



(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента

2022.04.28

(21) Номер заявки

201792492

(22) Дата подачи заявки

2016.06.24

(51) Int. Cl. **C07K 14/435** (2006.01)

(54) AML-АНТИГЕНЫ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

(31) 15173662.6; 16150621.7

(32) 2015.06.24; 2016.01.08

(33) EP

(43) 2018.07.31

(86) PCT/NL2016/050449

(87) WO 2016/209079 2016.12.29

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:

**КЛИНГ БИОТЕРАПЬЮТИКС Б.В.
(NL)**

(72) Изобретатель:

**Спитс Херген, Гиллиссен Марейн
Алетта, Кедде Мартейн, Хазенберг
Метте Дебора, Ван Хелден Паула
Мария Вильгельмина, Пос Ваутер
(NL)**

(74) Представитель:

Нилова М.И. (RU)

(56) US-B1-7399847

WO-A2-2015093949

GILLISSEN MARIJN A. ET AL.: "Unique and Potent Tumor Specific Antibodies in Graft Versus Leukemia Responses", BLOOD, vol. 124, no. 21, December 2014 (2014-12), XP002755806, & 56TH ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; SAN FRANCISCO, CA, USA; DECEMBER 06-09, 2014 abstract

GILLISSEN M. ET AL.: "B LYMPHOCYTES ARE IMPORTANT EFFECTOR CELLS IN ANTI-AML RESPONSES AFTER ALLOGENEIC HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION", HAEMATOLOGICA, vol. 100, no. Suppl. 1, June 2015 (2015-06), page 277, XP009189239, & 20TH CONGRESS OF THE EUROPEAN-HEMATOLOGY-ASSOCIATION; VIENNA, AUSTRIA; JUNE 11-14, 2015 ISSN: 0390-6078 abstract

KWAKKENBOS MARK J. ET AL.: "Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-

positive human memory B cells by genetic programming", NATURE MEDICINE, vol. 16, no. 1, 1 January 2010 (2010-01-01), pages 123-128, XP055019451, ISSN: 1078-8956, DOI: 10.1038/nm.2071 abstract; figure 2

TUCCILLO FRANCA MARIA ET AL.: "Aberrant Glycosylation as Biomarker for Cancer: Focus on CD43", BIOMED RESEARCH INTERNATIONAL, 2014, XP002755807, abstract; figures 1, 2 page 6, left-hand column, paragraph 3 - page 7, right-hand column, paragraph 2

BUCKLEY SARAH A. ET AL.: "Update on antigen-specific immunotherapy of acute myeloid leukemia", CURRENT HEMATOLOGIC MALIGNANCY REPORTS JUN 2015, vol. 10, no. 2, June 2015 (2015-06), pages 65-75, XP002755808, ISSN: 1558-822X abstract; table 1

SOSEUL KIM ET AL.: "Characterization of Two Novel mAbs Recognizing Different Epitopes on CD43", IMMUNE NETWORK, vol. 14, no. 3, 1 January 2014 (2014-01-01), page 164, XP055260711, ISSN: 1598-2629, DOI: 10.4110/in.2014.14.3.164 abstract page 167, left-hand column, paragraph 3 - page 168, left-hand column; table 1

KWAKKENBOS MARK J. ET AL.: "Stable long-term cultures of self-renewing B cells and their applications", IMMUNOLOGICAL REVIEWS MAR 2016, vol. 270, no. 1, March 2016 (2016-03), pages 65-77, XP002755809, ISSN: 1600-065X abstract; figures 1, 2 page 75, left-hand column, paragraph 2 - right-hand column, paragraph 3

KANA HASEGAWA ET AL.: "Glycosylation Status of CD43 Protein Is Associated with Resistance of Leukemia Cells to CTL-Mediated Cytotoxicity", PLOS ONE, vol. 11, no. 3, 24 March 2016 (2016-03-24), page e0152326, XP055312676, DOI: 10.1371/journal.pone.0152326 the whole document

HAZENBERG M. ET AL.: "TUMOR-SPECIFIC GLYCOSYLATED CD43 IS A NOVEL AND HIGHLY SPECIFIC TARGET FOR ACUTE MYELOID LEUKEMIA AND MYELODYSPLASTIC SYNDROME", HAEMATOLOGICA, vol. 101, no. Suppl. 1, June 2016 (2016-06), page 191, XP009192174, & 21ST CONGRESS OF THE EUROPEAN-HEMATOLOGY-ASSOCIATION; COPENHAGEN, DENMARK; JUNE 09-12, 2016 ISSN: 0390-6078 abstract

(57) В изобретении предложены новые соединения, содержащие антиген AML-клеток, и их применения.

Настоящее изобретение относится к области биологии, иммунологии и медицины.

Острый миелоидный лейкоз (AML) - это онкологическое заболевание высокого риска с коэффициентом пятилетней выживаемости 40-50% у пациентов моложе 60 лет. Для пациентов старше 65 лет показатели выживаемости еще меньше, только у менее чем 20% пациентов наблюдаются устойчивые ремиссии. При лечении острого лейкоза часто применяют аллогенную трансплантацию стволовых клеток. Первоначально этот способ был разработан для того, чтобы не подвергать пациентов воздействию миелоаблативной химиотерапии, которая иначе может быть летальной, но впоследствии было обнаружено, что указанный способ вызывает осложнения, связанные с аллореактивным иммунным ответом (реакция "трансплантат против хозяина", РТПХ). Снижение числа (деплеция) Т-клеток в трансплантатах перед реинфузией предотвращало РТПХ, однако у реципиентов трансплантатов с деплецией Т-клеток, также как и у реципиентов трансплантата, полученного от своего однояйцевого близнеца в качестве донора, наблюдали гораздо более высокую частоту рецидива, что очевидно свидетельствует о том, что успех аллогенной трансплантации стволовых клеток (ТСК) зависит от индукции иммунного ответа против лейкоза (реакция "трансплантат против лейкоза" (РТПЛ)). Это привело к разработке стратегий для применения аллогенной трансплантации стволовых клеток, при которой не применяются миелоаблативные условия (трансплантация стволовых клеток с уменьшенной интенсивностью, RIST), для снижения цитотоксичности и проведения аллогенной ТСК у большей группы пациентов, включая пожилых пациентов и пациентов, ранее получавших интенсивное лечение. Подготовительные схемы лечения при RIST направлены на подавление приобретенной иммунной системы реципиентов для предотвращения отторжения трансплантата без полного удаления у реципиентов костного мозга, что тем самым снижает раннюю токсичность ТСК. После трансплантации стволовые клетки реципиента постепенно замещаются стволовыми клетками донора, а полный донорский химеризм обычно достигается в течение трех месяцев после ТСК. Хотя аллогенная ТСК приводит к выздоровлению значительного числа пациентов, и при этом был достигнут большой прогресс в поддерживающей терапии ТСК-реципиентов, до сих пор от 15 до 30% пациентов умирают в результате осложнений, связанных с трансплантацией, как, например, РТПХ, и инфекционных осложнений (возникающих как результат медленного восстановления иммунитета после ТСК или как осложнение в результате иммуносупрессивной терапии РТПХ). Следовательно, хотя ТСК и приводит к эффективному выздоровлению в случае, когда индуцируются сильные реакции типа "трансплантат против лейкоза" (РТПЛ), ее терапевтический успех ограничен иммунными ответами против хозяина, приводящими к РТПХ, что вызывает высокую заболеваемость и смертность. Ввиду высокой частоты случаев РТПХ после аллогенной трансплантации стволовых клеток, приводящей к летальному исходу у 15-30% пациентов, а также того факта, что подходящий донор не всегда доступен для данного пациента, альтернативные способы лечения были бы предпочтительными. В международной патентной заявке РСТ/NL 2014/050873 предложены получаемые от пациента AML-специфичные антитела человека, которые способны связывать интактные AML-клетки. Важно отметить, что антитела получают от пациентов с AML, представляющих собой людей, которые перенесли аллогенную ТСК и у которых наблюдается полная ремиссия, что свидетельствует о том, что указанные антитела эффективны против AML-клеток. Следовательно, применение антител, описанных в публикации РСТ/NL 2014/050873, при терапии AML является предпочтительным.

Также вместо пассивной иммунизации антителами предпочтительным может быть применение иммунотерапии. При иммунотерапии страдающего от заболевания пациента обеспечивают специфичным для заболевания антигеном, который индуцирует и/или усиливает иммунный ответ у указанного пациента против данного заболевания. Также предпочтительными могут быть профилактические или полупрофилактические варианты применений, при которых индивидуума обеспечивают специфичным для заболевания антигеном, чтобы вызвать иммунный ответ до начала развития или до(после) прогрессирования заболевания. Например, иммунизация с применением AML-специфичной молекулы-мишени для того, чтобы вызвать иммунный ответ против AML, была бы особенно предпочтительна для пациентов, перенесших аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток. Другая группа пациентов, для которой была бы предпочтительна иммунизация с применением такой мишени, - это пациенты, страдающие от миелодиспластического синдрома среднего и высокого риска (MDS). Такие пациенты имеют риск развития AML от среднего до высокого, поэтому желательно заранее вызывать иммунный ответ против AML. Риск того, что у пациента MDS перейдет в AML обычно устанавливают согласно международной шкале оценки прогноза (IPSS, см., например, Malcovati et al., 2013). Неограничивающими примерами пациентов с MDS среднего и высокого риска являются пациенты с миелодиспластическим синдромом с рефрактерной анемией с избытком бластов типа I и II (MDS-RAEB-1 и MDS-RAEB-2).

Иммунотерапия и вакцинации, которые специфически направлены против AML, в настоящее время недоступны из-за отсутствия подходящих AML-специфичных антигенов.

AML-специфичные антигены также будут особенно подходящими для определения содержания в образце пациента антител и/или иммунных клеток, способных специфически связывать AML-клетки. Такая информация, например, была бы ценной для диагностики AML или для отслеживания результатов терапии AML.

Целью настоящего изобретения является обеспечение новых пептидов и соединений, содержащих

антиген AML-клеток. В предпочтительном варианте предложены пептиды и соединения, которые способны обнаруживать и/или вызывать иммунный ответ, предпочтительно специфический иммунный ответ против миелопролиферативных расстройств, более предпочтительно AML.

В настоящем изобретении предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков, при этом указанный пептид содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 51 аминокислотного остатка, которая идентична последовательности, расположенной между положениями 133 и 184 последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. Указанный пептид в предпочтительном варианте содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 51 аминокислотного остатка, которая идентична последовательности, расположенной между положениями 133 и 183 последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации длина указанной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 15 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 25 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 35 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 40 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 45 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 50 аминокислотных остатков, или 51 аминокислотный остаток.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков, при этом указанный пептид содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 33 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между положениями аминокислот 133 и 165 последовательности CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации длина указанной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 15 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 25 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, или 33 аминокислотных остатка.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков, при этом указанный пептид содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 15 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между положениями 133 и 147 последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации длина указанной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или 15 аминокислотных остатков.

Авторы настоящего изобретения неожиданно обнаружили, что специфический иммунный ответ против AML можно обнаружить и/или вызвать, применяя пептид CD43 согласно настоящему изобретению. Это открытие было неожиданным, поскольку CD43 присутствует на поверхности большинства видов (незлокачественных) лейкоцитов, а также на поверхности многих негемопоэтических клеток опухоли, как, например, клетках рака толстой кишки человека, клетках рака шейки матки человека, клетках рака легкого человека и клетках аденокарциномы молочной железы человека. Принимая во внимание такое широкое распространение пептида CD43, до момента создания настоящего изобретения CD43 не рассматривали в качестве подходящего соединения для обеспечения AML-специфичности. Тем не менее, как показано в примерах, AML-специфичное антитело AT14-013 связывает пептид CD43 согласно настоящему изобретению. Кроме того, антитело AT14-013 связывается со множеством различных CD43⁺ AML-клеток (фиг. 2 и 3), но не связывается с CD43⁺ моноклеарными клетками периферической крови (РВМС), активированными и неактивированными Т-клетками, В-клетками, неактивированными моноцитами, тимоцитами, ALL-клетками, клетками карциномы толстой кишки, незлокачественными клетками толстой кишки, клетками Jurkat, клетками Ramos или нормальными клетками костного мозга (показано на фиг. 5). Следовательно, антитело AT14-013, которое специфически направлено против пептида CD43, как это определено в формуле изобретения, связывает CD43⁺ AML-клетки, при этом оно не связывает различные другие типы CD43⁺ клеток. Интересно отметить, что антитело AT14-013 не связывает различные виды отличных от AML CD43⁺ гемопоэтических стволовых клеток или более зрелые клетки лимфоидных линий дифференцировки. В примерах также показано, что антитело AT14-013 способно связывать гемопоэтические стволовые клетки плода, из чего делается вывод, что эпитоп CD43, который распозна-

ется AT14-013, представляет собой онкофетальный эпитоп. Антитело AT14-013 также может связывать аутологичные лейкозные стволовые клетки. Более того, антитело AT14-013 способно противодействовать росту AML-клеток *in vivo*. Таким образом, в настоящем изобретении также предложен CD43-антиген AML-клеток.

CD43, который также упоминается как лейкозиалин, сиалофорин, галактогликопротеин, сиалогликопротеин лейкоцитов или gp115, представляет собой гликозилированный муциноподобный трансмембранный белок I типа, который присутствует на поверхности большинства гемопоэтических клеток, за исключением эритроцитов. CD43, кодируемый одним экзоном, играет роль в межклеточных взаимодействиях. Он содержит высокогликозилированный внеклеточный участок из 235 аминокислот. Были описаны две гликоформы CD43, при этом одна гликоформа в основном содержит тетрасахариды, а другая гликоформа содержит в основном разветвленные гексахариды. Обе гликоформы могут экспрессироваться на поверхности одной клетки. CD43, например, описан у Shelley et al. (1989) и Schmid et al. (1992). Последовательность CD43 человека, показанная на фиг. 13, представлена в базе данных Genbank CCDS под № CCDS10650.1.

В контексте настоящего описания термин "пептид CD43 согласно настоящему изобретению" относится к цепи аминокислот длиной не более 100 аминокислотных остатков, при этом указанная аминокислотная цепь содержит последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 51 аминокислотного остатка, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 184 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13, или при этом указанная аминокислотная цепь содержит последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 51 аминокислотного остатка, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 183 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13, или при этом указанная аминокислотная цепь содержит последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 33 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 165 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13, или при этом указанная аминокислотная цепь содержит последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 15 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13.

Как подробно объяснено в примерах, настоящее изобретение дает представление о том, что аминокислотная последовательность белка CD43 человека между 133 и 184 положениями содержит AML-эпитоп, с которым специфически связывается антитело AT14-013. Указанный AML-эпитоп содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который присутствует между 133 и 165 положениями последовательности аминокислот, как показано на фиг. 13. Указанный AML-эпитоп, который присутствует на поверхности различных клеточных линий AML и AML-бластов и который отсутствует или не экспонируется на поверхности многих других CD43⁺ клеток, поэтому и является особенно подходящим для того, чтобы вызвать или обнаружить AML-специфический иммунный ответ. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность GTITTNSPETSSRTS. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность GTITTNSPETSSRTSGAPVTTAASSLETSGTSG.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению содержит аминокислотную последовательность GTITTNSPETSSRTSGAPVTTAASSLETSGTSGPPLTMATVSLETSGTSG.

В некоторых вариантах реализации длина пептида CD43 согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере 90 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению имеет длину не более 85 аминокислотных остатков, или не более 75 аминокислотных остатков, или не более 70 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению имеет длину не более 65 аминокислотных остатков, или не более 60 аминокислотных остатков, или не более 55 аминокислотных остатков, или не более 50 аминокислотных остатков, или не более 45 аминокислотных остатков, или не более 40 аминокислотных остатков, или не более 35 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению имеет длину не более 52 аминокислотных остатков, или не более 51 аминокислотного остатка, или не более 33 аминокислотных остатков, или не более 30 аминокислотных остатков, или не более 25 аминокислотных остатков, или не более 20 аминокислотных остатков, или не более 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению имеет длину по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 15 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах реализации длина указанного пептида CD43 согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере 52 аминокислотных остатка или по меньшей мере 51 аминокислот-

ный остаток, при этом указанный пептид содержит аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 184 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации длина указанного пептида CD43 согласно настоящему изобретению составляет по меньшей мере 51 аминокислотный остаток, причем указанные аминокислотные остатки идентичны аминокислотам, расположенным в 133-184 положениях последовательности аминокислот белка CD43 человека от 133 до 183, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению имеет длину по меньшей мере 33 аминокислотных остатка и содержит аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 165 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению имеет длину по меньшей мере 15 аминокислотных остатков и содержит аминокислотную последовательность, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению состоит из последовательности GTITTNSPETSSRTSGAPVTTAASSLETSGPPLTMATVSLETSGKGTSG.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению состоит из последовательности GTITTNSPETSSRTSGAPVTTAASSLETSGTSG.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению состоит из последовательности GTITTNSPETSSRTS.

В контексте настоящего описания выражения "последовательность, расположенная между X и Y положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13", "последовательность, расположенная между X и Y положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13", "при этом указанные аминокислотные остатки идентичны аминокислотам, расположенным между X-Y положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13" и "аминокислотная последовательность, которая идентична последовательности, расположенной между X и Y положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13" включают последовательности, которые расположены между указанными положениями и включают аминокислоту(ы) в положении X и/или Y. Кроме того, термины включают последовательности, которые расположены между указанными положениями и которые не содержат аминокислоту(ы) в позициях X и/или Y. Другими словами, в некоторых вариантах реализации аминокислота(ы) в указанном положении X и/или Y присутствует в пептиде CD43 согласно настоящему изобретению, тогда как в других вариантах реализации аминокислоты в указанных позициях X и/или Y отсутствуют.

Помимо указанных аминокислотных последовательностей, которые идентичны последовательности, расположенной между 133 и 184 положениями последовательности аминокислот, или последовательности, расположенной между 133 и 183 положениями последовательности аминокислот, или последовательности, расположенной между 133 и 165 положениями последовательности аминокислот, или последовательности, расположенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13, пептид CD43 согласно настоящему изобретению может дополнительно содержать другие аминокислотные остатки. В некоторых вариантах реализации указанные другие аминокислотные остатки получают не из последовательности CD43. Указанные другие аминокислотные остатки, которые также упоминаются здесь как "отличные от CD43 аминокислотные остатки", могут, например, функционировать для улучшения стабильности и/или улучшения иммуногенности, и/или для присоединения пептида CD43 к другому фрагменту, такому как, например, молекулярный скаффолд или носитель. Неограничивающими примерами таких скаффолдов или носителей являются гемоцианин моллюска *Megathura crenulata* и CLIPS-скаффолды (такие как, например, бис(бромметил)бензол, трис(бромметил)бензол и тетра(бромметил)бензол, описанные в публикации WO 2004/077062). Таким образом, в некоторых вариантах реализации предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид длиной не более 100 аминокислотных остатков, при этом указанный пептид содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 52 аминокислотных остатков, или не более 51 аминокислотного остатка, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 184 положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13, и при этом указанный пептид также содержит по меньшей мере 1, или по меньшей мере 2, или по меньшей мере 3, или по меньшей мере 4, или по меньшей мере 5, или по меньшей мере 10, или по меньшей мере 20, или по меньшей мере 30, или по меньшей мере 40, или по меньшей мере 50, или по меньшей мере 60, или по меньшей мере 70, или по меньшей мере 80 отличных от CD43 аминокислотных остатков, при этом полноразмерная последовательность указанных аминокислотных остатков, отличных от CD43, отсутствует в CD43 человека, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид длиной не более 100 аминокислотных остатков, при этом указанный пептид содержит аминокислотную последовательность длиной не меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 51 аминокис-

В некоторых вариантах реализации указанной пептид CD43 согласно настоящему изобретению представляет собой укороченный внеклеточный участок CD43 длиной не более 90 аминокислотных остатков, или не более 80 аминокислотных остатков, или не более 70 аминокислотных остатков, или не более 60 аминокислотных остатков, или не более 51 аминокислотного остатка, или не более 50 аминокислотных остатков, или не более 45 аминокислотных остатков, или не более 40 аминокислотных остатков, или не более 35 аминокислотных остатков, или не более 33 аминокислотных остатков, или не более 30 аминокислотных остатков, или не более 25 аминокислотных остатков, или не более 20 аминокислотных остатков, которая содержит аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 33 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 165 положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации длина указанной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 15 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 20 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 25 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 30 аминокислотных остатков, или 33 аминокислотных остатка.

