

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **040933**(13) **B1**(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

- | | |
|---|---|
| <p>(45) Дата публикации и выдачи патента 2022.08.19</p> <p>(21) Номер заявки 201991204</p> <p>(22) Дата подачи заявки 2017.12.22</p> | <p>(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01) A61P 35/00 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/574 (2006.01)</p> |
|---|---|

(54) **МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ УНИКАЛЬНОГО
СИАЛОГЛИКОЗИЛИРОВАННОГО ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО ЭПИТОПА
CD43**

- | | |
|---|---|
| <p>(31) 10 2016 015 379.2</p> <p>(32) 2016.12.22</p> <p>(33) DE</p> <p>(43) 2019.12.30</p> <p>(86) PCT/EP2017/084482</p> <p>(87) WO 2018/115485 2018.06.28</p> <p>(71)(73) Заявитель и патентовладелец: УНИВЕРСИТА ДЕЛЬИ СТУДИ МАНЬЯ ГРЕЧА КАТАНДЗАРО (ИТ)</p> <p>(72) Изобретатель: Тассоне Пьерфранческо (ИТ)</p> <p>(74) Представитель: Медведев В.Н. (РУ)</p> <p>(56) TUCCILLO F.M. ET AL.: "Cancer-Associated CD43 Glycoforms as Target of Immunotherapy", <i>MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS</i>, vol. 13, no. 3, 19 December 2013 (2013-12-19), pages 752-762, XP055462736, US ISSN: 1535-7163, DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-13-0651 page 753, left-hand column, paragraph 2 figure 3 WO-A1-2006121240 REMOLD-O'DONNELL ED - SCHLOSSMANN S.F.: "AS9 CD43 cluster report", <i>LEUCOCYTE TYPING V: WHITE CELL DIFFERENTIATION ANTIGENS; PROCEEDINGS OF THE FIFTH INTERNATIONAL WORKSHOP AND CONFERENCE, HELD IN BOSTON, USA, 3-7 NOVEMBER, OXFORD UNIVERSITY PRESS, NEW YORK, 3 November 1993 (1993-11-03), pages</i></p> | <p>1697-1701, XP008162986, ISBN: 978-0-19-262376-8 page 1700, right-hand column, paragraph 1 EILEEN REMOLD-O 'DONNELL ET AL.: "Specific Sensitivity of CD43 to Neutrophil Elastase", <i>BLOOD</i>, vol. 86, no. 6, 15 September 1995 (1995-09-15), pages 2395-2402, XP055463479, figure 4B TASSONE P. ET AL.: "UN1, a murine monoclonal antibody recognizing a novel human thymic antigen", <i>TISSUE ANTIGENS</i>, vol. 44, 1 January 1994 (1994-01-01), pages 73-82, XP055462766, DK ISSN: 0001-2815 cited in the application page 79, right-hand column, paragraph 1 ANNAMARIA DE LAURENTIIS ET AL.: "Mass Spectrometry-Based Identification Of The Tumor Antigen UN1 as the Transmembrane CD43 Sialoglycoprotein", <i>MOLECULAR & CELLULAR PROTEOMICS</i>, vol. 10, no. 5, 1 May 2011 (2011-05-01), XP055462735, US ISSN: 1535-9476, DOI: 10.1074/mcp.M111.007898 cited in the application page 2, left-hand column, paragraph 2 figure 8A TASSONE P. ET AL.: "Fetal ontogeny and tumor expression of the early thymic antigen UN1", <i>INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY</i>, vol. 20, 1 April 2002 (2002-04-01), pages 707-711, XP055462786, DOI: 10.3892/ijo.20.4.707 WO-A2-2007146172 SOSEUL KIM ET AL.: "Characterization of Two Novel mAbs Recognizing Different Epitopes on CD43", <i>IMMUNE NETWORK</i>, vol. 14, no. 3, 1 January 2014 (2014-01-01), page 164, XP055260711, ISSN: 1598-2629, DOI: 10.4110/in.2014.14.3.164</p> |
|---|---|
-
- (57) Изобретение относится к моноклональному антителу мыши, продуцируемому гибридомной клеткой, депонируемой в ICLC под регистрационным номером ICLC PD № 16001. Кроме того, изобретение относится к антителу, содержащему вариательную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и вариательную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH, YISSGSGNFYYVDTVKG, STYYHGSRGAMDY, SASSSVSSMYWY, DTSKMAS и QQWSSYPPIT соответственно. Кроме того, изобретение относится к антителам, распознающим тот же эпитоп.
-

040933 B1

040933 B1

Изобретение относится к моноклональному антителу мыши, продуцируемому гибридомной клеткой, депонируемой в ICLC под регистрационным номером ICLC PD № 16001, родственным антителам, связывающим молекулам и их применению.

