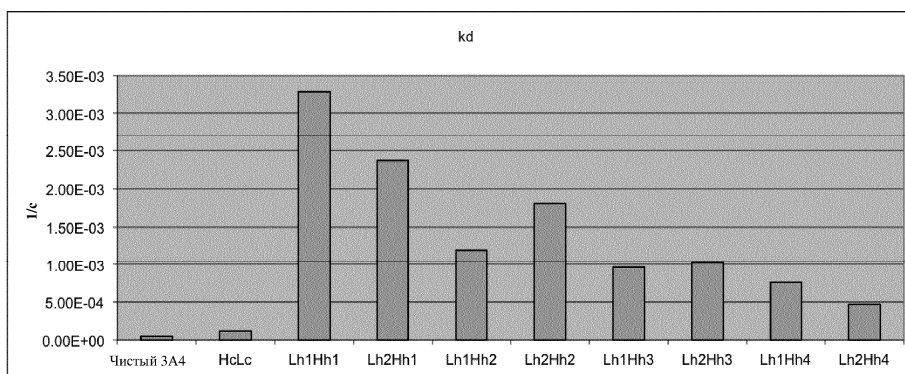
Фиг. 14

Антитело	k_a (1/Мс)	k_d (1/с)	K_d (нМ)	Различие, раз
LcHc	7.72×10^5	1.21×10^{-4}	0.016	-
Lh1Hh1	6.93×10^5	3.28×10^{-3}	0.474	29.6
Lh2Hh1	6.97×10^5	2.37×10^{-3}	0.341	21.3
Lh1Hh2	5.65×10^5	1.19×10^{-3}	0.211	13.2
Lh2Hh2	7.40×10^5	1.81×10^{-3}	0.245	15.3
Lh1Hh3	6.46×10^5	9.60×10^{-4}	0.149	9.3
Lh2Hh3	4.46×10^5	1.02×10^{-3}	0.228	14.3
Lh1Hh4	5.14×10^5	7.64×10^{-4}	0.149	9.3
Lh2Hh4	4.57×10^5	4.70×10^{-4}	0.103	6.4

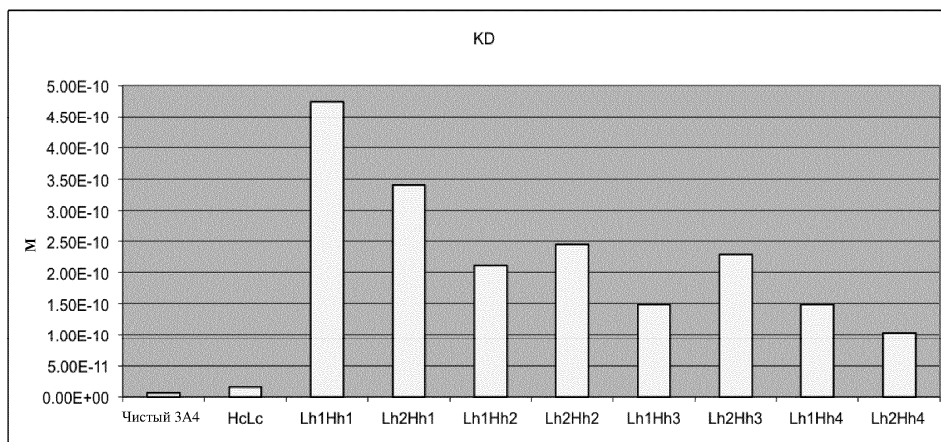
Фиг. 15



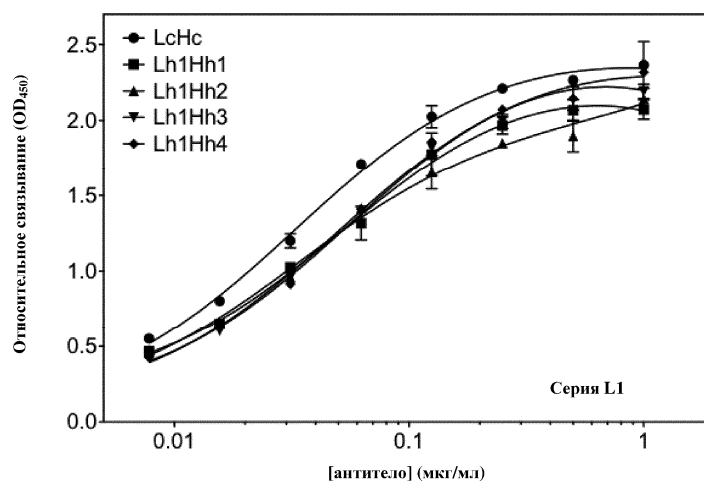
Фиг. 16А



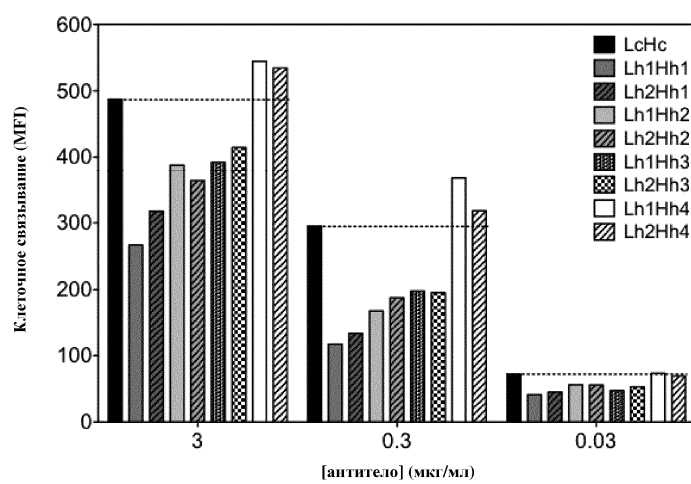
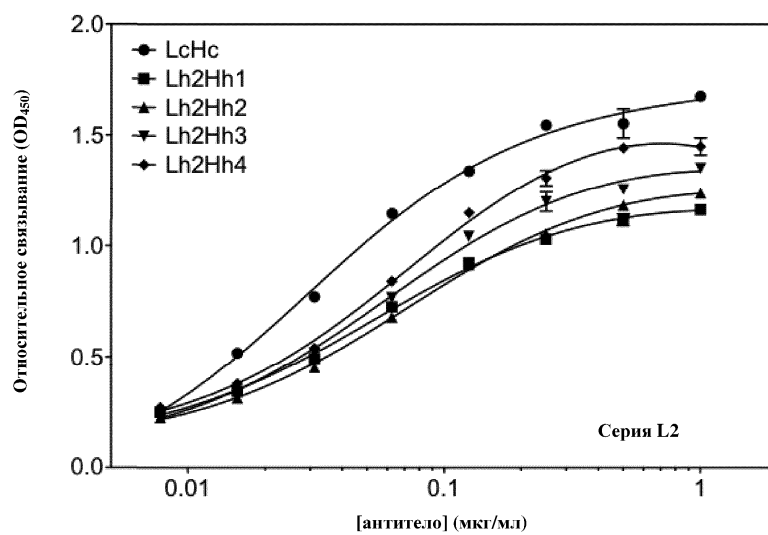
Фиг. 16В



Фиг. 16С



Фиг. 17А



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2