- 6 -

ложенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации длина указанной аминокислотной последовательности составляет по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или 15 аминокислотных остатков.

В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который представляет собой укороченный внеклеточный участок CD43 с длиной не более 90 аминокислотных остатков, или не более 80 аминокислотных остатков, или не более 70 аминокислотных остатков, или не более 60 аминокислотных остатков, или не более 52 аминокислотных остатков, или не более 51 аминокислотного остатка, или не более 50 аминокислотных остатков, или не более 45 аминокислотных остатков, или не более 40 аминокислотных остатков, или не более 35 аминокислотных остатков, или не более 33 аминокислотных остатков, или не более 30 аминокислотных остатков, или не более 25 аминокислотных остатков или не более 20 аминокислотных остатков или не более 15 аминокислотных остатков.

Как известно специалисту в данной области техники, после того, как была предложена иммуногенная последовательность, стало возможным в некоторой степени изменять последовательность, что тем самым в предпочтительном варианте оптимизирует иммуногенность и/или стабильность полученного иммуногена. Это, например, осуществляют при помощи процедур мутагенеза, после которых в предпочтительном варианте исследуют стабильность и/или иммуногенность полученных соединений и выбирают улучшенное AML-специфичное антигенное соединение. Специалист в данной области техники способен получить варианты антигена, начиная с определенной аминокислотной последовательности. Например, применяют консервативную аминокислотную замену. Примеры консервативных аминокислотных замен включают замену одного гидрофобного остатка, такого как изолейцин, валин, лейцин или метионин, на другой гидрофобный остаток и замену одного полярного остатка на другой полярный остаток, как, например, замену аргинина на лизин, глутаминовой кислоты на аспарагиновую кислоту или глутамин на аспарагин. В некоторых вариантах реализации проводят общий анализ замен, который включает замену по меньшей мере одного аминокислотного остатка любым другим аминокислотным остатком и исследование полученных соединений.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации настоящего изобретения предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков, который содержит или, по существу, состоит из аминокислотной последовательности длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 52 аминокислотных остатков или не более 51 аминокислотного остатка, которая обладает по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью последовательности к последовательности, расположенной между 133 и 184 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации предложен выделенный, рекомбинантный или очищенный пептид CD43, который содержит аминокислотную последовательность длиной 51 аминокислотный остаток, которая обладает по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью последовательности к последовательности, расположенной между 133 и 183 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков, который содержит или, по существу, состоит из аминокислотной последовательности длиной 33 аминокислотных остатка, которая обладает по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью последовательности к последовательности, расположенной между 133 и 165 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации предложен выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков, который содержит или, по существу, состоит из аминокислотной последовательности длиной 15 аминокислотных остатков, которая обладает по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90%, более предпочтительно по меньшей мере 95%, более предпочтительно по меньшей мере 96%, более предпочтительно по меньшей мере 97%, более предпочтительно по меньшей мере 98%, более предпочтительно по меньшей мере 99% идентичностью последовательности к последовательности, рас-

положенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот белка CD43 человека, как показано на фиг. 13.

Термин "% идентичности последовательности" в настоящем описании определен как процент остатков в аминокислотной последовательности-кандидате, который идентичен остаткам в эталонной последовательности после выравнивания двух последовательностей и введения при необходимости разрывов (гэпов) для достижения максимальной процентной идентичности. Способы и компьютерные программы для выравнивания хорошо известны в данной области техники. Одной компьютерной программой, которую можно применять или адаптировать для определения того, попадает ли последовательность-кандидат под данное определение, является "Align 2", созданная компанией Genentech, Inc., которая была подана с пользовательской документацией в Бюро по защите авторских прав Соединенных Штатов Америки, Вашингтон, округ Колумбия, 20559, 10 декабря 1991 г.

Определенный в настоящем описании выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 также упоминается как "пептид CD43 согласно настоящему изобретению" или "CD43-антиген согласно настоящему изобретению". В некоторых вариантах реализации аминокислотные остатки пептида CD43 согласно настоящему изобретению выбирают из 20 аминокислотных остатков, которые встречаются у эукариот в природных условиях, которые также упоминаются как "стандартные" или "канонические" аминокислоты. В альтернативном варианте пептид CD43 согласно настоящему изобретению содержит неприродные аминокислотные остатки, такие как, например, D-аминокислоты (т.е. D-стереоизомеры аминокислот) или N-метиламинокислоты.

Пептид CD43 согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте является гликозилированным. Такой пептид более точно отражает природный AML-антиген *in vivo*, учитывая тот факт, что природный белок CD43 на поверхности клетки является сильно гликозилированным. В некоторых предпочтительных вариантах реализации указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению содержит остатки сиаловой кислоты (также называемой α -ацетилнейраминовой кислотой). *In vivo* человеческий CD43 является сильно сиалилированным. Лечение нейраминидазой расщепляет остатки сиаловой кислоты в CD43-гликопротеине. Поэтому в некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению является чувствительным к нейраминидазе. В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который является онкосиалилированным, что означает, что указанный пептид CD43 имеет опухолеспецифичный профиль сиалирования. В контексте настоящего описания пептид CD43 согласно настоящему изобретению с "опухолеспецифичным профилем сиалирования" включает пептид CD43 согласно настоящему изобретению с профилем сиалирования, который образует клетка опухоли, или пептид CD43 согласно настоящему изобретению с профилем сиалирования, который идентичен или по меньшей мере на 90%, или по меньшей мере на 95%, или по меньшей мере на 97% аналогичен профилю сиалирования, который образует клетка опухоли.

В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется AML-клеткой. В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется клеткой клеточной линии, полученной из AML-клетки. У такого пептида CD43 профиль гликозилирования будет в большей степени напоминать профиль гликозилирования AML-клеток у пациента с AML *in vivo*. В некоторых вариантах реализации указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению продуцируется клеткой острого моноцитарного лейкоза человека (THP-1 клетка). В некоторых вариантах реализации указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению продуцируется клеткой Kasumi 3, или клеткой HL60, или клеткой KG1a, или клеткой SH2, или клеткой MonoMac6, или клеткой Molm13, или клеткой CML K562.

В контексте настоящего описания пептид CD43 согласно настоящему изобретению, имеющий профиль гликозилирования, аналогичный или идентичный профилю гликозилирования, который получают в результате экспрессии указанного пептида CD43 в AML-клетке, например в AML-бласте или в клеточной линии AML, упоминается как пептид CD43 согласно настоящему изобретению с AML-специфичным профилем гликозилирования. Таким образом, в некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению с AML-специфичным профилем гликозилирования.

В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется MDS-клеткой. В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется клеткой клеточной линии, полученной из MDS-клетки. У такого пептида CD43 профиль гликозилирования будет в большей степени напоминать профиль гликозилирования MDS-клеток у пациента с MDS *in vivo*.

В некоторых вариантах реализации предложены пептиды CD43 согласно настоящему изобретению с MDS-специфичным профилем гликозилирования. У таких пептидов профиль гликозилирования аналогичен или идентичен профилю гликозилирования, который образуется в результате экспрессии пептида CD43 согласно настоящему изобретению в MDS-клетке, например в MDS-бласте или клеточной линии MDS.

В других вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется клеткой-хозяином с применением технологии гликоинжиниринга *in vitro* (например, согласно Roche Diagnostics GmbH). Согласно этим вариантам реализации клетки-хозяева обеспечивают

ферментами α -2,6-сиалилтрансферазой и/или α -2,3-сиалилтрансферазой, так что при получении пептида CD43 согласно настоящему изобретению указанный пептид будет подвергаться сиалированию. Таким образом, также предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется клеткой, содержащей α -2,6-сиалилтрансферазу и/или α -2,3-сиалилтрансферазу. В некоторых вариантах реализации указанные α -2,6-сиалилтрансфераза и/или α -2,3-сиалилтрансфераза включает экзогенную α -2,6-сиалилтрансферазу и/или экзогенную α -2,3-сиалилтрансферазу, что означает, что указанный фермент рекомбинантно вводят в клетку-хозяина (или в родительскую клетку-хозяина, из которой происходит текущая клетка-хозяин). В некоторых вариантах реализации предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, который продуцируется клеткой-хозяином, содержащей экзогенную последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую α -2,6-сиалилтрансферазу и/или α -2,3-сиалилтрансферазу.

Антитела против CD43 известны в данной области техники. Однако очевидно, что эти антитела распознают другой эпитоп. Например, в табл. 1 у Kim et al., 2014 показано, что моноклональные антитела против CD43 (mAb) YG5, 2C8, 8E10 и DFT-1 действительно связывают AML-клетки, однако некоторые или все из этих известных антител (Kim et al., 2014) также связывают и многие другие отличные от AML клетки, включая CEM7, Jurkat, IM9, Ramos, Raji, Daudi, Reh, клетки нормального (здорового) костного мозга и PBL-клетки. Следовательно, антитела YG5, 2C8, 8E10 и DFT-1 являются не совсем специфичными для AML. Наоборот, антитело AT14-013, которое специфически связывает пептиды CD43 согласно настоящему изобретению, не связывает клетки Jurkat, клетки Рамоса, клетки нормального (здорового) костного мозга или клетки PBL/PBMC (фиг. 5 и 9B). Таким образом, антитела YG5, 2C8, 8E10 и DFT-1 связывают другой CD43-эпитоп.

Антитело UNI (Tuccillo et al., 2014a и Tuccillo et al., 2014b) распознает CD43-эпитоп, включая Gal-Nас-О-связанный моносахарид, соответствующий Тn-антигену О-гликанов. Можно сделать вывод, что белковый кор этого эпитопа содержит аминокислоты аминокислотной последовательности CD43 с 64 по 83. Этот антиген экспрессируется тимоидами человека, линиями лейкозных клеток HPB-ALL, H9 и Molt-4 и в субпопуляции CD4⁺ Т-лимфоцитов периферической крови. Тем не менее, антитело AT14-013 не связывает тимоциты человека, что свидетельствует о том, что настоящее изобретение обеспечивает другой AML-антиген.

В международной заявке на патент WO 2007/146172 описаны антитела 5F1, 51-41 и 138-10, которые распознают CD43, присутствующий на поверхности линии клеток колоректальной аденокарциномы человека Colo205 и линии клеток карциномы желудка человека NCI-N87. AML в публикации WO 2007/146172 не упоминается. Антитело AT14-013, которое специфически связывает AML-специфичные пептиды CD43 согласно настоящему изобретению, не связывает клетки Colo205, как это показано в примерах. Таким образом, антитела 5F1, 51-41 и 138-10 связывают другой CD43-эпитоп.

В международной заявке на патент WO 2006/121240 описаны антитела EB-1, EB-2 и EB-3, которые способны распознавать негликозилированный участок CD43, состоящий из аминокислот в положении 73-81 аминокислотной последовательности CD43. Этот антиген присутствует на поверхности тимоцитов, некоторых гематопозитических предшественников в костном мозге, на поверхности AML-клеток, клеток острого лимфобластного лейкоза (ALL) и клеток хронического миелоидного лейкоза (CML). EB-1 распознает свой антиген как в обработанных сиалидазой, так и в необработанных CD43-молекулах. Напротив, гликозилированные пептиды CD43 согласно настоящему изобретению более не распознаются антителом AT14-013 после обработки сиалидазой (нейрамидазой), что означает, что настоящее изобретение обеспечивает чувствительный к нейрамидазе AML-антиген, в отличие от антигенов EB-1, EB-2 и EB-3. Кроме того, антитело AT14-013 не связывает ALL-клетки или тимоциты, в отличие от антител EB-1, EB-2 и EB-3. Кроме того, пептиды CD43 согласно настоящему изобретению содержат аминокислотную последовательность длиной по меньшей мере 3 аминокислотных остатка и не более 51 аминокислотного остатка, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 184 аминокислотными остатками в последовательности аминокислот CD43, домен которого отличен от домена, образованного аминокислотными остатками в положениях 73-81 последовательности аминокислот CD43, которые распознаются антителами EB-1, EB-2 и EB-3. Антитела EB-1, EB-2 и EB-3, таким образом, также связывают другой CD43-эпитоп. В заключение, в настоящем изобретении предложен новый AML-специфичный антиген.

Длина пептида CD43 согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте составляет не более 100 аминокислотных остатков и по меньшей мере 3 аминокислотных остатка, предпочтительно по меньшей мере 5 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 6 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 7 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 8 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 9 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 10 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 11 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 12 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 13 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 14 аминокислотных остатков, или по меньшей мере 15 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации указанная длина составляет по меньшей мере 20 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации указанная длина составляет по меньшей мере 25 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации указанная длина составляет по меньшей мере 30 аминокислотных остатков. В некоторых вариантах реализации

аминокислотной последовательности длиной по меньшей мере 5 аминокислотных остатков и не более 15 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению состоит из аминокислотной последовательности длиной по меньшей мере 8 аминокислотных остатков и не более 15 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению состоит из аминокислотной последовательности длиной по меньшей мере 10 аминокислотных остатков и не более 15 аминокислотных остатков, которая идентична последовательности, расположенной между 133 и 147 положениями последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13.

В некоторых вариантах реализации вышеупомянутые пептиды являются гликозилированными, в предпочтительном варианте содержащими остатки сиаловой кислоты для лучшей имитации природного AML-специфичного антигена. В некоторых вариантах реализации вышеупомянутые пептиды являются онкосиалилированными. В некоторых вариантах реализации вышеупомянутые пептиды продуцируются AML-клетками или клеточными линиями AML, в предпочтительном варианте ТНР-1 клетками. В некоторых вариантах реализации вышеупомянутые пептиды продуцируются MDS-клетками или клеточной линией MDS.

Молекулы нуклеиновой кислоты или их функциональные эквиваленты, кодирующие пептид CD43 согласно настоящему изобретению, также охватываются настоящим изобретением. Кроме того, также предложена, например, выделенная синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению. В контексте настоящего описания молекула нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению в предпочтительном варианте содержит цепь нуклеотидов, в более предпочтительном варианте ДНК, кДНК или РНК. В других вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты или последовательность нуклеиновой кислоты согласно настоящему изобретению содержит другие виды структур нуклеиновых кислот, такие как, например, спираль ДНК/РНК, пептидную нуклеиновую кислоту (PNA), блокированную нуклеиновую кислоту (LNA) и/или рибозим. Такие другие структуры нуклеиновых кислот называются функциональными эквивалентами последовательности нуклеиновой кислоты. Таким образом, термин "функциональный эквивалент молекулы нуклеиновой кислоты", включает цепь, содержащую неприродные нуклеотиды, модифицированные нуклеотиды и/или ненуклеотидные строительные блоки, которые выполняют ту же функцию, что и природные нуклеотиды.

В некоторых вариантах реализации предложена молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, при этом последовательность нуклеиновой кислоты человека оптимизируют по кодону для клетки, не являющейся человеческой, например, для не являющейся человеческой клетки-продуцента, такой как клетки *E.coli*, клетки яичников китайского хомячка (CHO), NSO-клетки (которая представляет собой миелому мыши) или клетки 293 (T). Это означает, что по меньшей мере один кодон из указанной последовательности нуклеиновой кислоты человека заменяют по меньшей мере одним кодоном, который является предпочтительным для указанной не являющейся человеческой клетки.

В контексте настоящего описания выделенная синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению, также упоминается как "молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению".

Теперь, когда в настоящем изобретении предложены пептиды CD43, содержащие новый AML-специфичный антиген, стало возможным множество применений. Например, в некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению применяют для индуцирования, выделения и/или получения иммунных клеток и/или антител или их функциональных частей или функциональных производных, которые способны специфически связывать лимфопротеративные и/или миелопротеративные клетки. Иммунные клетки и/или антитела, или их функциональные части или функциональные производные, которые индуцируют, выделяют и/или получают с применением пептида CD43 согласно настоящему изобретению, являются особенно подходящими для лечения или предотвращения миелопротеративных или лимфопротеративных расстройств. Более того, следует принимать во внимание, что антитело AT14-013, которое представляет собой антитело, специфичное для пептида CD43 согласно настоящему изобретению, также нацеливается на лейкозные стволовые клетки, которые, как известно, обладают большей устойчивостью к действию терапии и зачастую ответственны за проявление рецидива заболевания после лечения. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению применяют для индуцирования и/или получения AML-специфичных иммунных клеток и/или AML-специфичных антител. Например, животное, не являющееся человеком, иммунизируют по меньшей мере одним пептидом CD43 согласно настоящему изобретению или иммуногенным соединением, содержащим пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или молекулой нуклеиновой кислоты или ее функциональным эквивалентом, кодирующим пептид CD43 согласно настоящему изобре-

тению, или вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, в предпочтительном варианте с последующим по меньшей мере одним повторным (бустерным) введением. Затем иммунные клетки и/или антитела, которые являются специфичными для лимфопролиферативных и/или миелопролиферативных клеток, в предпочтительном варианте специфичными для AML, собирают от указанного животного, не являющегося человеком. В некоторых вариантах реализации указанные иммунные клетки содержат Т-клетки, такие как, например, природные клетки-киллеры (НК-клетки) или Т-хелперы.

В некоторых вариантах реализации указанные иммунные клетки, собранные от указанного иммунизированного животного, не являющегося человеком, содержат В-клетки, например, AML-специфичные В-клетки являются особенно подходящими для получения AML-специфичных антител. AML-специфичные В-клетки, собранные от указанного иммунизированного животного, применяют, например, для получения гибридом, из которых получают AML-специфичные антитела. В других вариантах реализации В-клетки, собранные от указанного иммунизированного животного, трансдуцируют нуклеиновыми кислотами Bcl-6 и Bcl-xL и культивируют в долговременных культурах В-клеток *ex vivo*, как, например, это описано в Европейском патенте № 1974017 и в патенте США № 91227251. Таким образом, получают долговременные реплицирующиеся культуры В-клеток, в которых В-клетки как реплицируются, так и продуцируют антитело. В некоторых вариантах реализации AML-специфичные антитела, продуцируемые указанными гибридами или такой культурой В-клеток, собирают и, например, применяют в терапии против AML, в предпочтительном варианте после гуманизации антител для уменьшения побочных эффектов. В некоторых вариантах реализации антитело и/или В-клетку, полученную от указанного животного, не являющегося человеком, исследуют на предмет конкуренции с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Это, например, осуществляют путем инкубации AML-клеток с указанным антителом или В-клеткой, полученной от указанного животного, не являющегося человеком, и последующим добавлением антитела AT14-013. В качестве контроля AML-клетки в предпочтительном варианте инкубируют с антителом AT14-013 в отсутствие любого другого антитела или В-клетки. Если предварительная инкубация AML-клеток с антителом или В-клеткой, полученной от указанного не являющегося человеком животного, по всей видимости, влияет на связывание AT14-013 с указанными AML-клетками, то делают вывод о том, что указанное антитело или В-клетка, полученная от указанного животного, не являющегося человеком, конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43.

В некоторых вариантах реализации последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие вариативные области В-клеток, полученных от указанного не являющегося человеком животного, секвенируют для получения последовательностей нуклеиновых кислот AML-специфичных вариативных доменов, после чего по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую такие последовательности, вводят в клетки-продуценты, такие как, например, клетки *E. coli*, клетки яичника китайского хомячка (CHO), NSO-клетки или клетки 293(T) для продуцирования AML-специфичных антител. Указанную по меньшей мере одну последовательность нуклеиновой кислоты в предпочтительном варианте оптимизируют по кодону для указанной клетки-продуцента. В контексте настоящего описания термин "кодон" означает триплет нуклеотидов (или их функциональных эквивалентов), которые кодируют определенный аминокислотный остаток. Термин "оптимизированный по кодону" означает, что по меньшей мере один кодон из исходной последовательности нуклеиновой кислоты животного заменяют на по меньшей мере один кодон, который является предпочтительным для клетки, полученной от других видов, такой как, например, определенной клетки-продуцента. Эти замещающие кодоны в предпочтительном варианте кодируют тот же аминокислотный остаток, что и замененный исходный кодон у животного.

В некоторых вариантах реализации CD43-специфичные антитела, полученные от указанного животного, не являющегося человеком, или из иммунных клеток указанного животного, не являющегося человеком, являются гуманизированными, что означает, что по меньшей мере часть животной аминокислотной последовательности, в предпочтительном варианте по меньшей мере часть или всю каркасную последовательность, заменяют человеческой последовательностью для уменьшения неблагоприятных побочных эффектов у людей.