Уровень техники

CD43 является трансмембранным белком и специфическим маркером лейкоцитов, ограниченными клетками гемопоэтического роста. Однако среди этих клеток CD43 широко экспрессируется на большинстве периферических и происходящих из костного мозга клеточных компонентах. Форма-предшественник CD43 имеет кажущуюся молекулярную массу 54 кДа. В своей зрелой форме CD43 является высокогликозилированным и имеет молекулярную массу от 115 до 200 кДа. В целом, CD43⁺ тимоциты и моноциты экспрессируют форму массой 115 кДа, в то время как активированные CD43⁺ и CD8⁺-Т-клетки, В-клетки, нейтрофилы и тромбоциты экспрессируют форму массой 130 кДа. CD43 участвует во множестве функций, таких как адгезия, апоптоз и миграция клеток (Ostberg J.R. et al. *Immunology today*. 1998; 19:546-50).

Гликопротеины, такие как гликозилированный CD43, играют основную роль в передаче сигнала в клетках, иммунном распознавании и межклеточном распознавании, т.к. их гликановые части придают им структурную вариабельность и специфичность связывания с лектиновыми лигандами (Ohtsubo K. et al. *Cell*. 2006; 126, 855-867). Гликопротеины муцинового типа отличаются высоким содержанием О-связанных углеводных цепей (О-гликанов) и секретируются или экспрессируются на мембране гемопоэтических и эпителиальных клеток. Биосинтез О-гликанов начинается в аппарате Гольджи с присоединения N-ацетилгалактозамина (GalNAc) к остаткам серина или треонина под действием UDP-N-ацетил-D-галактозамин:полипептид-N-ацетилгалактозаминилтрансферазы (GalNAc-трансферазы) с образованием структуры антигена Tn О-гликанов. Последующая элонгация О-связанной гликановой части катализируется тканеспецифическими гликозилтрансферазами посредством добавления других углеводов, таких как галактоза, фукоза и сиаловая кислота, что приводит к синтезу комплексного набора О-гликановых структур, отличающихся по своей природе и длине О-связанных углеводных цепей (Wopereis S. et al. *Clin. Chem*. 2006; 52, 574-600). Кроме того, олигосахариды могут модифицироваться посредством сиалирования, фукозилирования, сульфатирования, метилирования или ацетилирования. В злокачественных клетках происходит укорачивание О-гликановых структур, а также аномальная экспрессия конкретных О-гликанов, что позволяет предполагать, что аномальное гликозилирование может вносить свой вклад в прогрессирование злокачественного новообразования посредством модификации передачи сигнала в клетках, адгезии и антигенности (Nakomori S. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2002; 99, 10231-10233, Brockhausen I. *EMBO Rep*. 7 2006; 599-604).

Онкоэмбриональные антигены (ОА) являются, главным образом, гликопротеинами и продуктами одного или более генов, в норме экспрессирующимися на высоком уровне только в ходе эмбрионального развития, все больше репрессирующимися при дифференцировке и, таким образом, не экспрессирующимися в тканях взрослого организма. Их повторная экспрессия у взрослых является результатом аномальной активации контролируемых генов, как это происходит при злокачественном новообразовании.

Онкоэмбриональные эпитопы (ОЕ) являются частью ОА, распознаваемой антителом. Идентификация ОА или конкретных онкоэмбриональных эпитопов (ОЕ), экспрессия которых ограничена злокачественной тканью, может служить не только для детекции ранних онкогенных процессов, но, что наиболее важно, может быть ключевым фактором в разработке новых иммунотерапевтических подходов в случае злокачественных новообразований человека.

Целью настоящего изобретения является получение антитела, делающего возможной детекцию ОЕ и разработку новых иммунотерапевтических подходов.