Протоколы иммунизации животных, включая подходящие процедуры введения и адъюванты, способы получения и очистки антител и/или иммунных клеток, полученных от таких иммунизированных животных, эксперименты по определению конкуренции и процедуры гуманизации нечеловеческих антител хорошо известны в данной области техники. Например, ссылки представлены у Hartley et al., 1995.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, содержащее пептид CD43 согласно настоящему изобретению, применяют для скрининга библиотеки фагового дисплея для идентификации и/или выделения AML-специфичных иммуноглобулинов (обычно Fab-фрагментов). В некоторых вариантах реализации применяют библиотеку наивного фагового дисплея. В предпочтительных вариантах реализации применяют библиотеку фагового дисплея, полученную от по меньшей мере одного пациента с AML, так что указанная библиотека уже будет направленной в отношении AML. В некоторых вариантах реализации AML-специфичный иммуноглобулин, полученный из указанной библиотеки фагового дисплея, исследуют на предмет конкуренции с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Это, например, осуществляют, применяя тест на определение конкуренции, опи-

санный в настоящем документе.

Таким образом, также предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению, или применение иммуногенного соединения согласно настоящему изобретению, или применение молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, кодирующего пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или применение вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, для индуцирования, выделения и/или получения иммунной клетки или антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, такого как, например, Fab-фрагмента. Указанная иммунная клетка или антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент в предпочтительном варианте могут специфически связывать лимфопролиферативные клетки и/или миелопролиферативные клетки. В предпочтительном варианте указанные миелопролиферативные клетки представляют собой AML-клетки, MDS-клетки и/или CML-клетки, в наиболее предпочтительном варианте AML-клетки. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или иммуногенное соединение согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, применяют для индуцирования и/или получения антитела, которое может индуцировать опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). Неограничивающим примером такого антитела является AT14-013, как показано в примерах. Тот факт, что пептид CD43 согласно настоящему изобретению или иммуногенное соединение согласно настоящему изобретению может индуцировать и/или способствовать получению антитела с ADCC и/или CDC-индуцирующей активностью, означает, что антитела можно индуцировать или получать таким образом, что они будут функциональны *in vivo*.

В настоящем документе также предложен пептид CD43 или соединение согласно настоящему изобретению для применения в качестве иммуногена, а также молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, для применения в качестве иммуногена.

В некоторых вариантах реализации предложен способ получения иммунных клеток и/или антител, которые могут специфически связывать лимфопролиферативные клетки и/или миелопролиферативные клетки, такие как, например, AML-специфичная иммунная клетка или AML-специфичное антитело, причем указанный способ включает иммунизацию животного, не являющегося человеком, пептидом CD43 согласно настоящему изобретению, или соединением согласно настоящему изобретению, или молекулой нуклеиновой кислоты, или функциональным эквивалентом согласно настоящему изобретению, или вектором, содержащим молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению. Указанный способ в предпочтительном варианте также включает отбор иммунной клетки и/или антитела, которое может специфически связывать лимфопролиферативные клетки и/или миелопролиферативные клетки у указанного не являющегося человеком животного. В некоторых вариантах реализации AML-специфичную иммунную клетку и/или AML-специфичное антитело собирают от указанного животного, не являющегося человеком. В некоторых вариантах реализации В-клетка и/или антитело, получаемое от указанного животного, не являющегося человеком, исследуют на предмет конкуренции с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Также в настоящем документе предложена иммунная клетка и/или антитело, которое может специфически связывать лимфопролиферативные клетки и/или миелопролиферативные клетки, получаемые способом согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации предложено AML-специфичное антитело или AML-специфичная иммунная клетка, получаемая способом согласно настоящему изобретению, для продуцирования AML-специфичной иммунной клетки или AML-специфичного антитела. Такое AML-специфичное антитело в предпочтительном варианте конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43.

Указанное животное, не являющееся человеком, в предпочтительном варианте включает млекопитающее, такое как грызун или крупный рогатый скот. В некоторых вариантах реализации указанное не являющееся человеком животное включает мышь, крысу, кролика, ламу, верблюда, свинью, домашнюю птицу, корову, козу, лошадь, обезьяну и/или гориллу.

Ввиду того, что антитело AT14-013 специфически связывает пептид CD43 согласно настоящему изобретению, другие антитела, которые получают, продуцируют или выбирают с применением пептида CD43 согласно настоящему изобретению, обычно будут конкурировать с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Наоборот, существующие против CD43 антитела, которые известны в данной области техники, не конкурируют с антителом AT14-013, тогда как известные такие антитела действительно конкурируют друг с другом, как показано на фиг. 9. Таким образом, указанные другие антитела, известные в данной области техники, очевидным образом связывают эпитоп, который отличен от эпитопа AT14-013. Таким образом, также предложено выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Указанное выделенное, рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент в предпочтительном варианте конкурирует с антителом

AT14-013 за связывание по меньшей мере с частью эпитопа, который расположен между аминокислотами 133 и 184 в последовательности аминокислот CD43, как показано на фиг. 13. Указанное выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент обычно конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с пептидом CD43 согласно настоящему изобретению.

В контексте настоящего описания термин "антитело" относится к белку иммуноглобулина, содержащему две тяжелые, связанные друг с другом цепи, причем каждая тяжелая цепь также соединена с легкой цепью.

В настоящем описании термин "функциональная часть антитела" определяют как часть, которая обладает по меньшей мере одним таким же общим свойством, что и указанное антитело, но не обязательно в количественном отношении. Указанная функциональная часть может связывать тот же антиген, что и указанное антитело, хотя и не обязательно в той же степени. Функциональная часть антитела в предпочтительном варианте содержит по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL). В некоторых вариантах реализации функциональная часть антитела содержит по меньшей мере переменный домен тяжелой цепи (VH). Неограничивающими примерами функциональной части антитела являются однодоменное антитело, одноцепочечное антитело, нанотело, унитело (unibody), переменный одноцепочечный фрагмент (scFv), привлекающий Т-клетки биспецифический активатор (BiTE), Fab-фрагмент и F(ab')₂-фрагмент.

В настоящем описании термин "функциональный эквивалент антитела" определяют как искусственное связывающее соединение, содержащее по меньшей мере одну последовательность CDR антитела, в предпочтительном варианте последовательность CDR3 тяжелой цепи. Указанный функциональный эквивалент в предпочтительном варианте содержит последовательность CDR3 тяжелой цепи антитела, а также последовательность CDR3 легкой цепи указанного антитела. В более предпочтительном варианте указанный функциональный эквивалент содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи антитела, а также последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 легкой цепи указанного антитела. Функциональный эквивалент антитела, получают, например, путем изменения антитела таким образом, что по меньшей мере антигенсвязывающее свойство полученного соединения остается, по существу, таким же, но не обязательно в количественном отношении. Это осуществляют многими способами, например, путем консервативной аминокислотной замены, и тем самым происходит замещение аминокислотного остатка другим остатком с обычно сходными свойствами (размер, гидрофобность и т.д.), так что полное функционирование указанного антитела, по существу, не нарушается. Неограничивающим примером функционального эквивалента антитела является антитело с модифицированным хвостом Fc, который, например, модифицируют при помощи аминокислотной замены (замен) и/или изменения(й) с применением гликозилирования.

Как хорошо известно специалисту в данной области техники, тяжелая цепь антитела представляет собой более крупную из двух видов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Тяжелая цепь содержит константный домен и переменный домен, причем этот переменный домен участвует в связывании антигена. Легкая цепь антитела представляет собой меньшую из двух видов цепей, составляющих молекулу иммуноглобулина. Легкая цепь содержит константный домен и переменный домен. Этот переменный домен зачастую, но не всегда, вместе с переменным доменом тяжелой цепи участвует в связывании антигена.

Областями, определяющими комплементарность (CDR), являются гиперпеременные области, присутствующие в переменных доменах тяжелой цепи и переменных доменах легкой цепи. В случае полных антител CDR1-3 тяжелой цепи и CDR1-3 смежной легкой цепи вместе образуют участок связывания антигена.

В контексте настоящего описания иммунная клетка, антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент является "специфичным" для AML в том случае, если оно способно связывать AML-клетки с аффинностью связывания, которая по меньшей мере в два раза выше, чем аффинность связывания нерелевантного, представляющего собой контроль антитела или иммунной клетки с указанными AML-клетками (при этом представляющее собой контроль антитело или иммунная клетка не являются специфичными для указанных AML-клеток). Например, связывание AML-клеток AML-специфичным антителом, В-клеткой или Т-клеткой обычно опосредуется через области комплементарности антитела, В-клеточного рецептора (BCR) или Т-клеточного рецептора (TCR) соответственно. Конкретная трехмерная структура как AML-антигена, так и переменного домена антитела или BCR, или TCR позволяет этим двум структурам связываться вместе (взаимодействие наподобие замка и ключа), в отличие от случайного, неспецифичного присоединения антител или BCR, или TCR. Тем не менее, термин "AML-специфичный" включает некоторую реакционную способность по отношению к другим типам клеток. Поскольку антитело или BCR, или TCR обычно распознают эпитоп антигена, и эпитоп, как таковой, может также присутствовать на поверхности и других клеток, AML-специфичные антитела, В-клетки или Т-клетки затем могут распознавать такие другие клетки. Неограничивающими примерами таких других клеток являются MDS и CML-клетки. Кроме того, клетки меланомы и меланоциты по всей видимости связываются AML-специфичным антителом AT14-013, хотя и в меньшей степени. Следова-

тельно, термин "AML-специфический" не исключает связывания антител, или В-клеток, или Т-клеток с другой клеткой, которая содержит по меньшей мере часть того же эпитопа. Однако в примерах показано, что многие CD43⁺ клетки, включая CD43⁺ гематопозитические клетки, такие как, например, РВМС, (предшественники) Т-клеток и В-клеток, не содержат AML-антигена, которое предложено в настоящем изобретении.

Пептиды CD43 согласно настоящему изобретению являются особенно подходящими для проведения исследований на определение присутствия AML-специфичных связывающих соединений, таких как, например, AML-специфичных антител или AML-специфичных иммунных клеток, таких как В-клетки или Т-клетки, в биологическом образце. Например, образец, полученный от индивидуума или часть такого образца, которая содержит антитела, В-клетки и/или Т-клетки, инкубируют с пептидом CD43 согласно настоящему изобретению или с соединением, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, для скрининга на присутствие AML-специфичных антител и/или AML-специфичных иммунных клеток. В том случае, если такие антитела или иммунные клетки присутствуют в указанном образце или в указанной фракции образца и связывают указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, указанный образец типизируют как положительный для AML-специфичных связывающих соединений (т.е. антител и/или иммунных клеток). Указанный образец, например, включает образец крови или образец костного мозга или биопсии, такую как, например, миелоидную саркому (которую также называют хлоромой).

AML-специфичное антитело или AML-специфичную иммунную клетку, например, обнаруживают и/или количественно определяют с применением иммунологического анализа, такого как, например, вестерн-блоттинга, ферментного иммуносорбентного анализа (с захватом) (ELISA) или радиоиммуноанализа (RIA). Такие методы исследования хорошо известны в данной области техники. Меченые пептиды CD43 согласно настоящему изобретению, например, инкубируют с образцом крови или образцом костного мозга или биопсии, таким как, например, миелоидная саркома, или с фракцией такого образца, которая содержит антитела, В-клетки и/или Т-клетки, после чего несвязанные связывающие соединения вымывают. Затем определяют, связываются ли AML-специфичные антитела или иммунные клетки с пептидами CD43 согласно настоящему изобретению. В некоторых вариантах реализации немеченый пептид CD43 согласно настоящему изобретению или немеченое соединение, содержащее пептид CD43 согласно настоящему изобретению, вступает в контакт с образцом, которое содержит антитела и/или иммунные клетки, таким как, например, образцом крови или образцом костного мозга или биопсией, такой как, например, миелоидной саркомой, или с фракцией такого образца, которая содержит антитела, В-клетки и/или Т-клетки. После инкубации в предпочтительном варианте проводят по меньшей мере одну стадию промывки для удаления несвязанных антител и несвязанных иммунных клеток. Затем исследуют, связались ли антитела или иммунные клетки с указанным пептидом CD43 согласно настоящему изобретению, например, применяя антитело, которое специфически направлено против человеческих антител или иммунных клеток человека, и которое присоединено к маркеру, такому как, например, флуоресцентное соединение или, например, пероксидаза хрена или щелочная фосфатаза. После дополнительной стадии промывки определяют, связалось ли вторичное антитело, например, измеряя световое излучение или добавляя субстрат пероксидазы хрена или щелочной фосфатазы. Такие методы обнаружения хорошо известны в данной области техники.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, вступает в контакт с фракцией образца, которое обогащено антителами и/или иммунными клетками. В некоторых вариантах реализации указанная фракция представляет собой культуру В-клеток *in vitro* или культуру Т-клеток *in vitro*. В некоторых вариантах реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, вступает в контакт с антителами и/или иммунными клетками, которые, по существу, очищены от биологического образца, как, например, с очищенной фракцией В-клеток, которую получают, отбирая CD19-положительные клетки и/или фракцию антитела/В-клеток, которую очищают с применением антитела против Ig или методом очистки с применением протеинов А или G. Методы очистки с применением протеинов А или G хорошо известны в данной области техники, а протоколы и реагенты являются коммерчески доступными. В контексте настоящего описания термин "иммунные клетки, которые, по существу, очищены от образца" означает, что по меньшей мере 80%, предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% клеток полученной фракции составляют иммунные клетки. Термин "антитела, которые, по существу, очищены от образца", означает, что по меньшей мере 80%, более предпочтительно по меньшей мере 85%, более предпочтительно по меньшей мере 90% или по меньшей мере 95% массы полученной фракции составляют антитела.

Таким образом, также предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению или применение соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, для связывания и/или обнаружения иммунной клетки и/или антитела или его функциональной части или функционального эквивалента. Указанная иммунная клетка и/или антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент в предпочтительном варианте могут специфически связывать

лимфопротлиферативные клетки и/или миелопротлиферативные клетки. В предпочтительном варианте указанные миелопротлиферативные клетки представляют собой AML-клетки или MDS-клетки, или CML-клетки, предпочтительно AML-клетки. В настоящем документе также предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, для применения в качестве фрагмента для обнаружения AML-специфичных связывающих соединений, таких как антитела и/или иммунные клетки, а также предложен способ определения содержания в образце AML-специфичных антител и/или AML-специфичных иммунных клеток, причем указанный способ включает инкубацию пептида CD43 согласно настоящему изобретению или соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, с указанным образцом или с фракцией указанного образца, которая содержит антитела и/или иммунные клетки, и затем определение связывания AML-специфичными антителами и/или AML-специфичными иммунными клетками указанного пептида CD43 согласно настоящему изобретению, или же связывания AML-специфичными антителами и/или AML-специфичными иммунными клетками указанного соединения, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему соединению. Если такое связывание обнаруживают, то делают вывод о том, что указанный образец содержит AML-специфичные антитела и/или AML-специфичные иммунные клетки.

Также предложен способ обнаружения содержания в образце AML-специфичных антител и/или AML-специфичных иммунных клеток, причем указанный способ включает инкубацию пептида CD43 согласно настоящему изобретению или соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, с антителами и/или иммунными клетками, которые, по существу, очищены от указанного образца, и затем определение связывания AML-специфичными антителами и/или AML-специфичными иммунными клетками указанного пептида CD43 согласно настоящему изобретению, или же связывания AML-специфичными антителами и/или AML-специфичными иммунными клетками указанного соединения, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему соединению.

В некоторых вариантах реализации результаты описанных выше исследований по обнаружению применяют для определения наличия у индивидуума AML. Если полученный от индивидуума образец из индивидуума по всей видимости содержит AML-специфичные иммунные клетки и/или AML-специфичные антитела, то можно сделать заключение, что указанный индивидуум является пациентом с AML. Таким образом, в настоящем документе также предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению для применения в качестве диагностического агента, а также соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, для применения в качестве диагностического агента. Кроме того, предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению для диагностики AML, а также применение соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, для диагностики AML. Также предложен диагностический набор, содержащий

пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, и

средства для обнаружения связанного с антителом пептида CD43 или связанного с иммунной клеткой пептида CD43.

Такие средства, например, включают меченые антитела, которые специфически направлены против человеческих антител или иммунных клеток человека. В некоторых вариантах реализации указанные меченые антитела конъюгированы с пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой.

В некоторых вариантах реализации предложен диагностический набор, содержащий пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, и

средства для обнаружения антитела или иммунной клетки.

Такие средства, например, включают меченые антитела, которые специфически направлены против человеческих антител или иммунных клеток человека. В некоторых вариантах реализации указанные меченые антитела конъюгированы с пероксидазой хрена или щелочной фосфатазой.

В некоторых вариантах реализации предложен способ типирования образца, содержащего антитело, или образца, содержащего иммунную клетку, причем указанный способ включает введение в контакт пептида CD43 согласно настоящему изобретению (необязательно в контексте ГКГС (главного комплекса гистосовместимости) для обнаружения Т-клеток) или соединения, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, с антителами и/или иммунными клетками указанного образца и определение связывания по меньшей мере одним из указанных антител и/или иммунных клеток указанного образца пептида CD43 согласно указанному изобретению или указанного соединения согласно настоящему изобретению. Если указанный пептид CD43 или указанное соединение согласно настоящему изобретению связывается антителами и/или иммунными клетками указанного образца, указанный образец типировать как содержащий CD43-специфичные антитела и/или иммунные клетки.

В некоторых вариантах реализации предложен способ определения наличия у индивидуума миелопротлиферативного или лимфопротлиферативного расстройства, в предпочтительном варианте AML, причем указанный способ включает введение в контакт пептида CD43 согласно настоящему изобретению (необязательно в контексте ГКГС для обнаружения Т-клеток) или соединения, которое содержит указан-

ный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, с антителами и/или иммунными клетками указанного индивидуума и определение связывания по меньшей мере одним из указанных антител и/или иммунных клеток указанного индивидуума указанного пептида CD43 согласно настоящему изобретению или указанного соединения согласно настоящему изобретению. Если указанный пептид CD43 или указанное соединение согласно настоящему изобретению связываются антителами и/или иммунными клетками указанного индивидуума, то делают вывод о том, что у указанного индивидуума есть лимфопролиферативное или миелопролиферативное расстройство, как, например, AML. В некоторых вариантах реализации указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению или указанное соединение, содержащее указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, вводят в контакт с образцом, который содержит антитела и/или иммунные клетки указанного индивидуума, как, например, образцом крови или образцом костного мозга или биопсии, таким как, например, миелоидной саркомой. В других вариантах реализации указанный пептид CD43 или соединение согласно настоящему изобретению вводят в контакт с фракцией образца, полученного от указанного индивидуума, причем указанная фракция содержит иммунные клетки и/или антитела. В некоторых вариантах реализации указанный пептид CD43 или соединение согласно настоящему изобретению вводят в контакт с антителами и/или иммунными клетками, которые, по существу, очищены от указанного образца, как, например, с очищенной фракцией В-клеток, которую получают, отбирая CD19-положительные клетки и/или фракцию антитела/В-клеток, которую очищают с применением антитела против Ig или методом очистки с применением протеинов А или G.

В некоторых вариантах реализации результаты детекторных исследований согласно настоящему изобретению применяют для определения того, проявляет ли индивидуум обнаруживаемый иммунный ответ против миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, такого как AML. Это, например, предпочтительно для определения наличия у пациента, страдающего от миелопролиферативного расстройства, который получал медицинское лечение, как, например, у пациента с AML, который получал направленное против AML лечение, например, у пациента с AML, который получал иммунотерапию, как, например, трансплантацию стволовых клеток или инфузию донорских лимфоцитов, реакции ТПЛ. На сегодняшний день диагностических средств для проведения исследований наличия сильной выраженной реакции ТПЛ у получающего лечение пациента не существует. Такое диагностическое средство очень необходимо по причине того, что, например, 1) оно позволит производить раннюю идентификацию реципиентов аллогенной ТСК с высоким риском рецидива в момент времени до начала рецидива, что тем самым позволило бы проводить процедуры на более ранних этапах, как, например, постепенное уменьшение дозы иммунодепрессантов или инфузии донорских лимфоцитов; 2) оно позволит дозировать инфузию таких донорских лейкоцитов до тех пор, пока не появятся антитела против лейкоза; и 3) оно будет обнадеживать реципиентов аллогенной ТСК в те моменты времени, когда они зачастую страдают от одного из многих, связанных с ТСК, осложнений в том случае, когда может наблюдаться наличие сильно выраженной реакции ТПЛ. В настоящее время пациентам приходится ждать и наблюдать за тем, происходит ли у них рецидив или нет, и не существует никакого способа предсказать рецидив заболевания. Таким образом, доступность исследования для определения наличия у пациента иммунного ответа против AML, значительно улучшит клинический уход за перенесшими ТСК пациентами, влияя на прогноз заболевания и качество жизни.

Таким образом, в некоторых вариантах реализации предложен способ определения того, проявляет ли индивидуум иммунный ответ против миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, в предпочтительном варианте AML, причем указанный способ включает введение в контакт пептида CD43 согласно настоящему изобретению, необязательно в контексте ГКГС, или соединения, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, с антителами и/или иммунными клетками указанного индивидуума и определение того, связывает ли по меньшей мере одно из указанных антител и/или иммунных клеток указанного индивидуума указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению или указанное соединение, содержащее указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению. Если указанный пептид CD43 или указанное соединение по всей видимости являются связанными, это свидетельствует о том, что указанный индивидуум проявляет иммунный ответ против указанного миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, в предпочтительном варианте AML. В некоторых вариантах реализации определяют, конкурируют ли антитела или В-клетки указанного индивидуума с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Конкурирующие антитела будут особенно эффективны против миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, в предпочтительном варианте AML.

В некоторых вариантах реализации антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, применяют для обнаружения миелопролиферативных клеток в образце. Таким образом, также предложено применение выделенного рекомбинантного или очищенного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для определения содержания в образце миелопролиферативных клеток, в предпочтительном варианте AML, или MDS, или CML-клеток. Также в настоящем документе предложено выделенное рекомбинантное или очищенное

антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для применения в диагностике лимфопролиферативного или миелопролиферативного расстройства, предпочтительно AML, или MDS, или CML, а также применение выделенного рекомбинантного или очищенного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для диагностики AML. Также предложено применение выделенного рекомбинантного или очищенного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для получения диагностического агента для лимфопролиферативных или миелопролиферативных клеток, предпочтительно AML, или MDS, или CML-клеток. В некоторых вариантах реализации предложен диагностический набор, содержащий выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональную часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, и средства для обнаружения комплекса антитело-клетка. Указанные средства, например, содержат другое антитело против AML-клеток, такое как, например, AT14-013. В некоторых вариантах реализации указанные средства включают меченые антитела против другого компонента клеточной поверхности миелоидных клеток. В некоторых вариантах реализации указанные средства включают меченые антитела против указанного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, которое конкурирует с антителом AT14-013.

Также предложено выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для применения в качестве диагностического агента. В некоторых вариантах реализации предложен способ определения наличия миелопролиферативных клеток в образце, включающий

введение в контакт указанного образца с выделенным рекомбинантным или очищенным антителом или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43,

обеспечение связывания указанного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента с миелопролиферативными клетками, если они присутствуют, и

определение связывания миелопролиферативных клеток с указанным антителом или его функциональной частью или функциональным эквивалентом, что тем самым позволяет определить, присутствуют ли миелопролиферативные клетки в указанном образце.

В некоторых вариантах реализации указанные миелопролиферативные клетки представляют собой AML, или MDS, или CML-клетки.

Кроме того, также предложено применение антитела AT14-013 или его функциональной части или функционального эквивалента для определения содержания в образце AML, или MDS, или CML-клеток. В настоящем документе также предложено антитело AT14-013 или его функциональная часть или функциональный эквивалент для применения в диагностике AML, или MDS, или CML, а также применение антитела AT14-013 или его функциональной части или функционального эквивалента для постановки диагноза AML, или MDS, или CML. Также предложено применение антитела AT14-013 или его функциональной части или функционального эквивалента для получения диагностического агента для AML, или MDS, или CML.

Другими интересными вариантами применений новых пептидов CD43 согласно настоящему изобретению и, соответственно, кодирующих их молекул нуклеиновых кислот или их функциональных эквивалентов являются профилактические или полупрофилактические варианты применений и иммунотерапия. В контексте настоящего описания термин полупрофилактическое применение означает, что у индивидуума уже есть заболевание, но дальнейшее прогрессирование указанного заболевания по меньшей мере временно задерживается или предотвращено. Например, пептид CD43 согласно настоящему изобретению или, соответственно, кодирующая его молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, можно полупрофилактическим образом вводить индивидууму, страдающему от миелодиспластического синдрома среднего и высокого риска (MDS). Как было описано ранее в настоящем документе, у такого пациента риска развития AML от среднего до высокого, так что у указанного пациента предпочтительно заранее вызывать иммунный ответ против AML с применением пептида CD43 или соединения, или молекулы нуклеиновой кислоты, или функционального эквивалента, или вектора согласно настоящему изобретению, до того, как MDS прогрессирует до AML. Другим примером полупрофилактического варианта применения пептида CD43 согласно настоящему изобретению или соединения, или молекулы нуклеиновой кислоты, или функционального эквивалента, или вектора согласно настоящему изобретению является его применение у пациентов с AML, MDS или CML, которые перенесли аллогенную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК). Цель такой аллогенной ТГСК состоит в том, чтобы спровоцировать реакцию по типу "аллогенный трансплантат против лейкоза/MDS", однако в настоящее время не существует подхода для того, чтобы с уверенностью установить развитие такой реакции. В настоящем изобретении предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению или, соответственно, кодирующей его молекулы нуклеиновой кислоты или функциональ-

ного эквивалента, или применение вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента согласно настоящему изобретению, или применение соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, в качестве профилактического или полупрофилактического агента, который индуцирует аллореактивный иммунный ответ против CD43-экспрессирующих злокачественных клеток (реакция "трансплантат против опухолевого ответа", например против MDS, AML или CML). Другим примером профилактического или полупрофилактического варианта применения пептида CD43 согласно настоящему изобретению или соединения, или молекулы нуклеиновой кислоты, или функционального эквивалента, или вектора согласно настоящему изобретению является его применение у пациентов с CML. В настоящее время у многих пациентов CML хорошо держат под контролем, применяя ингибиторы тирозинкиназы, такие как, например, иматиниб. Однако у пациента может развиться устойчивость по меньшей мере к одному ингибитору тирозинкиназы. Более того, применение ингибиторов тирозинкиназы иногда связано с неблагоприятными побочными эффектами, такими как отек, кожная сыпь, усталость, тошнота и миелосупрессия. Ингибиторы тирозинкиназы также являются дорогостоящими. В настоящем изобретении предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению или, соответственно, кодирующей его молекулы нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента или применение вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, или применение соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, в качестве профилактического агента или полупрофилактического агента, который задерживает или предотвращает прогрессирование CML до AML. В некоторых вариантах реализации указанный пептид CD43, или соединение, или молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или вектор согласно настоящему изобретению применяют вместо ингибитора тирозинкиназы, например, для уменьшения неблагоприятных побочных эффектов и/или снижения затрат. В других вариантах реализации указанный пептид CD43, или соединение, или молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или вектор согласно настоящему изобретению применяют совместно по меньшей мере с одним ингибитором тирозинкиназы. Таким образом, в настоящем документе также предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, для применения в качестве профилактического агента или полупрофилактического агента. Также предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению или применение соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или применение молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, кодирующего пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или применение вектора согласно настоящему изобретению, для получения профилактического агента или полупрофилактического агента против AML, например, для применения у пациента с AML, который перенес аллогенную ТГСК. В некоторых вариантах реализации указанный полупрофилактический агент предназначен для пациента с MDS или CML, как это объяснялось выше. Указанный профилактический агент или полупрофилактический агент в предпочтительном варианте содержит вакцину. В контексте настоящего описания термин "профилактический агент" также включает и полупрофилактические агенты.

В некоторых вариантах реализации пептид CD43, или соединение, или молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или вектор согласно настоящему изобретению применяют для лечения миелопролиферативного или лимфопрлиферативного расстройства, в предпочтительном варианте AML. В контексте настоящего описания термин "лечение" включает облегчение по меньшей мере одного симптома и/или задержку или даже остановку прогрессирования заболевания, по меньшей мере временно. В одном предпочтительном варианте реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению, необязательно в контексте ГЛГС, или молекула нуклеиновой кислоты или, соответственно, кодирующий его функциональный эквивалент или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, или соединение, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, вводят пациенту с AML для стимулирования его/ее иммунной системы, что приводит к улучшенному иммунному ответу. В некоторых вариантах реализации наивные Т-клетки или В-клетки, полученные от пациента с AML, культивируют *ex vivo* и инкубируют с пептидом CD43 или соединением согласно настоящему изобретению, необязательно в контексте ГЛГС в случае культуры Т-клеток, чтобы получить AML-специфичные Т-клетки или В-клетки, которые затем вводят пациенту, необязательно после их размножения *ex vivo*. В некоторых вариантах реализации определяют, конкурируют ли AML-специфичные В-клетки, полученные от указанного пациента с AML, с антителом AT14-013 за связывание с CD43, поскольку конкурирующие В-клетки будут особенно эффективны против AML, в частности, ввиду того, что AT14-013 также нацеливается на лейкозные стволовые клетки, которые, как известно, более устойчивы к действию терапии и зачастую ответственны за рецидив заболевания после лечения.

В некоторых вариантах реализации применяют адаптивную клеточную терапию. В некоторых вариантах реализации Т-клетки, полученные от пациента с AML, исследуют на связывание или активацию

с применением пептида CD43 согласно настоящему изобретению в контексте ГКГС или с применением соединения, содержащего пептид CD43 согласно настоящему изобретению в контексте ГКГС, и для Т-клеток, распознающих указанный пептид CD43, в предпочтительном варианте обеспечивают их размножение *ex vivo* и дальнейшее введение пациенту, что приводит к Т-клеточному ответу против AML.

В некоторых вариантах реализации применяют адаптивную клеточную терапию донорными лимфоцитами. Указанные донорные Т-клетки, выделенные от пациента с AML, который перенес аллогенную ТГСК, или выделенные из донора для ТГСК, в предпочтительном варианте исследуют на связывание или активацию с применением пептида CD43 согласно настоящему изобретению в контексте ГКГС или с применением соединения, содержащего пептид CD43 согласно настоящему изобретению в контексте ГКГС, и для донорных Т-клеток, распознающих указанный пептид CD43, в предпочтительном варианте обеспечивают их размножение *ex vivo* и дальнейшее введение пациенту, что приводит к аллогенному Т-клеточному ответу против AML.

В некоторых вариантах реализации Т-клетки модифицируют для того, чтобы обеспечить их AML-специфичным связывающим фрагментом. Указанные Т-клетки в предпочтительном варианте получают от пациента с AML или пациента с MDS, или пациента с CML, или донора для ТГСК. В некоторых вариантах реализации получают Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR). Это Т-клетки с модифицированными Т-клеточными рецепторами, которые обладают определенной, представляющей интерес связывающей специфичностью, и которые в предпочтительном варианте получают из антитела. Обычно Т-клетки с CAR получают методом слияния одноцепочечных варибельных доменов (scFv), полученных из моноклонального антитела, и трансмембранного домена CD3-дзета, так что дзета-сигнал будет индуцироваться при целевом распознавании scFv.

Согласно некоторым вариантам реализации пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или, соответственно, кодирующую его молекулу нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, или соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, применяют для получения и/или выделения CD43-специфичной В-клетки и/или антитела, которое, в свою очередь, применяют для получения модифицированной Т-клетки. Например, указанный пептид CD43, или соединение, или молекула нуклеиновой кислоты, или функциональный эквивалент, или вектор применяют для того, чтобы вызвать, обнаружить и/или выделить AML-специфичное антитело или AML-специфичную В-клетку. Затем в некоторых вариантах реализации Т-клетки обеспечивают варибельными доменами тяжелой цепи и/или легкой цепи указанного антитела или В-клетки, и тем самым происходит образование модифицированных Т-клеток с AML-специфичностью. В некоторых вариантах реализации такие модифицированные Т-клетки затем вводят пациенту с AML, что приводит к возникновению AML-специфичного Т-клеточного ответа. В некоторых вариантах реализации указанные модифицированные Т-клетки представляют собой TAP-клетки с CAR. В некоторых вариантах реализации указанные AML-специфичные антитела или AML-специфичные В-клетки исследуют на определение конкуренции с антителом AT14-013 за связывание с CD43 перед тем, как обеспечить Т-клетки варибельными доменами тяжелой цепи и/или легкой цепи указанных антител или В-клеток. Такие конкурирующие антитела в предпочтительном варианте выбирают для получения модифицированных Т-клеток с AML-специфичностью.

Таким образом, также предложен пептид CD43 согласно настоящему изобретению, необязательно в контексте ГКГС, или соединение, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или вектор, содержащий кодирующую молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, для применения в качестве лекарственного средства. Также предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению, необязательно в контексте ГКГС, или соединение, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, кодирующего пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, для получения AML-специфичных Т-клеток. В некоторых вариантах реализации предложен способ получения модифицированной Т-клетки, причем указанный способ включает введение в контакт полученного от пациента с AML образца, содержащего антитело, или полученного от пациента с AML образца, содержащего В-клетки, с пептидом CD43 или соединением согласно настоящему изобретению, что приводит к получению связанных антител или В-клеток против AML и затем получению по меньшей мере одного AML-специфичного домена из AML-специфичного антитела или из AML-специфичной В-клетки, полученных от указанного пациента с AML, и обеспечению Т-клетки по меньшей мере одним указанным доменом. В некоторых вариантах реализации предложен способ получения модифицированной Т-клетки, причем указанный способ включает иммунизацию не являющегося человеком животного пептидом CD43, или соединением, или молекулой нуклеиновой кислоты, или функциональным эквивалентом, или вектором согласно настоящему изобретению, тем самым вызывая иммунный ответ против AML, и затем получение по меньшей мере одного AML-специфичного домена из AML-специфичного антитела или

AML-специфичной В-клетки, полученной от указанного животного, не являющегося человеком, или получение по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей указанный по меньшей мере один AML-специфичный домен, необязательно после определения того, конкурирует ли указанное AML-специфичное антитело или AML-специфичная В-клетка с антителом AT14-013 за связывание с CD43, и обеспечение Т-клетки указанным по меньшей мере одним доменом или указанной по меньшей мере одной последовательностью нуклеиновой кислоты. Также в настоящем документе предложен пептид CD43 или соединение согласно настоящему изобретению для применения в иммунотерапии, а также пептид CD43 согласно настоящему изобретению в контексте ГКГС для применения в иммунотерапии, а также молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, который кодирует пептид CD43 согласно настоящему изобретению для применения в иммунотерапии. В некоторых вариантах реализации предложен вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно изобретению, для применения в иммунотерапии. Кроме того, предложено применение пептида CD43 согласно настоящему изобретению, или применение соединения, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или применение молекулы нуклеиновой кислоты или ее функционального эквивалента, кодирующего пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или применение вектора, содержащего молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, для получения лекарственного средства против миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, в предпочтительном варианте против AML.

Также предложена иммуногенная композиция, содержащая пептид CD43 согласно настоящему изобретению и/или содержащая соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, и/или содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению, и/или содержащая вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению. Указанная иммуногенная композиция в предпочтительном варианте дополнительно содержит биосовместимую добавку, такую как, например, носитель, разбавитель, вспомогательное вещество или наполнитель. В некоторых вариантах реализации предложена вакцина, содержащая пептид CD43 согласно настоящему изобретению, необязательно в контексте ГКГС. В некоторых вариантах реализации предложена вакцина, содержащая соединение, которое содержит указанный пептид CD43 согласно настоящему изобретению, и вакцина, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению, и вакцина, содержащая вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению. В другом варианте реализации предложена композиция, содержащая пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или композиция, содержащая соединение, которое содержит пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или композиция, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению, или композиция, содержащая вектор, который содержит молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, при этом указанная композиция представляет собой фармацевтическую композицию, которая также содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В некоторых вариантах реализации для лечения миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, в предпочтительном варианте AML, применяют выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональную часть или функциональный эквивалент, конкурирующее с антителом AT14-013 за связывание с CD43. Как описано в публикации WO 2015/093949, антитело AT14-013 получали от пациента с AML с полной ремиссией, демонстрируя, что AT14-013 эффективно против AML. Кроме того, AT14-013 также нацеливается на лейкозные стволовые клетки, которые, как известно, обладают большей устойчивостью к действию терапии и зачастую ответственны за рецидив заболевания после лечения. Таким образом, антитела, которые конкурируют с AT14-013 за связывания с CD43, также будут очень эффективны против миелопролиферативных расстройств наподобие AML. Следовательно, введение таких антител пациенту с AML будет эффективно нейтрализовать и/или убивать AML-клетки. Таким образом, в некоторых вариантах реализации предложено выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для применения в качестве лекарственного средства. В некоторых вариантах реализации предложено применение выделенного рекомбинантного или очищенного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для получения лекарственного средства.

Также предложено выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональная часть или функциональный эквивалент, который конкурирует с антителом AT14-013 за связывания с CD43, для применения в способе для по меньшей мере частичного лечения или предотвращения миелодиспластического, или миелопролиферативного, или лимфопролиферативного расстройства, а также применение выделенного рекомбинантного или очищенного антитела или его функциональной части или функционального эквивалента, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, для получения лекарственного средства против миелопролиферативного или лимфопролиферативного рас-

стройства. Указанное миелопролиферативное расстройство в предпочтительном варианте включает AML. В других вариантах реализации предложена композиция, содержащая выделенное рекомбинантное или очищенное антитело или его функциональную часть или функциональный эквивалент, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывания с CD43. Указанная композиция в предпочтительном варианте представляет собой фармацевтическую композицию, которая содержит фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

Как было описано ранее в настоящем документе, в некоторых вариантах реализации предложена выделенная синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты или ее функциональный эквивалент, кодирующий пептид CD43 согласно настоящему изобретению. Такая молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент, например, является подходящим для получения пептида CD43 согласно настоящему изобретению с применением системы экспрессии нуклеиновой кислоты, такой как, например, клетки-хозяева. В некоторых вариантах реализации AML-клетки применяют в качестве клеток-хозяев. В некоторых вариантах реализации в качестве клеток-хозяев применяют THP-1 клетки. В некоторых вариантах реализации в качестве клеток-хозяев применяют клетки, выбранные из группы, состоящей из клеток Kasumi 3, HL60-клеток, клеток KG1a, SH2-клеток, клеток MonoMac6, клеток Molm13 и CML-клеток K562.

Указанная молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению также является подходящим для получения иммунного ответа. Например, молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению вводят пациенту с AML для того, чтобы индуцировать или усилить AML-специфический иммунный ответ (иммунотерапия). В некоторых вариантах реализации молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению вводят пациенту с MDS или с CML для того, чтобы задержать или предотвратить прогрессирование MDS или CML до AML (профилактические или полупрофилактические варианты применений). В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению вводят животному, не являющемуся человеком, для получения иммунного ответа против AML, после чего AML-специфичные антитела и/или AML-специфичные иммунные клетки можно собирать у указанного животного. В альтернативном варианте последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие переменные области AML-специфичных В-клеток, полученных от указанного животного, не являющегося человеком, секвенируют для получения по меньшей мере одной последовательности нуклеиновой кислоты AML-специфичного переменного домена, после чего по меньшей мере одну молекулу нуклеиновой кислоты, содержащую последовательности AML-специфичного переменного домена, вводят в клетки-продуценты для образования AML-специфичных антител.

В некоторых вариантах реализации молекула нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению содержится в носителе для доставки гена, который способствует введению указанной молекулы нуклеиновой кислоты или функционального эквивалента в представляющую интерес клетку. Таким образом, также предложен носитель для доставки гена, в предпочтительном варианте вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению. В настоящем документе также предложена клетка-хозяин, содержащая молекулу нуклеиновой кислоты или функциональный эквивалент согласно настоящему изобретению, и/или содержащая носитель или вектор для доставки гена согласно настоящему изобретению.

Хотя настоящий вариант применения может описывать признаки как часть одного и того же варианта реализации или как части отдельных вариантов реализации, в объем настоящего изобретения также входят варианты реализации, содержащие любую комбинацию всех или некоторых из описанных здесь признаков.

Настоящее изобретение дополнительно поясняется в следующих примерах. Эти примеры не ограничивают объем настоящего изобретения, а просто служат для разъяснения настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - последовательность AT14-013 (2K23-1K13), содержащая переменные последовательности тяжелой и легкой цепи и последовательности CDR антитела.