Проблему решают с помощью антитела по изобретению. Данные, представленные в примерах, свидетельствуют о том, что благодаря специфическому профилю ограниченной экспрессии в эмбриональных тканях и повторной экспрессии в злокачественных новообразованиях эпитоп, распознаваемый антителом, продуцируемым гибридомной клеткой, депонируемой по изобретению, можно рассматривать в качестве ОЕ. Таким образом, последний представляет собой потенциально подходящую мишень для инновационных иммунотерапевтических стратегий для лечения злокачественных новообразований человека.

Кроме того, разрабатывали химерный антигенный рецептор (CAR), содержащий scFv связывающей молекулы на основе антитела по изобретению, соединенный с внутриклеточной областью, содержащей цепь CD3 ζ , сигнальную область Т-клеточного рецептора и два костимуляторных домена CD28 и 41BB. CD3⁺ лимфоциты, экспрессирующие CAR по изобретению, индуцируют значительную цитотоксичность против клеток, экспрессирующих эпитоп, распознаваемый антителом, продуцируемым гибридомной клеткой, депонируемой по изобретению.

Хотя эффект антитела мыши по изобретению частично уже описан (Tassone et al., *Tissue Antigens*, 1994; De Laurentiis et al., *Mol. Cel. Proteomics* 2011; Cecco et al., *Tissue Antigens*, 1998; De Laurentiis et al., *Int. J. Biol. Macromol.*, 2006; Tassone et al., *Int. J. Oncol.*, 2002; Tassone et al., *Anticancer Res*, 2002), само антитело или его последовательность, а также эпитоп, с которым оно связывается, никогда не были доступны для общественности.

Сущность изобретения

Изобретение относится к антителу мыши, продуцируемому гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001. Кроме того, изобретение относится к антителу, распознающему тот же эпитоп, что и антитело, продуцируемое гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

Изобретение дополнительно относится к антителу, содержащему варибельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и варибельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH, YISSGSGNFYYVDTVKG, STYYHGSRGAMDY, SASSSVSSMYWY, DTSKMAS и QWSSYPPIIT соответственно.

Предпочтительно указанное антитело является моноклональным антителом.

Кроме того, изобретение относится к связывающей молекуле, полученной из антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, или указанного выше антитела по изобретению.

Кроме того, изобретение относится к химерному антигенному рецептору, содержащему связывающую молекулу scFv по изобретению, соединенную с внутриклеточной областью, содержащей цепь CD3 ζ , сигнальной областью Т-клеточного рецептора и двумя костимуляторными доменами CD28 и 41BB.

Кроме того, изобретение относится к экспрессирующему вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор по изобретению, антитело по изобретению или связывающую молекулу по изобретению.

Изобретение дополнительно относится к CD3⁺ лимфоциту, NK-клетке, цитокин-индуцированному киллеру (CIK), гамма-дельта-лимфоциту или NKT-клетке, содержащей химерный антигенный рецептор по изобретению или экспрессирующий вектор по изобретению.

Изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело по изобретению или связывающую молекулу по изобретению или CD3⁺ лимфоцит, NK-клетку, цитокин-индуцированный киллер (CIK), гамма-дельта-лимфоцит или NKT-клетку по изобретению.

Изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело по изобретению или связывающую молекулу по изобретению.

Изобретение относится к гибридной клетке, продуцирующей антитело по изобретению.

Изобретение относится к способу получения антитела по изобретению, включающему выделение указанного антитела из гибридной клетки, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

Изобретение относится к способу идентификации или выделения клеток острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, клеток Т-клеточной лимфомы, клеток макроглобулинемии Вальденстрема или опухолеассоциированных макрофагов, включающему приведение образца клеток, содержащего указанные клетки, в контакт с антителом по изобретению или связывающей молекулой по изобретению.

Изобретение относится к способу получения CD3⁺ лимфоцитов, NK-клеток, цитокин-индуцированных киллеров (CIK), гамма-дельта-лимфоцитов или NKT-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор по изобретению, включающему встраивание экспрессирующего вектора по изобретению в указанные CD3⁺ лимфоциты, NK-клетки, цитокин-индуцированные киллеры (CIK), гамма-дельта-лимфоциты или NKT-клетки.