Фиг. 2 - связывание AT14-013 с клеточными линиями AML и только что выделенными первичными AML-бластами от впервые диагностированных пациентов. FAB: франко-американско-британская классификация AML (Bennett et al., 1976).

Фиг. 3 - AT14-013 связывается с клеточными линиями AML и первичными выделенными AML-клетками. Типичные примеры связывания AT14-013, полученного от пациента 101, с клеточными линиями AML Kasumi3, SH-2, Molm13 и THP-1 и с первичными лейкозными бластами, выделенными от впервые диагностированных пациентов с AML (классификация FAB M0-M5). Полученное собственными силами человеческое антитело, специфичное для гриппа, применяли в качестве отрицательного контроля (гистограммы серого цвета).

Фиг. 4 - AT14-013 также связывается с лейкозными бластами, полученными от пациентов с миелодиспластическим синдромом высокого риска (MDS/RAEB I и II) и с бластным кризом хронического миелоидного лейкоза (CML). Представлены типичные примеры; указаны идентификационные коды пациен-

тов, за исключением K562, который представляет собой клеточную линию CML. В качестве отрицательного контроля применяли полученные собственными силами человеческие антитела против гриппа (гистограммы серого цвета). * BL-060: бифенотипический лейкоз, хорошо реагирующий на лечение AML.

Фиг. 5 - AT14-013 не связывается с клетками, которые не являются миелоидными. (a) AT14-013 не связывался со здоровыми PBMC-клетками, Т-клетками (CD3⁺), В-клетками (CD19⁺), неактивированными моноцитами (CD14⁺) или первичными выделенными тимоцитами (за исключением небольшой популяции миелоидных клеток, которые присутствуют в тимусе плода), (b) AT14-013 также не связывал первичные выделенные В- или Т-ALL-клетки, клетки лимфомы или множественной миеломы. (c) AT14-013 также не связывал линии клеток карциномы толстой кишки или выделенные клетки, полученные от пациентов с карциномой толстой кишки (Colon CA) или здоровой толстой кишки, или подвздошной кишки. AT14-013 связывался с гранулоцитами (a) и линиями клеток меланомы человека (c). В качестве отрицательного контроля применяли полученные собственными силами человеческие антитела против гриппа (гистограммы серого цвета).

Фиг. 6 - CDC и ADCC. Меченые кальцеином клетки THP-1 инкубировали с AT14-013 и комплементом кроличьей сыворотки. Живые клетки идентифицировали как кальцеин⁺, даpi-клетки. При помощи авторского способа исследования, основанного на изучении цепочек гранул, количество погибших клеток впоследствии можно рассчитать как меру комплементзависимой гибели клеток (CDC). Инкубация клеток THP1 с CD33 не индуцировала CDC (левая панель). AT14-013 также может индуцировать опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC) в репортерной системе Jurkat с применением клеточной линии AML SH-2 или только что выделенных лейкозных бластов в качестве клеток-мишеней (правая панель).

Фиг. 7 - идентификация мишени AT14-013: иммунопреципитация (IP). IP с применением меченого биотина (через сортазную метку) AT14-013 лизата клеток THP1 приводила к получению полосы с массой ~140 кДа на окрашенном при помощи Imperial Coomassie геле. Полоса является специфичной, поскольку ее не видно при IP с применением AT10-002 лизата клеток THP1 или лизата клеток Jurkat. Полосу удаляли из геля, а мишень идентифицировали как CD43 методом масс-спектрометрии.

Фиг. 8 - подтверждение мишени AT14-013. Лизаты клеток THP-1 и Molm13 иммунопреципитировали с применением AT14-013 или с применением специфичного для гриппа антитела AT10-002. Иммуноблоттинг с применением мышинового антитела против CD43 (клон Mem59) подтвердил, что CD43 является мишенью для связывания AT14-013.

Фиг. 9 - AT14-013 связывается с уникальным эпитопом CD43. (a) Клетки THP-1 окрашивали при помощи коммерчески доступных CD43-специфичных антител DF-T1, 84-3C1, L10 и Mem59 и при помощи AT14-013. Все антитела связывались с мембраной клеток THP-1. (b) AT14-013 имеет другой профиль связывания по сравнению с коммерчески доступными CD43-специфичными антителами. У Kim et al. (Kim et al., 2014) суммируется связывание коммерчески доступных антител к CD43 YG5, 2C8, 8E10 и DFT-1 с различными клеточными линиями. Авторы настоящего изобретения сравнивали связывание AT14-013 с теми же клеточными линиями и обнаружили иной профиль связывания. (c) Проводили указанный эксперимент по определению конкуренции с применением AT14-013 и коммерчески доступных CD43-специфичных антител. Вкратце, клетки THP-1 инкубировали с указанными антителами при возрастающих концентрациях, после чего добавляли возможно конкурирующее антитело (называемое "конкурирующим антителом"). На связывание AT14-013 с клетками-мишенями THP-1 не влияла предварительная инкубация клеток с коммерчески доступными антителами против CD43, тогда как такие коммерчески доступные антитела против CD43 ингибировали связывание друг друга с клетками THP-1. Результаты показаны для экспериментов, в которых AT14-013 или 84-3C1 является "конкурирующим антителом", (d) Краткое описание экспериментов по определению конкуренции. AT14-013 не конкурирует с коммерчески доступными антителами против CD43 за связывание с THP-1, что свидетельствует о том, что AT14-013 связывает другой эпитоп.

Фиг. 10 - дегликозилирование клеток THP-1 с применением нейраминидазы (сиалидазы) удаляет сialовые кислоты из клеточной мембраны. "Нет" указывает на отсутствие обработки нейраминидазой и "1:20" и "1:200" указывает на разведение нейраминидазы. Антитела AT14-013, Mem59, DF-T1 и 84-3C1 теряли способность связываться с клетками THP-1 после обработки этих клеток нейраминидазой. Клон L10 не связывается с сialiрированным эпитопом CD43, поскольку обработка клеток THP-1 нейраминидазой не влияет на связывание этого антитела с его клетками-мишенями.

Фиг. 11 - укороченные варианты CD43 картируют эпитопы коммерчески доступных антител DF-T1 и MEM59. a) Иммуноблот клеток HEK293T, экспрессирующих укороченные варианты CD43, зондированных с применением антитела против CD43, направленного на внутриклеточный С-концевой хвост (сегмент) указанного белка. b) Иммуноокрашивание того же блота с применением CD43-специфичных антител MEM59 (верхняя панель) и DF-T1 (нижняя панель) выявило присутствие их эпитопа в области "С" (аминокислоты 59-82).

Фиг. 12 - иммунопреципитация укороченных вариантов CD43 из клеток THP1 идентифицирует эпитоп AT14-013. a) Иммуноблот входных лизатов отсортированных клеток THP1 с гиперэкспрессией укороченного варианта CD43, зондированных с применением антитела против Flag. Окрашивание PonsauS

демонстрирует равную загрузку образцов. Экспрессируются все мутантные белки. б) Иммуноблот с применением антитела против Flag элюированных иммунопреципитатов вариантов клеточных линий THP1 с AT14-013 обнаруживает связывание с мутантами A-F и отсутствие связывания с мутантами H-J, определяющими эпителий. с) Иммуноблот с применением антитела против CD43, связывающего его цитоплазматический хвост (Novus), показывающий эндогенный иммунопреципитированный CD43 во всех образцах, а также окрашивание укороченных вариантов.

Фиг. 13 - аминокислотная последовательность CD43 (Genbank CCDS10650.1). Указаны сигнальный пептид, эпителий AT14-013, трансмембранный домен и внутри- и внеклеточные домены.

Фиг. 14 - связывание AT14-013 с другими AML-бластами. Связывание AT14-013 с только что выделенными первичными AML-бластами (CD45dim) от впервые диагностированных пациентов. В качестве отрицательного контроля применяли полученное собственными силами человеческое антитело, специфичное для гриппа. Для коммерческих мышиных антител против CD43 в качестве контроля применяли мышиное антитело против цитомегаловируса (CMV).

ВОЗ: Swerdlow S.H. Классификация ВОЗ опухолей гематопоетических и лимфоидных тканей (2008). CD43⁺ Т-клетки и клетки миндалин применяли в качестве дополнительного контроля для анализа. AT14-013 не связывает данные здоровые клетки.

(интервал в % = -; <10%, + 10-25%, ++ 25-50%, +++ 50-75%, ++++ 75-100%).

Фиг. 15 - ADCC и CDC. а) AT14-013 (пустые квадраты) способно индуцировать опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC) в клеточной линии AML SH-2 с клетками PBMC при соотношении эффектора и мишени 50:1. Живые клетки идентифицировали как кальцеин⁺, дапи-клетки. При помощи авторского способа исследования, основанного на изучении цепочек гранул, впоследствии можно рассчитать количество погибших клеток. Инкубация клеток SH2 с AT10-002 не индуцировала ADCC (черные точки). Вычисленная концентрация EC₅₀ для AT14-013 составляла 0,16 мкг/мл. Меченые кальцеином клетки SH-2 (б) инкубировали с применением AT14-013 (пустые квадраты) или AT10-002 (черные точки) и комплементом кроличьей сыворотки. Живые клетки идентифицировали как кальцеин⁺, дапи-клетки. Инкубация клеток SH2 или AML-бластов с AT10-002 не индуцировала CDC (черные точки). Вычисленная концентрация EC₅₀ для AT14-013 составляла 1,86 мкг/мл.

Фиг. 16 - а) иммуноблот с применением антитела против Flag элюированных иммунопреципитатов вариантов клеточных линий THP1 с AT14-013 обнаруживает связывание с мутантами A-F2, связывание в меньшей степени с мутантом G и отсутствие связывания с мутантами H-J. б) Иммуноблот с применением антитела против CD43, связывающего его цитоплазматический хвост (Novus), показывающий эндогенный иммунопреципитированный CD43 во всех образцах, а также окрашивание укороченных вариантов. Данный контроль подтверждает, что иммунопреципитация была успешной для всех представленных образцов.

Фиг. 17 - а) лечение мышей с привитыми AML-клетками SH-2 приводит к ингибированию роста опухоли на 90,3%, определенном при измерении всего тела умерщвленных мышей (p<0,001, повторный дисперсионный анализ (ANOVA)). б) Количество AML-клеток, измеренное по числу фотонов в минуту (cpm), демонстрирует сильное снижение во всех измеренных органах (p=0,0011, ANOVA в двух повторях). с) Оценка числа клеток опухоли методом сортировки клеток с активированной флуоресценцией (FACS) в костном мозге и печени (p=0,0017, ANOVA в двух повторях).

Фиг. 18 - типичные примеры связывания AT14-013 с фетальными CD34⁺ гематопоетическими стволовыми клетками (ГСК), но не с фетальными CD34⁺CD38⁺ клетками-предшественниками или фетальными CD34⁺CD38⁻ зрелыми клетками. Гистограммы серого цвета: контрольное антитело AT10-002, направленное против гриппа, описанное в публикации WO 2013/081463.

Фиг. 19 - AT14-013 реагирует с аутологичными лейкозными стволовыми клетками. AML-бласты донора 101 (тот же донор, от которого получали В-клетки, продуцирующие AT14-013) окрашивали с применением AT14-013 и антителами, специфичными для CD34 и CD38, и с применением антител против CD45 (BD, номер по каталогу 348815) для того, чтобы отличить общую популяцию бластов (CD45 dim) от здоровых клеток в костном мозге, и анализировали при помощи проточной цитометрии.

Примеры

Пример 1.

Материалы и способы.

Материалы, полученные от пациентов и здоровых людей.

Протоколы исследований были одобрены Медицинским комитетом по этике Академического медицинского центра. Все участники подписали информированное согласие. Участники включали здоровых индивидуумов и пациентов с гематологическими злокачественными новообразованиями из клиники, к которой авторы настоящего изобретения имеют отношение, которые выступали донорами периферической крови и/или костного мозга.

Получение AML-специфичного клона AT14-013.

Как описано в примере 2 публикации WO 2015/093949, трансдуцированные наивные и синтезирующие IgG В-клетки памяти пациента 101 с AML, иммортализованные путем введения Bcl6 и Bcl-xL, описанные ранее (Kwakkenbos et al., Nat. Med., 2010 и пример 1 публикации WO 2015/093949), высевали

в концентрации 20 или 40 клеток на лунку (в настоящем документе далее именуемые микрокультурами) и размножали с применением IL-21 и CD40L. Затем супернатанты размноженных В-клеточных микрокультур подвергали скринингу на связывание антитела с клеточными линиями AML (среди других THP-1, MonoMac) и с линиями клеток печени и толстой кишки методом FACS с применением человеческих IgG H+L AF647 (Life Technologies) или человеческим IgG-PE (Southern Biotech) в качестве вторичного антитела. В качестве антител, представляющих собой отрицательный контроль, применяли некоторые полученные собственными силами антитела, такие как антитело против CD30 (экспрессируемого на поверхности активированных В- и Т-лимфоцитов), антитело против CD33 (экспрессируемого на поверхности моноцитов, миелоидных клеток-предшественников и лейкозных миелоидных клеток), антитело D25 (против вируса РСВ (RSV), описанного в публикации WO 2008/147196) и антитело AT10-002 (против гриппа, описанное в публикации WO 2013/081463). Микрокультуры, связывающиеся с клеточными линиями AML, но не с линиями клеток печени и толстой кишки, отбирали и высевали в концентрации 1 клетка/лунка, а их супернатанты повторно исследовали на определение специфичности для клеточных линий AML. Для секвенирования выбирали клоны с супернатантами, которые специфически связывали клеточные линии AML, но не связывали линии клеток печени или толстой кишки, или здоровые PBMC-клетки и клетки костного мозга. Клоны размножали в нормальных условиях культивирования в присутствии фетальной бычьей сыворотки (FBS) с пониженным содержанием IgG (Hyclone) и антител, очищенных от супернатантов этих культур, как это описано ниже для рекомбинантных антител. Затем рекомбинантные антитела повторно исследуют на определение специфического связывания. Одним из полученных AML-специфичных антител было антитело AT14-013. Обнаруженное антитело AT14-013 дополнительно исследовали на многих только что выделенных бластах от вновь диагностированных пациентов с AML (FAB M0-M5) для определения связывания с применением человеческого IgG H+L AF647 (Life Technologies) в качестве вторичного антитела.

Клонирование AML-специфичного антитела AT14-013.

Как описано в примере 1 публикации WO 2015/093949, для продуцирования рекомбинантного антитела авторы настоящего изобретения выделяли общую РНК при помощи мини-набора RNeasy® (Qiagen), получали кДНК, проводили ПЦР и клонировали варибельные области тяжелой и легкой цепей в вектор клонирования pCR2.1 TA (Invitrogen). Для того чтобы исключить мутации, индуцированные обратной транскриптазой или ДНК-полимеразой, авторы изобретения проводили несколько независимых экспериментов по клонированию. Для получения рекомбинантного mAb осуществляли клонирование варибельных областей тяжелых и легких цепей каждого антитела в рамку считывания при помощи константных областей человеческого IgG1 и Каппа в вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen) и временно трансфицированные 293Т клетки. Рекомбинантные антитела из супернатанта культуры очищали с применением протеина А или G в зависимости от подтипа Ig клона.

CDC и ADCC.

Для того чтобы количественно оценить комплементзависимую гибель клеток (CDC) клеток-мишеней, индуцированных AML-специфичным антителом AT14-013, авторы изобретения применяли анализ лизиса лейкозных клеток на основе FACS. Клетки THP-1 инкубировали с 2 мкМ Calcein AM (Becton Dickinson) в течение 30 мин при 37°C. Меченые кальцеином клетки THP-1 инкубировали вместе с антителами и комплементом кроличьей сыворотки в течение 4 ч при 37°C. Калибровочные микроносители для FACS (Accudrop Fluorescent Beads, BD Biosciences) добавляли к указанным клеткам в соотношении 50/50, после чего при помощи метода FACS получали стандартное количество микроносителя. Поскольку равный объем, отбираемый для анализа, устанавливали при помощи калибровочных микроносителей, количество погибших клеток рассчитывали как $100 - ((\text{Dapi-отрицательные, Calcein AM-положительные клетки при соответствующей обработке/Dapi-отрицательные, Calcein AM-положительные клетки в контроле}) \times 100)$. Для опосредованной антителами клеточной цитотоксичности (ADCC) получали систему считывания с применением клеток Jurkat, которые стабильно трансдуцировали NFAT(6x)-IL2 (минимальный промотор)-GFP и CD16A (FcR-IIIa). Активация CD16A-рецептора связанным антителом в этой системе активирует ядерный фактор активированных Т-клеток (NFAT), который индуцирует экспрессию зеленого флуоресцентного белка (GFP), который затем применяют в качестве считывателя для количественной оценки активации эффекторных клеток. AML-клетки (клетки-мишени) инкубировали с антителами и смешивали с клетками Jurkat (эффекторными клетками), которые окрашивали Calcein AM, как это описано выше. Соотношение эффектор:мишень составляло 1:1.

Идентификация и валидация мишени AT14-013.

Клетки THP-1 лизировали (смесь 0,5% Triton X114 (Sigma), 150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1,5 mM MgCl₂, дополненная ингибиторами протеазы и фосфатазы (Roche)) и предварительно очищали при помощи нерелевантного антитела (полученное собственными силами антитело D25 против RVS), гранулами протеина-G и стрептавидина (Pierce) для удаления неспецифически связывающихся белков. Предварительно очищенный лизат затем инкубировали с AML-специфичными антителами, связанными с гранулами, или со специфичным для гриппа антителом AT10-002 в качестве отрицательного контроля (3 ч при 4°C). Инкубированные с применением антител гранулы промывали пять раз в лизирующем буфере,

дополненном 0,5% дезоксихолата и 0,1% додецилсульфата натрия (ДСН), связанные белки элюировали из гранул (0,1М глицина pH 10,5, 150 мМ NaCl, 1% Triton X100, 1 мМ ЭДТА), а затем проводили электрофорез в полиакриламидном геле (ПААГ) в присутствии додецилсульфата натрия (ДСН). Для 85% полученных в результате IP-образцов проводили ДСН-ПААГ-электрофорез и окрашивали красителем Imperial Protein Strain (Pierce) для окраски общего белка и удаления специальных полос для проведения масс-спектрометрии. Для остальных IP-образцов проводили ДСН-ПААГ-электрофорез и их переносили на ПВДФ-мембрану (Bio-RAD) для иммуноблоттинга. Блот окрашивали при помощи Ponceau S для обнаружения общего белка и блокировали бычьим сывороточным альбумином (БСА), затем инкубировали с применением мышиного антитела против CD43 (клон MEM-59, Abcam) для проведения вестерн-блот-анализа.

Картирование эпитопов: конкуренция.

Клетки THP-1 предварительно инкубировали в течение 60 мин на льду с AT14-013 и коммерчески доступными антителами против CD43: мышиным антителом с PE против человеческого CD43 (Ebioscience, клон 84-3C1), мышиным антителом с FITC против человеческого CD43 (Invitrogen, клон L10) мышиным антителом с FITC против человеческого CD43 (Abcam; клон MEM-59), мышиным немеченым антителом против человеческого CD43 (Abcam; клон MEM-59), мышиным немеченым антителом против человеческого CD43 (Thermo Scientific; клон DF-T1). Максимальная концентрация блокирующих антител составляла 10 мкг/мл. Затем добавляли конкурирующее антитело с конечной концентрацией 1 мкг/мл. На этом этапе конечная концентрация указанных блокирующих антител составляет 2 мкг/мл. Клетки инкубировали в течение 30 мин на льду, после чего добавляли краситель dapi (Sigma) для исключения анализа погибших клеток. Образцы анализировали методом проточной цитометрии.

Картирование эпитопов: дегликозилирование.

Клетки THP-1 инкубировали с нейраминидазой (Roche, разведение 1:20 или 1:200) в течение 60 мин при 37°C для удаления сialовых кислот с поверхности CD43 (de Laurentiis et al., 2011). Затем клетки промывали, блокировали в 60% нормальной козьей сыворотке и инкубировали с AT14-013 и коммерчески доступными антителами против CD43 DF-T1, 84-3C1, L10 и MEM-59, как описано выше. Для того чтобы сравнить окрашивание клеток различными флюорохромами, за единицу принимали связывание с необработанными клетками (без нейраминидазы). На фиг. 10 показано кратное увеличение/уменьшение связывания с обработанными нейраминидазой клетками.

Картирование эпитопа: укороченные варианты CD43.

кДНК CD43 получали от компании Geneart (Life Technologies) и адаптировали для того, чтобы она содержала метку 3xFLAG в рамке считывания либо в С-концевой области, либо в N-концевой области (С-концевая область сигнального пептида, содержащая первые 19 аминокислот CD43). кДНК клонировали в лентивирусный вектор третьего поколения pHEF-TIG, содержащий IRES-GFP 3' кДНК CD43; в клетках HEK293T продуцировали лентивирусные частицы VSV-G. THP1, MOLM и другие клетки трансдуцировали такими вирусами в присутствии ретронекина и сортировали с применением GFP для получения чистой популяции клеток, гиперэкспрессирующих CD43. Укороченные варианты CD43 конструировали путем ПНР-клонирования кДНК CD43 с С-концевой FLAG-меткой для получения сигнального пептида (AA 1-19), за которым следует полноразмерная внеклеточная последовательность дикого типа (вариант А: S20-P400, за которой следует 3xFLAG: DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) или укороченные внеклеточные последовательности (вариант BJ). В: 31-400; С: 59-400; D: 82-400; E: 112-400; F: 133-400; G: 166-400; H: 184-400; I: 202-400; J: 220-400 (трансмембранный домен начинается с AA 255). Эти варианты экспрессировали в клетках THP1 при помощи трансдукции лентивирусом и сортировки с применением GFP. Сортированные клетки лизировали и иммунопреципитировали с применением AT14-013 и контролем, как описано выше. Для элюированных IP-образцов проводили ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг с применением антитела против FLAG-HRP (Sigma) для выявления связывания.

Результаты.

AT14-013 специфически связывается с AML-клетками.

В данном примере идентифицируют мишень для AML-специфичного антитела AT14-013, которая недавно была разработана в лаборатории, к которой авторы настоящего изобретения имеют отношение (публикация WO 2015/093949 и фиг. 1). Это антитело получено от пациента, называемого пациентом 101. У него была диагностирована AML с промежуточным риском (без цитогенетических или молекулярных аномалий, классификация FAB AML-M5) в возрасте 49 лет. Он получал два курса химиотерапии (цитарабин, идарубин, амсакрин) и один курс закрепляющей химиотерапии (бусульфид, циклофосфамид) с последующей аутологичной трансплантацией гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), поскольку отсутствовал доступный ГКГС-совместимый родственный донор стволовых клеток. Через четырнадцать месяцев после первого диагноза он перенес рецидив заболевания. Была достигнута полная ремиссия после одного цикла применения высокой дозы цитарабина, после чего он перенес аллогенную ТГСК с уменьшенной интенсивностью, полученной от неродственного донора с ГКГС-совместимостью (RIST-MUD). Через шесть недель у него развилась острая РТПХ кожи, печени и кишечника (стадия 1, класс II), которая хорошо реагировала на терапию с применением кортикостероидов. Учитывая тот факт, что этот пациент оставался здоровым в течение более 5 лет, несмотря на высокий риск его заболевания,

можно считать, что у этого пациента вырабатывалась реакция типа "трансплантат против AML", что и легло в основу выбора пациента для поиска эффективного AML-специфичного гуморального иммунного ответа. В-клетки выделяли из продукта флеботомии, полученного от данного пациента через 38 месяцев после ТГСК, иммортализовали введением Bcl6 и Bcl-xL, как описано ранее (Kwakkenbos et al., Nat. Med., 2010), и культивировали в концентрации 20 или 40 клеток/лунка. Супернатанты этих микрокультур подвергали скринингу на связывание с клеточными линиями AML и микрокультурами, специфичными для AML, субклонированными в концентрации одна клетка/лунка. Одним из антител, идентифицированных с помощью этой процедуры, является AT14-013, IgG-κ, высокосоматическое гипермутированное антитело.

AT14-013 специфически связывается с широким спектром клеточных линий AML и первичными AML-клетками, охватывая все AML по классификации FAB, как показано на фиг. 2. На фиг. 3 представлено несколько типичных примеров связывания AT14-013 с клетками Kasumi3, SH-2, Molm13 и THP-1 и первичными лейкозными бластами, выделенными от впервые диагностированных пациентов с AML. Кроме того, AT14-013 связывается с клетками других миелоидных злокачественных новообразований, такими как AML, полученных от пациентов с миелодиспластическим синдромом высокого риска (MDS/RAEB VII) или бластным кризом хронического миелоидного лейкоза (CML), и клеточной линией CML K562 (фиг. 4). AT14-013 проявлял некоторое связывание с гранулоцитами, но не связывался с здоровыми мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC), клетками костного мозга, тимоцитами, клетками гематологических злокачественных новообразований лимфатической линии или здоровыми или злокачественными клетками печени и толстой кишки. AT14-013 связывался с культивируемыми меланоцитами и клеточными линиями меланомы (фиг. 5).

AT14-013 индуцирует CDC и ADCC клеток-мишеней.

AT14-013 может индуцировать комплементзависимую цитотоксичность и опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (фиг. 6) клеточных линий AML и первичных выделенных AML-бластов.

Мишенью T14-013 является уникальный эпитоп CD43.

Далее авторы настоящего изобретения определяли мишень AT14-013. Иммунопреципитация (IP) лизата THP-1, инкубированного с меченым биотином AT14-013, содержащего сортазу в качестве метки, приводила к получению полосы с массой ~140 кДа. Полоса является специфичной, поскольку ее не видно при IP с применением AT10-002 лизата клеток THP1 или лизата клеток Jurkat (фиг. 7). Масс-спектрометрический анализ полосы иммунопреципитата обнаружил CD43 в качестве белка-мишени. Были идентифицированы три из трех ожидаемых внутриклеточных пептидов, обеспечивающих 7% охват белков, внеклеточные пептиды не были идентифицированы, поскольку являются сильно гликозилированными. Связывание CD43 антителом AT14-013 подтвердили при помощи вестерн-блот-анализа. Вкратце, лизаты клеток THP-1 и Molm13 иммунопреципитировали с применением AT14-013 или специфическим для гриппа антителом AT10-002. Вестерн-блот-анализ с применением мышиного антитела против CD43 (клон Mem59) подтвердил, что CD43 является мишенью для связывания AT14-013 (фиг. 8).

CD43 в значительной степени экспрессируется на поверхности здоровых и злокачественных клеток. CD43-специфичные антитела можно получить, и они также являются коммерчески доступными, как, например, DF-T1, 84-3C1, L10 и MEM-59. С помощью этих антител подтверждали экспрессию CD43 клетками THP-1 (фиг. 9A). Наблюдение, что AT14-013 не связывается с клетками, которые не являются миелоидными, а иной профиль связывания AT14-013 со всеми типами клеток и клеточными линиями в сравнении с другими антителами против CD43 (фиг. 9B) свидетельствует о том, что AT14-013 распознает иной CD43-эпитоп, чем другие антитела против CD43. Действительно, когда проводились эксперименты по определению конкуренции с инкубацией клеток THP-1 с коммерчески доступными антителами против CD43 и антителом AT14-013, авторы настоящего изобретения обнаружили, что эти антитела против CD43 конкурируют друг с другом за связывание с THP-1, но не с AT14-013 (фиг. 9C и 9D). Следует отметить, что CD43-клоны L10 и 84-3C1 были описаны как конкурирующие друг с другом (L. Borche et al., 2005); это же подтверждалось в эксперименте авторов изобретения.

Белок CD43 представляет собой высокогликозилированный белок (de Laurentiis et al., 2011). Антитела против CD43 Mem59, DF-T1 и 84-3C1 (но не L10) связываются с сиалилированным эпитопом, так как после предварительной обработки клеток-мишеней нейраминидазой, которая удаляет все α-N-ацетилнейраминовые кислоты (сиаловые кислоты), у этих антител теряется способность связывания с CD43 (патент США № 2010/0234562 A1). На фиг. 10 показано, что способность AT14-013 связываться с клетками THP-1 также теряется при предварительной инкубации клеток THP-1 с нейраминидазой, что свидетельствует о том, что AT14-013 специфически связывается с сиалилированным эпитопом CD43.

Для более точной идентификации связывающего эпитопа AT14-013 авторы настоящего изобретения получили 10 внеклеточных укороченных вариантов CD43 с Flag-меткой, которые экспрессировали в клетках HEK и THP1. Вестерн-блот-анализ лизатов этих клеток, инкубированных с Mem59 или DF-T1, подтвердил связывание данных антител с аналогичным эпитопом, расположенным между аминокислотами 59-82 (фиг. 11A, B). Исследовали связывание AT14-013 при помощи иммунопреципитации клеток

THP1, трансдуцированных этими укороченными вариантами. AT14-013 сильно взаимодействует с вариантами A-F, в меньшей степени с вариантом G и не взаимодействует с вариантами H-J, как показано в иммуноблоте IP с применением антитела против Flag (фиг. 12A, B). На фиг. 12C подтверждается IP AT14-013 с применением антитела против С-концевой области CD43. Во всех образцах присутствовал эндогенный CD43, тогда как в них находился только укороченный CD43, присутствующий вплоть до варианта G. Таким образом, авторы изобретения пришли к заключению, что эпитоп AT14-013 находится между аминокислотами 133 и 184.

Пример 2. Связывание с AML-бластами.

Материалы и способы.

Связывание антитела AT14-013 с различными клетками исследовали с применением методики, описанной в примере 1 под заголовком "Получение AML-специфичного клона AT14-013". Перед анализом полученные от пациентов образцы окрашивали с применением антитела против человеческого CD45 (BD). AML-клетки определяли как CD45dim. Здоровые PBMC-клетки окрашивали при помощи антитела против человеческого CD3 (biolegend). Полиморфные ядерные клетки, полученные из миндалин, выделяли при помощи градиента плотности фиколла.

Результаты.

AT14-013 специфически связывается с широким спектром клеточных линий AML и первичными AML-клетками, охватывая все AML по классификации FAB, как показано в примере 1 и на фиг. 4. Кроме того, исследовали антитело на более широкой панели AML-бластов. Было показано, что оно связывается со всеми AML-бластами, исследованными до этого времени, и зачастую лучше, чем коммерческие антитела против CD43. Интересно, что независимое от сиаловой кислоты антитело L10 связывалось по меньшей мере почти во всех образцах. Кроме того, антитела исследовали на здоровых, экспрессирующих CD43 Т-клетках и клетках, полученных из миндалин. В данном случае окрашивание наблюдали только у коммерческих антител. Обобщенные результаты представлены на фиг. 14.

Пример 3. ADCC и CDC.

В дополнение к примеру 1 и фиг. 6 был выполнен другой эксперимент на определение ADCC и CDC.

Материалы и способы.

Для количественной оценки опосредованной антителами клеточной цитотоксичности (ADCC) и комплементзависимой клеточноопосредованной цитотоксичности (CDC) клеток-мишеней, индуцированных AML-специфичным антителом AT14-013, авторы изобретения применяли анализ лизиса лейкозных клеток на основе FACS. SH2-клетки инкубировали с 10 нМ Calcein AM (Becton Dickinson) в течение 30 мин при 37°C. Меченные кальцеином клетки затем инкубировали вместе с антителами и здоровыми мононуклеарными клетками периферической крови (PBMC, соотношение эффектор:мишень 50:1) в течение 4 ч или комплементом кроличьей сывороткой в течение 1 ч при 37°C. Калибровочные микроносители для FACS (Accudrop Fluorescent Beads, BD Biosciences) добавляли к указанным клеткам в соотношении 50/50, после чего при помощи метода FACS получили стандартное количество микроносителя. Поскольку равный объем, отбираемый для анализа, устанавливали при помощи калибровочных микроносителей, количество погибших клеток рассчитывали как: $100 - ((\text{Dapi-отрицательные, Calcein AM-положительные клетки при соответствующей обработке/Dapi-отрицательные, Calcein AM-положительные клетки в контроле}) \times 100)$.

Результаты.

AT14-013 индуцирует CDC и ADCC клеток-мишеней.

AT14-013 может индуцировать опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (фиг. 15A) и индуцировать комплементзависимую цитотоксичность (фиг. 15B) клеточных линий AML и первичных выделенных AML-бластов.

Пример 4. Картирование эпитопа: укороченные варианты CD43.

В дополнение к примеру 1 и фиг. 12 дополнительно исследовали связывающий эпитоп AT14-013.

Материалы и способы.

Применяли способы, аналогичные примеру 1. кДНК CD43 получали от компании Geneart (Life Technologies) и адаптировали для того, чтобы она содержала метку 3xFLAG в рамке считывания либо в С-концевой области, либо в N-концевой области (С-концевая область сигнального пептида, содержащая первые 19 аминокислот CD43). кДНК клонировали в лентивирусный вектор третьего поколения рHEF-TIG, содержащий IRES-GFP 3' кДНК CD43; в клетках HEK293T продуцировали лентивирусные частицы VSV-G. THP1, MOLM и другие клетки трансдуцировали такими вирусами в присутствии ретронекина и сортировали с применением GFP для получения чистой популяции CD43-трансдуцированных клеток. Укороченные варианты CD43 конструировали путем ПЦР-клонирования к ДНК CD43 с С-концевой FLAG-меткой для получения сигнального пептида (AA 1-19), за которым следует полноразмерная внеклеточная последовательность дикого типа (вариант A: S20-P400, за которой следует 3xFLAG: DYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK) или укороченные внеклеточные последовательности (вариант BJ). B: 31-400; C: 59-400; D: 82-400; E: 112-400; F: 133-400; F2: 148-400; G: 166-400; H: 184-400; I: 202-400; J: 220-400 (трансмембранный домен начинается с AA 255). Эти варианты экспрессировали в клетках THP1

при помощи трансдукции лентивирусом и сортировки с применением GFP. Сортированные клетки лизировали и иммунопреципитировали с применением AT14-013 и контролем, как описано выше. Для элюированных IP-образцов проводили ДСН-ПААГ-электрофорез и иммуноблоттинг с применением антитела против FLAG-HRP (Sigma) для выявления связывания.

Результаты.

Мишенью T14-013 является уникальный эпитоп CD43.

Для более точной идентификации связывающего эпитопа AT14-013, авторы настоящего изобретения получили 11 внеклеточных укороченных вариантов CD43 с Flag-меткой, которые экспрессировали в клетках THP1. Исследовали связывание AT14-013 при помощи иммунопреципитации клеток THP1, трансдуцированных этими укороченными вариантами. AT14-013 сильно взаимодействует с вариантами A-F, в меньшей степени с вариантом F2, в меньшей степени с вариантом G и не взаимодействует с вариантами H-J, как показано в иммуноблоте IP с применением антитела против Flag (фиг. 16A+B). На фиг. 16B подтверждается IP AT14-013 с применением антитела против C-концевой области CD43. Во всех образцах присутствовал эндогенный CD43, тогда как в них находился только укороченный CD43, присутствующий вплоть до варианта F2. Таким образом, авторы настоящего изобретения пришли к заключению, что эпитоп AT14-013 содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который находится между аминокислотами 133 и 165. Ввиду того, что AT14-013 в меньшей степени взаимодействует с вариантом F2 (начиная с аминокислоты в положении 148, как показано на фиг. 13), авторы изобретения также пришли к выводу, что эпитоп AT14-013 по меньшей мере содержит по меньшей мере один аминокислотный остаток, который находится между аминокислотами 133 и 147.

Пример 5. AT14-013 ингибирует рост AML *in vivo*.

Известные экспериментальные протоколы, например, описаны у Miller et al., Blood (2013), т. 121, № 5, e1-e4.

Для того чтобы оценить эффективность AT14-013 против AML *in vivo*, лечили иммунодефицитных мышей с восстановленными гемопоэтическими клетками человека и привитыми SH-2-клетками. Шесть самок NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wj/SzJ} (NSG, The Jackson Laboratory) гуманизировали при помощи инъекции 50000 CD34⁺CD38⁺ гемопоэтических стволовых клеток в печень новорожденных мышей (1-5 дней), облученных сублетальными дозами. Через 8 недель мышам пускали кровь для оценки приживления гемопоэтических клеток человека в их крови. В этом эксперименте применяли только химерных мышей, у которых количество человеческих клеток в периферической крови составляло более 20%. Пять из 6 мышей соответствовали этому критерию, и им в начальный день (день 0) внутривенно инокулировали SH-2-клетки в количестве 10×10^6 , экспрессирующие люциферазу и GFP. На 14 день мышам внутрибрюшинно проводили инъекцию люциферина (150 мг/кг) и приживление опухоли оценивали при помощи определения биolumинесценции *in vivo*. Основываясь на этом измерении, мышей рандомизировали по 2 группам и затем два раза в неделю им внутривенно вводили дозы AT14-013 или антитела AT10-002 (против гриппа, описанного в публикации WO 2013/081463, в качестве контроля) (375 мкг). Биolumинесценцию измеряли каждую неделю, как описано выше. На 39 день мышей умерщвляли путем цервикальной дислокации в условиях глубокой анестезии, а органы извлекали и количественно определяли биolumинесценцию. Одноклеточную суспензию получали для печени и костного мозга, а присутствия GFP⁺ SH-2-клеток количественно определяли методом FACS. Лечение мышей с привитыми AML-клетками SH-2 приводит к ингибированию роста опухоли на 90,3%, определенном при измерении всего тела умерщвленных мышей ($p < 0,001$, повторный дисперсионный анализ (ANOVA), (фиг. 17A). Количество AML-клеток, измеренное по числу фотонов в минуту (cpm), демонстрирует сильное снижение во всех измеренных органах ($p = 0,0011$, ANOVA в двух повторах, фиг. 17B). Данное наблюдение подтверждается оценкой числа клеток опухоли при помощи метода FACS в костном мозге и печени ($p = 0,0017$, ANOVA в двух повторах, фиг. 17C). Следовательно, антитело является специфичным для пептида CD43 согласно настоящему изобретению и является особенно подходящим для лечения *in vivo* или предотвращения миелопролиферативного или лимфопролиферативного расстройства, такого как AML.

Пример 6.

Материалы и способы.

Печень, костный мозг и тимусную ткань плода в возрасте от 16 до 21 недели беременности получали от мышей из вивария с иммунной системой человека (HIS) в AMC (в соответствии с законом Нидерландов: Wet Foetaal Weefsel). Обогащенные CD34 суспензии мононуклеарных клеток из тканей получали путем разрушения целых органов при помощи оборудования Stomacher с последующим центрифугированием в градиенте плотности и разделением магнитных микроносителей. Обогащенную CD34 клеточную суспензию костного мозга плода получали центрифугированием в градиенте плотности и разделением магнитных микроносителей.

Связывание антитела AT14-013 с клетками, полученными из печени плода, тимуса плода и костного мозга плода исследовали методом проточной цитометрии с применением коммерчески доступных антител против CD34 (BD, номер по каталогу 343516) и CD38 (BD, номер по каталогу 303522), чтобы отличить различные подмножества в данных образцах.

Результаты.

AT14-013 специфически связывается с онкофетальным эпитопом CD43.

Как было описано выше в настоящем документе, AT14-013 представляет собой CD43-специфичное антитело, которое распознает уникальный онкосиалилированный опухолевый антиген, который экспрессируется преимущественно AML- и MDS-бластами. Опухолевые антигены представляют собой либо аномальные белки с опухолеспецифической экспрессией, либо aberrантно экспрессированные нормальные белки, как, например, онкофетальные антигены, которые являются антигенами, которые обычно экспрессируются только во время онтогенеза тканями плода. Неопластическую трансформацию клеток часто ассоциируют с экспрессией онкофетальных антигенов. Авторы настоящего изобретения обнаружили, что AT14-013-эпитоп CD43 экспрессировали CD34⁺CD38⁻ гематопозитические стволовые клетки, полученные из печени плода и костного мозга плода, но его не экспрессировали CD34⁺CD38⁺ клетки-предшественники или CD34⁺CD38⁻ зрелые клетки, полученные из печени плода и костного мозга плода (фиг. 18). Эти результаты показывают, что AT14-013 способно связываться с онкофетально-сиалилированным эпитопом CD43, который во взрослом организме в значительной степени экспрессируется AML- и MDS-клетками.

Пример 7. AML-бласты от донора 101 (тот же донор, от которого получали В-клетки, продуцирующие AT14-013) окрашивали с применением AT14-013 и антител, специфичных для CD34 и CD38 (процедура, аналогичная примеру 6), и антитела против CD45 (BD, номер по каталогу 348815), чтобы отличить общую популяцию бластов (CD45 dim) от здоровых клеток в костном мозге, и анализировали методом проточной цитометрии (фиг. 19). Это показывает, что AT14-013 связывает лейкозные бласты указанного пациента, в котором его обнаруживали. AT14-013 связывает CD34⁺CD38⁻бласты, которые содержат лейкозные стволовые клетки.