Подробное описание изобретения

В первом аспекте изобретение относится к моноклональному антителу мыши, продуцируемому гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

Гибридная клетка депонирована в Centro Biotecnologie Avanzate (CBA), Interlay Cell Line Collection (ICLC), Largo Rosanna, 10, 16132 Genova, Italy под регистрационным номером ICLC PD № 16001 на 4 августа 2016 г. Антитело тестировали в примерах, приведенных ниже. Как показано в примерах, антитело связывается со специфическим сиалогликозилированным эпитопом на CD43.

В этом первом аспекте изобретение дополнительно относится к антителу, содержащему варибельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и варибельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH, YISSGSGNFYYVDTVKG, STYYHGSRGAMDY, SASSSVSSMYWY, DTSKMAS и QWSSYPPIIT соответственно.

Эти последовательности также приведены в SEQ ID NO: 1-6.

Упомянутые выше последовательности CDR являются последовательностями CDR из моноклонального антитела мыши, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, что определено посредством секвенирования.

В рамках изобретения термин "CDR" или "определяющая комплементарность область" означает несмежные антигенсвязывающие участки, обнаруживаемые в варибельной области полипептидов тяжелой и легкой цепи. Эти конкретные области описаны в Kabat et al., J. Biol. Chem. 252, 6609-6616 (1977) и Ка-

bat et al., Sequences of protein of immunological interest. (1991), Chothia et al., J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987) и MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996), где определения включают перекрывания или подгруппы аминокислотных остатков при их сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, включающие CDR, определяемые с помощью каждой из приведенных выше ссылок, представлены для сравнения. Предпочтительно термин "CDR" означает CDR, определяемую по Kabat с учетом сравнения последовательностей. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 означают CDR тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 означают CDR легкой цепи.

Это моноклональное антитело может содержать каркасные последовательности, принадлежащие любому виду. Предпочтительно оно может содержать каркас мыши или человека.

В рамках изобретения термин "каркасные (FR) аминокислотные остатки" относится к аминокислотам в каркасной области цепи иммуноглобулина. В рамках изобретения термин "каркасная область" или "область FR" включает аминокислотные остатки, являющиеся частью варибельной области, но не частью CDR (например, при использовании определения CDR по Kabat).

Способы получения моноклонального антитела с последовательностями CDR, как указано выше, известны в этой области и включают встраивание последовательностей нуклеиновой кислоты, кодирующих CDR, в подходящие экспрессирующие векторы, кодирующие желаемые каркасные последовательности. Дополнительные способы описаны ниже.

Во втором аспекте изобретение относится к антителу, распознающему тот же эпитоп, что и антитело по первому аспекту.

Как правило и как известно в этой области, антитело является белком, принадлежащим к белковому семейству иммуноглобулинов, и состоит из варибельных областей каркасных областей и определяющих комплементарность областей, как определено выше. В природе антитело продуцируется плазматическими клетками в ответ на конкретный антиген. В основном, каждое антитело содержит две идентичные тяжелые цепи иммуноглобулина и две идентичные легкие цепи иммуноглобулина. Каждая тяжелая и каждая легкая цепь может содержать варибельную и константную область. Константная область тяжелой цепи может принадлежать к одному из пяти типов тяжелых цепей Ig млекопитающих: α , δ , ϵ , γ и μ . Тип тяжелой цепи, как правило, определяет класс (изотип) антитела: антитела IgA, IgD, IgE, IgG и IgM соответственно. Аналогично, константная область легкой цепи может принадлежать к одному из двух типов легких цепей Ig млекопитающих: κ и λ . Варибельные области тяжелых и легких цепей, как правило, составляют уникальную комбинацию из многочисленных белковых последовательностей, что делает возможным связывание с конкретным антигеном.

В рамках изобретения термин "антитело" также охватывает выделенное антитело.

В основном, каждая тяжелая цепь соединена с одной из легких цепей, посредством чего варибельные области тяжелой и легкой цепи комбинируются с образованием одного из двух идентичных антигенсвязывающих участков, и их константные области комбинируются с образованием константной области антитела. Кроме того, обе конструкции из одной тяжелой и одной легкой цепи могут соединяться через константные области их тяжелых цепей, образуя "Y"-образную молекулу, в которой два плеча соответствуют антигенсвязывающей варибельной области, а стебель соответствует константной области.

Антитело по второму аспекту может являться полным антителом, что означает, что оно, как правило, содержит тяжелую цепь из трех или четырех константных доменов и легкую цепь из одного константного домена, а также соответствующих варибельных доменов, в результате чего каждый домен может содержать дополнительные модификации, такие как мутации, делеции или инсерции, не изменяющие общую доменную структуру.

Кроме того, антитело по второму аспекту настоящего изобретения может образовывать гомо- или гетеродимер или гомо- или гетеромультимер, при этом термин "димер" и "мультимер" означает, что два и по меньшей мере три антитела, соответственно, могут объединяться с образованием комплекса. Приставка "гомо" означает, что комплекс может образовываться из идентичных молекул антитела, а приставка "гетеро" означает, что комплекс может образовываться из разных молекул антител.

В основном, термин "антитело" предназначен для включения всех указанных выше изотипов иммуноглобулина, т.е. антитело может являться антителом IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любой подкласс этих изотипов. Предпочтительно антитело является антителом IgG, более предпочтительно антитело является антителом IgG1. Т.к. антитело можно экспрессировать и получать рекомбинантно, оно также может содержать две разные константные области тяжелых цепей, например одну константную область тяжелой цепи IgG1 и одну константную область тяжелой цепи IgG2 или константные области тяжелых цепей разных видов. Однако тяжелые цепи предпочтительно получают из одного вида. Кроме того, антитело может содержать легкую цепь λ или κ .

Антитело, распознающее тот же эпитоп, что и одно из антител по первому аспекту изобретения, дополнительно может являться антителом, содержащим варибельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и варибельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH,

YISSGSGNFYYVDTVKG, STYYHGSRGAMDY, SASSSVSSMYWY, DTSKMAS и QQWSSYPPIIT соответственно.

Кроме того, антитело, распознающее тот же эпитоп, что и одно из антител по первому аспекту изобретения, может являться антителом, в котором CDR по сравнению с указанными выше последовательностями содержит по меньшей мере одну консервативную замену аминокислоты, например аминокислоту с химической структурой и свойствами и/или функцией, схожими с исходной аминокислотой.

Антитело, распознающее тот же эпитоп, что и одно из антител по первому аспекту изобретения, также может являться антителом, имеющим повышенную или сниженную аффинность или специфичность по сравнению с одним из антител по первому аспекту изобретения. Такие антитела легко получают известными в этой области способами, и они дополнительно представлены в настоящем описании ниже.

Как правило, антитело по второму аспекту изобретения может иметь последовательность, особенно в переменных областях, по меньшей мере на 75, 80, 85, 90, 95 или 100% (например, по меньшей мере на 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99%) идентичную последовательности моноклонального антитела мыши, продуцируемого гибридомной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

Как правило, антитело по изобретению может являться моноклональным, биспецифическим или полиспецифическим антителом. Такие антитела известны в этой области. В рамках изобретения термин "моноклональное" можно понимать в самом широком смысле как описание антител, продуцируемых одним клоном В-лимфоцитов, или антител, имеющих одинаковую или схожую аминокислотную последовательность. В рамках изобретения термин "биспецифический" можно понимать в самом широком смысле как описание антител, взаимодействующих с двумя разными эпитопами. Биспецифическое антитело можно получать из двух моноклональных антител. Необязательно, эти два разных эпитопа могут находиться на одном антигене, но также могут находиться на двух разных антигенах. В рамках изобретения термин "мультиспецифический" можно понимать в самом широком смысле как описание антител, взаимодействующих с тремя или более различными типами эпитопов. Необязательно, эти эпитопы могут находиться на одном антигене или на двух или более антигенах.

Предпочтительно антитело по второму аспекту изобретения является моноклональным антителом. Кроме того, антитело по второму аспекту изобретения предпочтительно является биспецифическим или полиспецифическим антителом.

Способы получения антител хорошо известны специалистам в этой области. Предпочтительно антитела получают посредством получения гибридных клеток. Способы получения гибридных клеток, а также способы получения антител с помощью гибридных клеток хорошо известны специалистам в этой области. Как правило, мышам инъецируют желаемый антиген и умерщвляют их через несколько дней для выделения клеток селезенки, секретирующих антитело против желаемого антигена. В основном, гибридные клетки получают посредством слияния этих антитело-секретирующих клеток селезенки с иммортализованными несекретирующими миеломными клетками. Затем эти гибридные клетки, как правило, подвергают скринингу и выбирают гибридому, продуцирующую желаемое антитело. Затем выбранную гибридому можно культивировать *in vivo* или *in vitro* и можно выделять желаемое антитело.