В связи с этим делается вывод, что антитело AT14-013 вступает в реакцию с аутологичными лейкозными стволовыми клетками, что делает AT14-013 особенно подходящим для лечения или предотвращения миелопролиферативных или лимфопролиферативных расстройств, поскольку оно также нацеливается на лейкозные стволовые клетки, которые, как известно, обладают большей устойчивостью к действию терапии и зачастую ответственны за рецидив заболевания после лечения.

Из этого следует, что другое антитело, специфичное для пептида CD43 согласно настоящему изобретению, такое как антитело, которое конкурирует с антителом AT14-013 за связывание с CD43, также является особенно подходящим для лечения или предотвращения миелопролиферативных или лимфопролиферативных расстройств.

Ссылки.

Bennett, J.M. и др., 1976. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, 33(4), pp.451–458.

Borche, L. и др., 2005. CD43 monoclonal antibodies recognize the large sialoglycoprotein of human leukocytes. *European Journal of Immunology*, 17(10), pp 1523-1526

Европейский патент № 1974017

Hanly и др. Review of polyclonal antibody production procedures in mammals and poultry. *ILAR Journal* (1995); Vol.37, № 3: 93-118

Международная заявка на патент № WO 2015/093949

Международная заявка на патент № WO 2006/121240

Международная заявка на патент № WO 2007/146172

Kim и др. Characterization of two novel mAbs recognizing different epitopes on CD43. *Immune Network* (2014). Vol. 14, № 3: 164-170

Kwakkenbos M.J. и др. Generation of stable monoclonal antibody-producing B cell receptor-positive human memory B cells by genetic programming. *Nat. Med.* 2010. 16(1):123-8.

de Laurentiis, A. и др., 2011. Mass Spectrometry-Based Identification Of The Tumor Antigen UN1 as the Transmembrane CD43 Sialoglycoprotein. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(5), pp.M111.007898–M111.007898

Malcovati, L. и др., 2013. Diagnosis and treatment of primary myelodysplastic syndromes in adults: recommendations from the European Leukemia Net. *Blood*, 122(17), pp.2943–2964

Miller и др., *Blood* (2013), Vol.121, № 5, e1-e4

Schmid K, Hediger M.A., Brossmer R, и др. Amino acid sequence of human plasma galactoglycoprotein: identity with the extracellular region of CD43 (sialophorin). *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1992;89(2):663–667

Shelley и др. Molecular characterization of sialophorin (CD43), the lymphocyte surface sialoglycoprotein defective in Wiskott-Aldrich syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1989; Vol. 86: 2819-2823

Swerdlow S.H. WHO classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, 2008. ISBN: 978-92-832-2431-0

Tuccillo и др. Cancer-associated CD43 glycoforms as target of immunotherapy. *Mol. Cancer ther.* (2014a) 13(3): 752-762

Tuccillo и др. Aberrant glycosylation as biomarker for cancer: focus on CD43. *BioMed research International* (2014b) Article ID 742831, 13 pages. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/742831>

Патент США № 9005974

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенный рекомбинантный или очищенный пептид CD43 длиной не более 100 аминокислотных остатков для обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента, которые специфичны к клетке миелопролиферативного или лимфопролиферативного нарушения, причем указанный пептид содержит аминокислотную последовательность GTITNSPETSSRTSGAPVTTAASSLETSGTS, и при этом указанный пептид имеет опухолеспецифичный профиль сиалилирования.

2. Комплекс ГКГС, содержащий пептид CD43 по п.1.

3. Выделенная синтетическая или рекомбинантная молекула нуклеиновой кислоты, которая кодирует пептид CD43 по п.1.

4. Применение пептида CD43 по п.1 для продуцирования, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента.

5. Применение комплекса ГКГС по п.2 для продуцирования, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента.

6. Применение молекулы нуклеиновой кислоты по п.3 для продуцирования, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента.

7. Применение по любому из пп.4-6 для индуцирования, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента, которые могут специфически связывать миелопролиферативные или лимфопролиферативные клетки.

8. Применение по п.7, отличающееся тем, что указанные миелопролиферативные клетки представляют собой клетки острого миелоидного лейкоза (AML), или клетки миелодиспластического синдрома (MDS), или клетки хронического миелоидного лейкоза (CML).

9. Применение по любому из пп.4-8, отличающееся тем, что указанное антитело обладает активностью, индуцирующей опосредованную антителами клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или комплементзависимую цитотоксичность (CDC).

10. Выделенное рекомбинантное или очищенное антитело, или его функциональная часть, или его функциональный эквивалент, которые конкурируют с антителом AT14-013 за связывание с CD43.

11. Диагностический набор для обнаружения иммунной клетки и/или антитела, при этом указанный диагностический набор содержит пептид CD43 по п.1 и средства для обнаружения антитела или иммун-

ной клетки.

12. Применение пептида CD43 по п.1 для диагностики AML, MDS или CML.

13. Способ для определения наличия у индивидуума AML, причем указанный способ включает приведение пептида CD43 по п.1 в контакт с антителами и/или иммунными клетками указанного индивидуума и определение связывания указанного пептида CD43 по меньшей мере одним из указанных антител и/или иммунных клеток указанного индивидуума.

14. Способ продуцирования иммунной клетки и/или антитела, которые могут специфически связывать лимфопротеративные клетки и/или миелопротеративные клетки, предпочтительно AML-специфичной иммунной клетки или AML-специфичного антитела, причем указанный способ включает иммунизацию животного, не являющегося человеком, пептидом CD43 по п.1.

15. Способ по п.14, дополнительно включающий получение от указанного животного, не являющегося человеком, иммунной клетки и/или антитела, которые могут специфически связывать лимфопротеративные клетки и/или миелопротеративные клетки, предпочтительно AML-специфичной иммунной клетки или AML-специфичного антитела.

16. Антитело, которое получено при помощи способа по любому из пп.14, 15.

17. Иммунная клетка, которая получена при помощи способа по любому из пп.14, 15.

18. Носитель для доставки гена для продуцирования, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента, при этом указанный носитель для доставки гена содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.3.

19. Клетка-хозяин для продуцирования, связывания, обнаружения и/или получения иммунной клетки и/или антитела, или его функциональной части, или его функционального эквивалента, при этом указанная клетка-хозяин содержит молекулу нуклеиновой кислоты по п.3.

AT14-013 (2K23-1K13)

Тяжелая цепь

Рекомбинированный из генных сегментов:

IGHV4-4*02 F

IGHD6-19*01 F

IGHJ5*02 F

Аминокислота:

Fw1 QGRLQESGPGGLVKPSETLTLCVSGGSSVS

CDR1 SPNWWT

Fw2 WVRQAPGKGLEWIG

CDR2 EIYYGGRVSYNSALRS

Fw3 RVTISSDRSKEEFSLKLRVTAADTAIYYC

CDR3 AGQKNIGCGYSSCFISWFDT

Fw4 WGQGIATVSS

Нуклеотид:

Fw1 cag ggg cga ctg cag gag tcg ggc cca gga ctg gtc aag cct tcg gag acc ctg acc ctc acg tgc gct gtc
tcc ggt ggc tcc tcc gtc agc

CDR1 agt cct aac tgg tgg act

Fw2 tgg gtc cgc cag gcc ccc ggg aag ggg ctg gag tgg att gga

CDR2 gaa atc tat tat ggt ggg aga gtc agc tac aac tcg gcc ctc agg agt

Fw3 cga gtc acc att tca tca gac agg tcc aaa gag gag ttc tcc ctg aaa ctg agg tct gtc acc gcc gcg gac
acg gcc ata tat tat tgt

CDR3 gcg ggt caa aaa aat att ggc tgt ggt tac agc agt tgc ttt atc agt tgg ttc gac acc

Fw4 tgg gga cag gga att gcg gtc acc gtc tcc tca

Легкая цепь

Рекомбинированный из генных сегментов:

IGKV4-1*01 F

IGKJ2*01 F

Аминокислота:

Fw1 DIVMTQSPDSLAVSLGERATIAC

CDR1 KSSQTLQRSNHLNYLA

Fw2 WYQQKPGQPPKVLIIY

CDR2 WASTRES

Fw3 GVPDRFSGSGSGTDFTLTINSLQAEDVAVYYC

CDR3 HQYYTTPQT

Fw4 FGQGTKVEIK

Нуклеотид:

Fw1 gac atc gtg atg acc cag tct cca gac tcc ctg gct gtg tct ctg ggc gag agg gcc acc atc gcc tgc

CDR1 aag tcc agc cag act att tta caa agg tcc aac cat ttg aac tac tta gct

Fw2 tgg tac cag cag aaa cca gga cag cct cct aaa gtg ctc att tat

CDR2 tgg gca tct acc cgg gaa tcc

Fw3 ggg gtc cct gac cga ttc agt ggc agc ggg tct ggg aca gat ttc act ctc acc atc aac agc ctg cag
gct gag gat gtg gca gtt tat tac tgt

CDR3 cac caa tat tat act act ccg cag act

Fw4 ttt ggc cag ggg acc aag gtg gag atc aaa

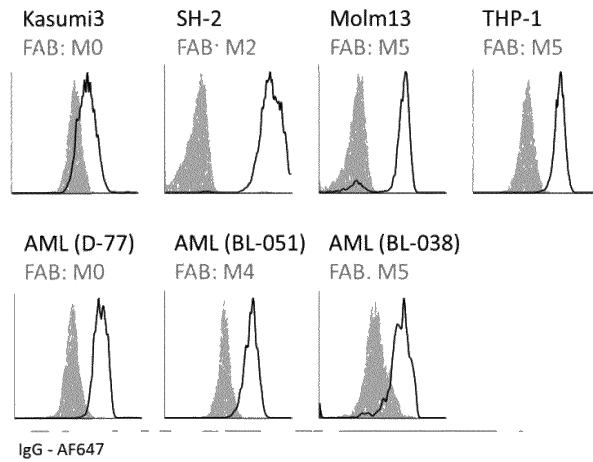
Фиг. 1

AML	Связывание
Kasumi 3	+
HL60	++
THP-1	++
KG1a	++
SH2	++
MonoMac6	++
Molm13	++
CML K562	++

Первичные выделенные AML-бласты

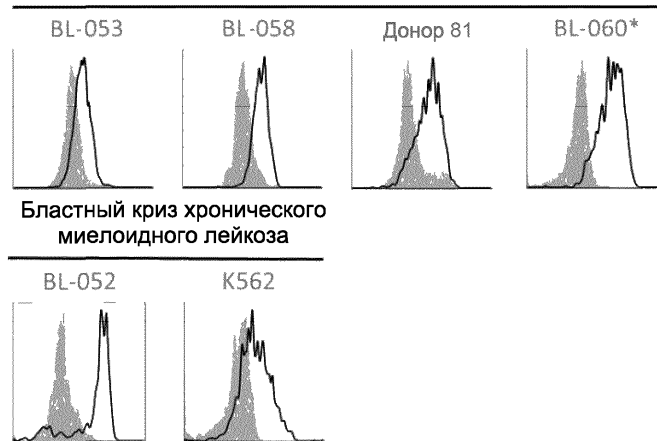
Пациент 77: AML FAB: M0	++
BL-052: AML FAB: M1, из CML	++
BL-038: AML FAB: M4	++
BL-046: AML FAB: M4	++
BL-051: AML FAB: M4	++
BL-053: AML FAB M5, из MDS	++
BL-058: AML из MDS	++
Пациент 81: AML из MDS	++
BL-060: бифенотипический AML	++

Фиг. 2



Фиг. 3

Миелодиспластический синдром с рефрактерной
анемией с избытком бластов типа I
Клетки острого миелоидного лейкоза, полученные от
пациента с миелодиспластическим синдромом

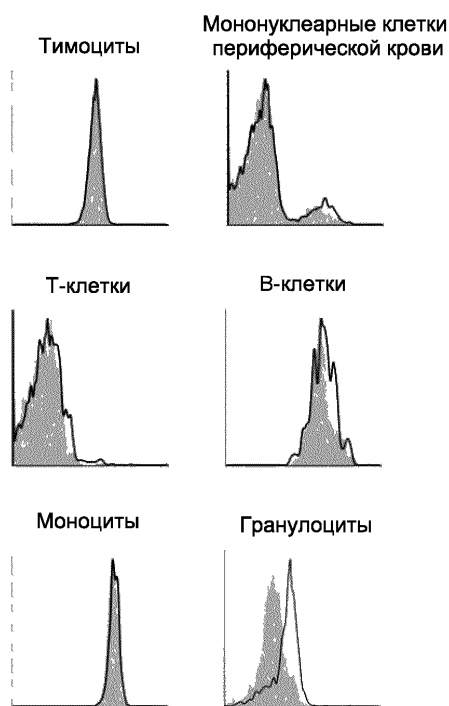


Бластный криз хронического
миелоидного лейкоза

*BL-060: бифенотипический лейкоз, хорошо реагирующий на лечение AML

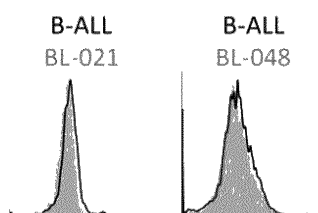
Фиг. 4

Тимус	Связывание
Тимоциты	--
CD11b+/CD11c+/CD14+ клетки	+
Мононуклеарн. клетки периферич. крови	
Моноциты	+/-
Гранулоциты	+
Т-клетки (активир. и неактивир.)	--
В-клетки (активир. и неактивир.)	--
Трансдуцированные В-клетки	--
Миндалины	
В-клетки	--
Т-клетки	--
CD11b+/CD11c+/CD14+ клетки	+



Фиг. 5А

В-клеточные лимфомы	Связывание
OCI Ly7 (DLBCL)	--
Ramos (Лимфома Буркита)	--
Первичн. выделен. клетки В-клеточн. лейкозов	
BL-019: B-ALL	--
BL-021: Pre B-ALL	--
BL-048: Pre B-ALL	--
Т-клеточные лейкозы	
Jurkat	--
Первичн. выделен. клетки Т-клеточн. лейкозов	
T ALL, BL-040	--
Множественной миеломы	
MM1.s	--
RPMI8226	--
U266	--



Фиг. 5В

Клеточн. линии клеток толстой кишки Связывание

CaCo2	--
HT29	--
LSTR (LST174)	--
DLD1	--
Colo205	--

Первичн. клетки желуд.-кишечн. тракта

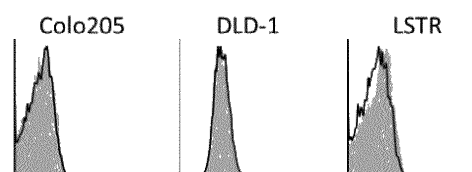
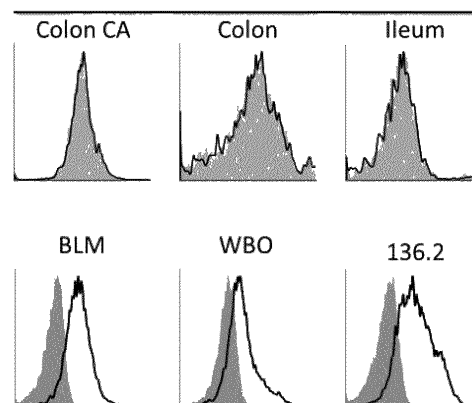
Клетки толст. кишки (здор. кл./кл. карциномы)	--
Клетки подвздошной кишки	--

Меланома

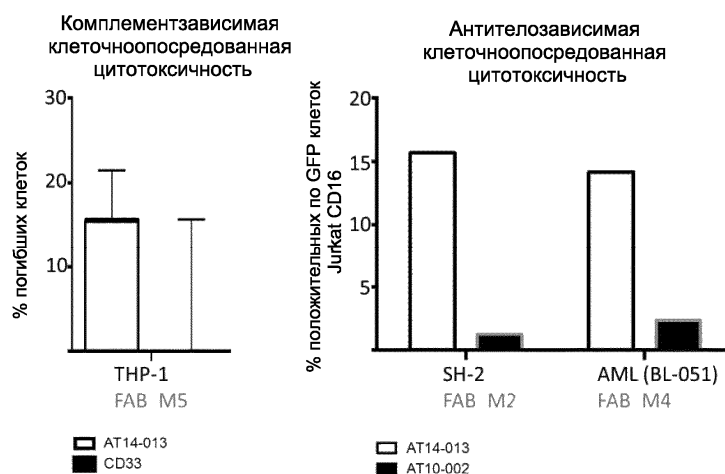
BLM	+
WBO	+
136.2	++

Первичные клетки кожи

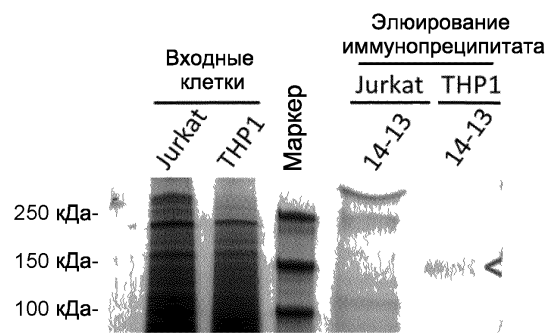
Меланоциты (культивиров.)	+
---------------------------	---

**Первичные выделенные клетки**

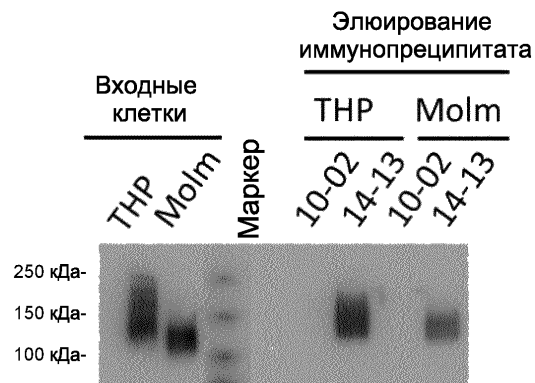
Фиг. 5С



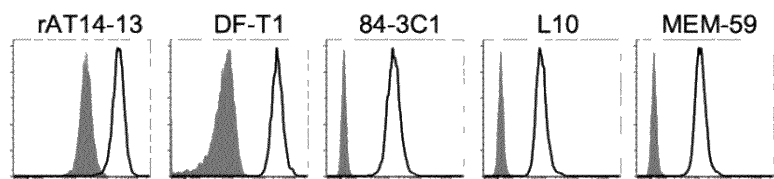
Фиг. 6



Фиг. 7



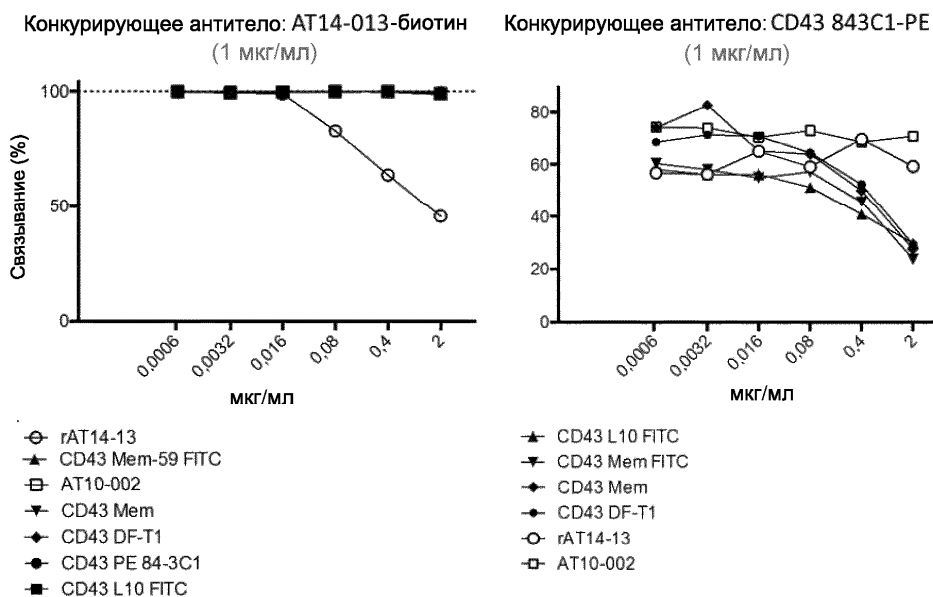
Фиг. 8



Фиг. 9А

Клеточные линии	AT14-013	YG5	2C8	8E10	DFT-1
Jurkat	-	++++	++++	++	++++
Ramos	-	+	-	-	+++
HL60	++++	+++	+	+	++++
Kasumi	++	-	+++	+++	++++
K562	++++	-	++++	++++	++++
THP-1	++++	++	+++	+++	++++
KG1	+	-	++	++	++++
Здоровый костный мозг	-	+	-	++	++++
PBL	-	-	++++	++++	++++

Фиг. 9В

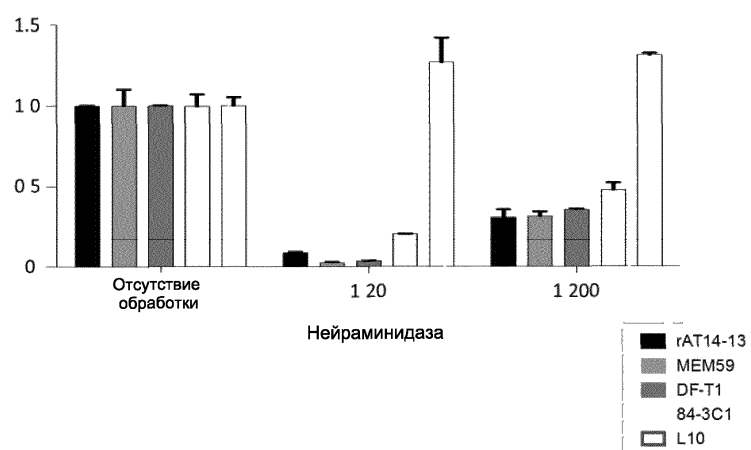


Фиг. 9С

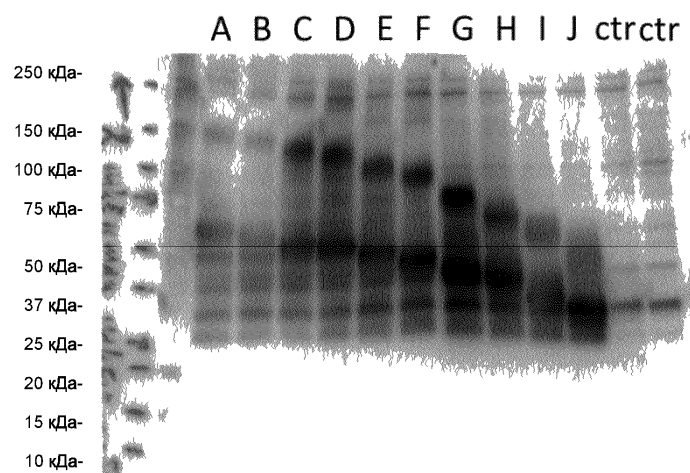
	rAT14-13 биотин	rAT10-002 биотин	84-3C1- PE	L10- FITC	MEM59- FITC	DF-T1 xxx
84-3C1- PE	-	-	ND	+	+	ND
L10- FITC	-	-	+	ND	ND	ND
MEM59- FITC	-	-	+	ND	ND	ND
DF-T1 xxx	-	-	+	+	+	ND
rAT14-13 биотин	+	-	-	-	-	-
rAT10-002 биотин	-	-	-	-	-	-

+ = связывается
 - = не связывается
 ND = не определено

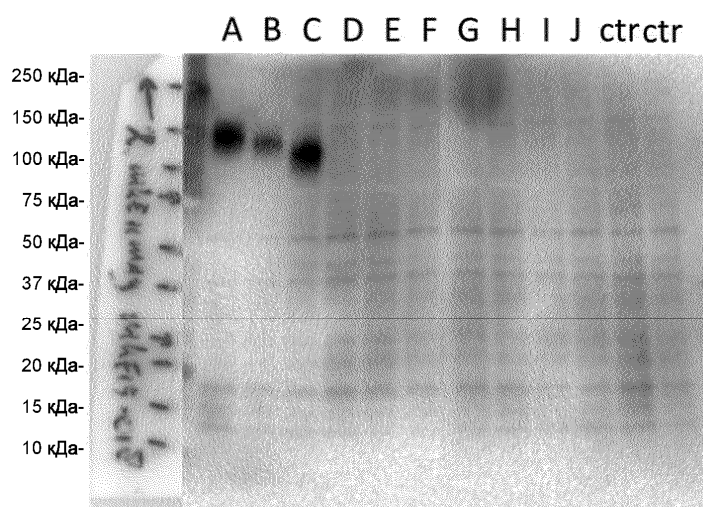
Фиг. 9D



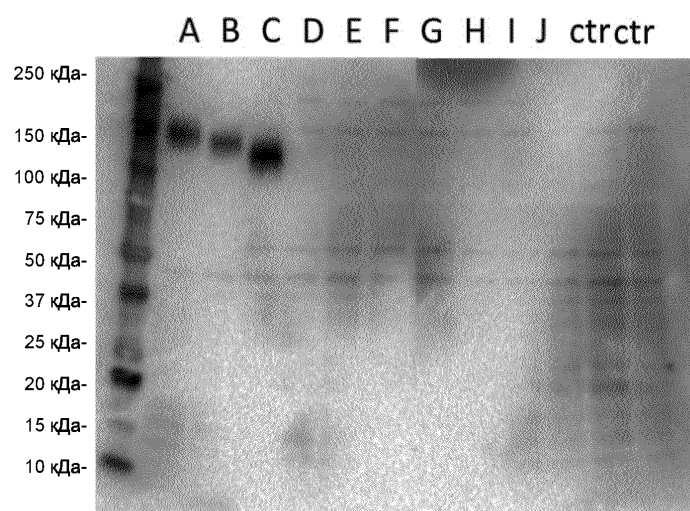
Фиг. 10



Фиг. 11А

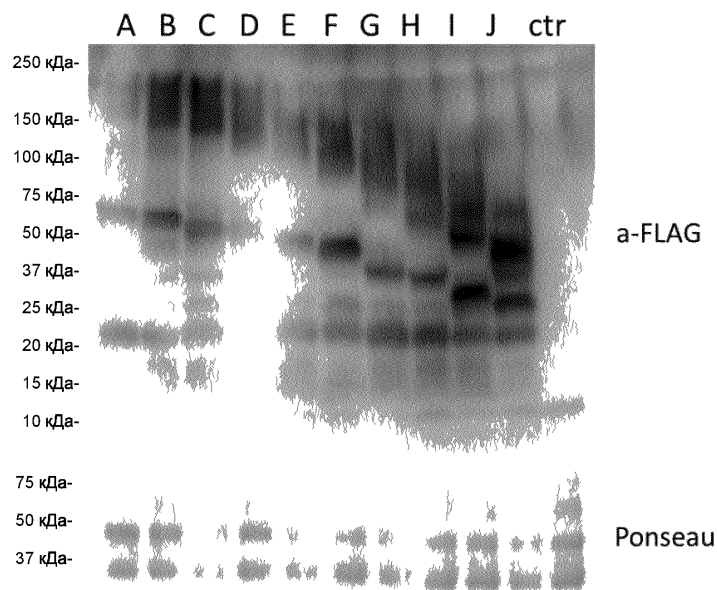


aCD43 Mem59

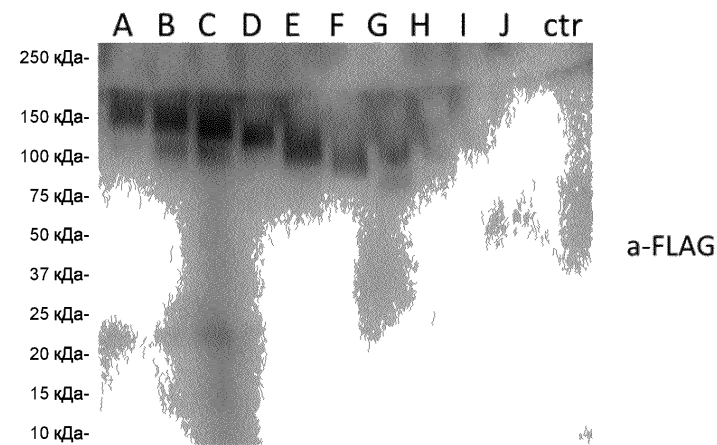


aCD43 DF-T1

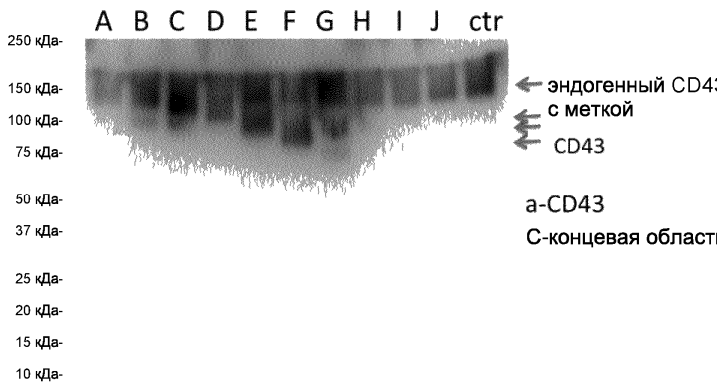
Фиг. 11В



Фиг. 12А

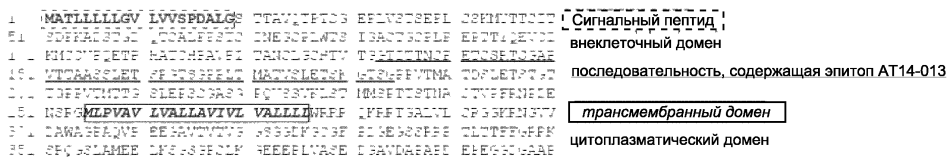


Фиг. 12В



Фиг. 12С

CD43 (база данных Genbank CCDS10650.1)



Фиг. 13

AML с хроническими генетическими аномалиями

Полученные от пациентов бласты	AT14-013	CD43 Mem-59	CD43 L10	CD43 DFT1
BL-068	+++	+++	+++	+++
BL-010	+++	+++	-	+++
BL-025	++++	++++	-	++++
BL-060	++++	+++	-	+++
BL-061	+++	++	-	++
BL-039	+++	+++	+	+++
BL-051	++++	+++	+	+++
BL-031	+++	+++	+	+++
BL-059	++++	+++	++	+++
BL-043	+++	++	+	++
BL-045	+++	++	++	++
BL-057	+++	+++	-	++
BL-037	+++	++	+	++

AML со связанными с миелодисплазией изменениями

	AT14-013	CD43 Mem-59	CD43 L10	CD43 DFT1
BL-014	+++	+++	+	++
BL-055	++	++	-	++
BL-052	++++	++	++	++
BL-054	+++	++	+	+++

Миелоидные новообразования, связанные с действием терапии

	AT14-013	CD43 Mem-59	CD43 L10	CD43 DFT1
BL-047	+++	+++	+	+++
BL-028	++	-	-	+

Острый миелоидный лейкоз, если не указано иное

	AT14-013	CD43 Mem-59	CD43 L10	CD43 DFT1
Донор 80	++++	++++	-	+++
Донор 86	++++	++++	+++	+++
BL-007	++++	++++	-	++++
BL-030	++++	+++	-	+++
Донор 77	++++	+++	+	+++
Донор 87	++++	++	+	++
BL-009	++++	+++	+	+++
BL-046	+++	++	-	++
BL-053	+++	+++	-	+++

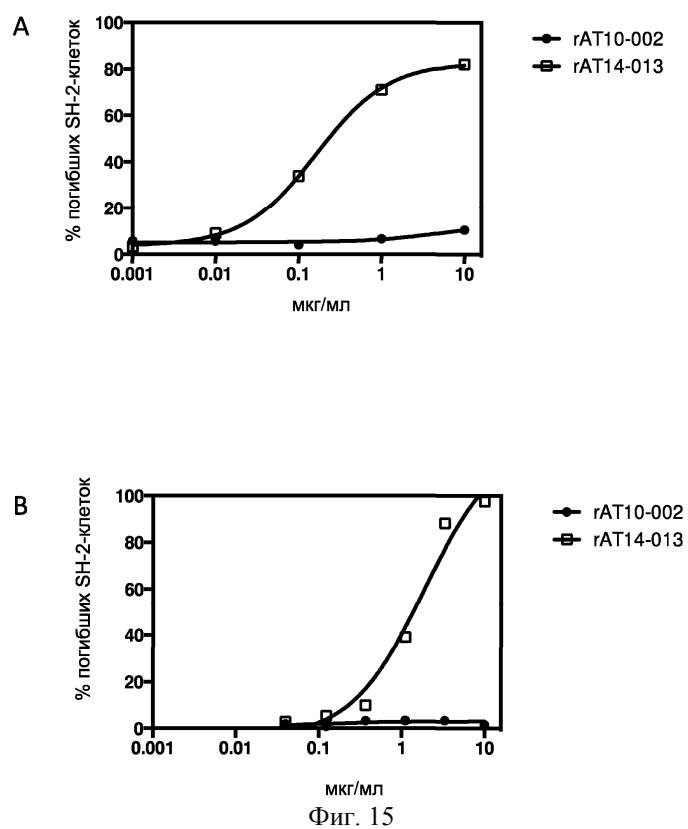
Миелодиспластические синдромы

	AT14-013	CD43 Mem-59	CD43 L10	CD43 DFT1
BL-011	+++	+++	-	+++
BL-022	+++	++	++	+++
BL-062	+++	++	-	+++
BL-032	++	+++	-	++
BL-033	+++	+++	-	++
BL-058	++	-	-	++
Донор 81	+++	+++	-	+++
BL-042	++	+++	++	+++

Здоровые клетки

	AT14-013	CD43 Mem-59	CD43 L10	CD43 DFT1
CD43 + Т-клетки	-	+++	++	+++
Миндалины	-	+++	+	+++

Фиг. 14



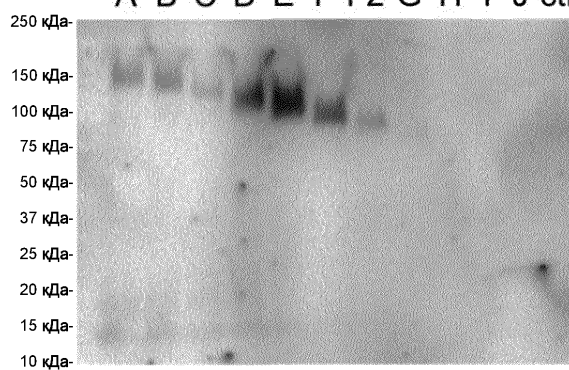
А

α-FLAG

CD43-Flag THP1-мутантов

Элюирование иммунопреципитата AT14-13

A B C D E F F2 G H I J ctr



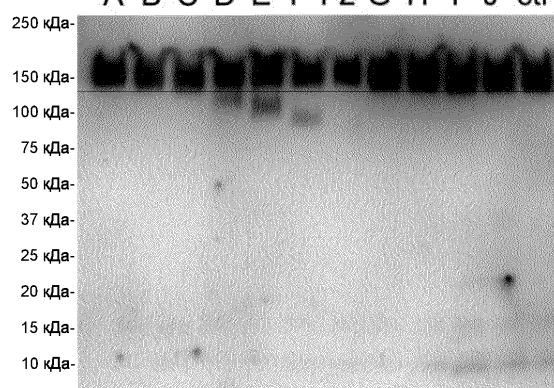
В

α-CD43 cyto

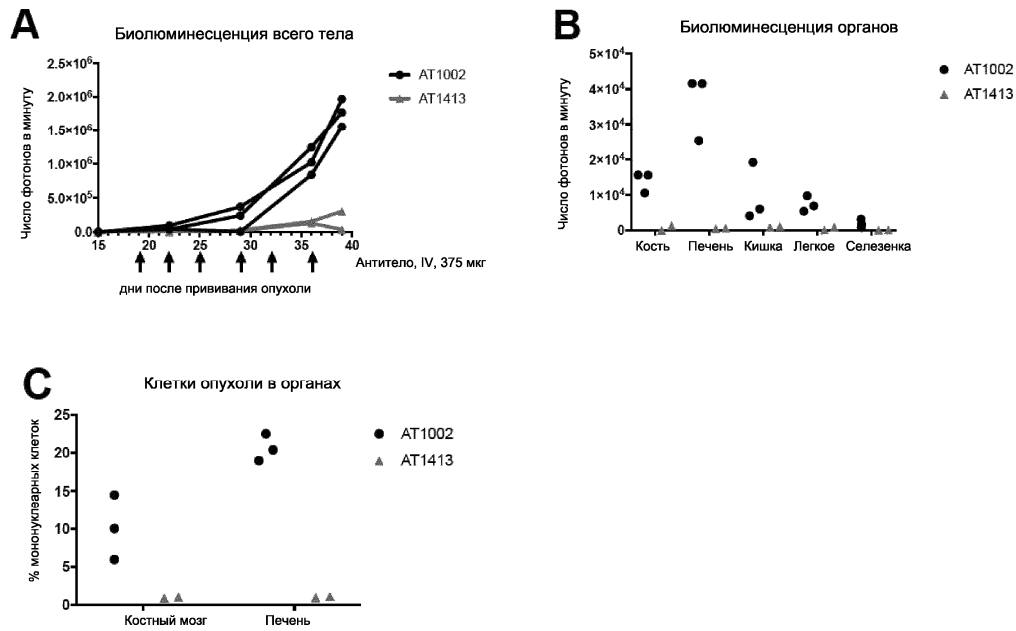
CD43-Flag THP1-мутантов

Элюирование иммунопреципитата AT14-13

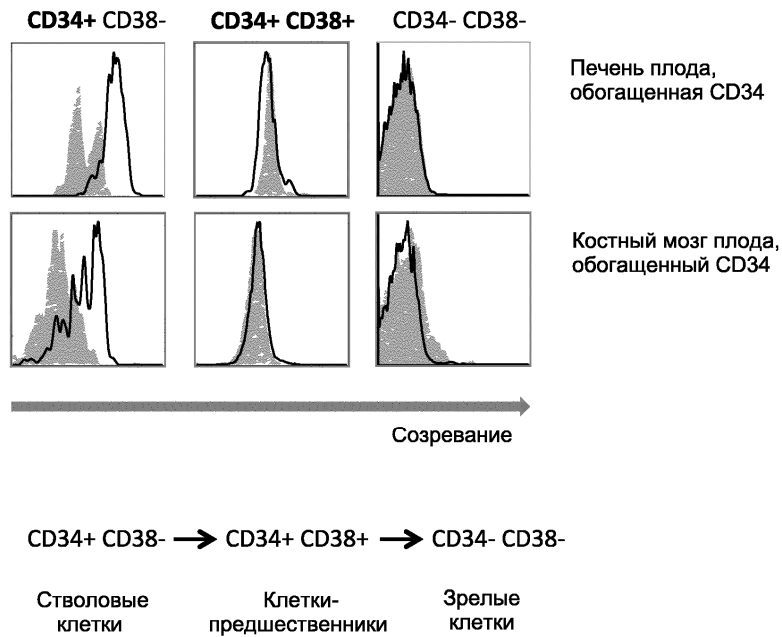
A B C D E F F2 G H I J ctr



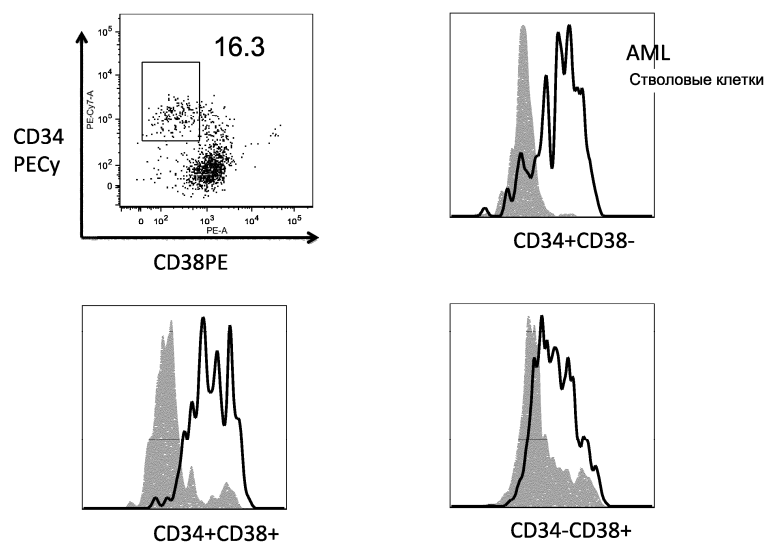
Фиг. 16



Фиг. 17



Фиг. 18



Фиг. 19



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

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