Бифункциональные или биспецифические антитела могут содержать антигенсвязывающие участки с разными специфичностями. Специалистам в этой области известны различные формы биспецифических антител и их получение. Например, они включают BSIGG, являющиеся молекулами IgG, содержащими две разные тяжелые цепи и две разные легкие цепи, секретируемые так называемыми "гибридными гибридами", и конъюгаты гетероантител, получаемые посредством химической конъюгации антител или фрагментов антител с разными специфичностями (Segal D.M. et al. *Current Opin. Immunol.* 1999, 11:558-562; Van Spruel A.B. et al. *Immunology Today* 2000, 21:391-397).

Биспецифические антитела можно получать для доставки клеток, цитотоксинов или лекарственных средств в конкретные места. Важным может быть их использование для доставки цитотоксических клеток хозяев, таких как NK-клетки или цитотоксические Т-клетки, к конкретным клеточным мишеням (P.J. Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 79: 315). Важным также может быть их использование для доставки цитотоксических белков к конкретным клеточным мишеням (V. Raso, T. Griffin, *Cancer Res.* 1981, 41:2073); S. Honda et al., *Cytotechnology*, 1990, 4:59). Важным также может быть их использование для доставки противоопухолевых небелковых лекарственных средств к конкретным клеточным мишеням (J. Corvalan et al., *Intl. J. Cancer Suppl.* 1988, 2:22; M. Pimm et al., *British J. of Cancer* 1990, 61:508). Такие биспецифические антитела можно получать посредством химического перекрестного сшивания (M. Brennan et al., 1985, *Science* 229:81), дисульфидного обмена или получения гибридных гибридом (квадром). Квадромы можно конструировать посредством слияния гибридом, секретирующих два разных типа антител против двух разных антигенов (Milstein and Cuello, *Nature*, 1983, 305: 537-539).

В рамках изобретения термин "эпитоп" можно понимать в самом широком смысле как часть молекулы CD43, которую может распознавать и связывать антитело, продуцируемое гибридомной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, в одной или более антигенсвязывающих областей антитела. Часть антитела, связывающуюся с эпитопом, называют паратопом. Во многих

случаях эпитопы имеют конформационные свойства, приводящие к специфическому образованию участков связывания для паратопа.

Эпитопы, как правило, состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или боковые цепи сахаров, и, как правило, имеют конкретные трехмерные структурные характеристики, а также конкретные характеристики заряда.

Кроме того, специалисту в этой области понятно, что взаимодействие между эпитопом и антителом, как правило, может быть основано на первичной структуре антигена, т.е. непрерывной последовательности аминокислот. Как правило, взаимодействие также может быть основано на вторичной структуре, третичной структуре или четвертичной структуре эпитопа, а также посттрансляционных модификациях, таких как гликозилирование. Взаимодействие между эпитопом и антителом может быть дополнительно основано на трехмерной структуре и являющихся их результатом поверхностных признаках антигена, которые могут вовлекать прерывистую часть аминокислотной последовательности, содержащей аминокислоты в отдаленных участках, во взаимодействие с антителом.

Антитело распознает "тот же эпитоп", что и антитело по первому аспекту, если два антитела распознают идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы. В основном, наиболее широко используемыми и быстрыми способами определения того, распознают ли два антитела идентичные или стерически перекрывающиеся эпитопы, являются конкурентные анализы, которые, как правило, можно конфигурировать в любом из различных форматов с использованием меченого антигена или меченого антитела. Например, антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете и с использованием радиоактивных или ферментативных меток измеряют способность немеченых антител блокировать связывание меченых антител.

Антитело, распознающее "тот же эпитоп", что и антитело по первому аспекту, как правило, является антителом, блокирующим связывание референсного антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более, и наоборот, референсное антитело, как правило, блокирует связывание антитела с его антигеном в конкурентном анализе на 50% или более.

В основном, эпитоп, распознаваемый и связываемый антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, можно идентифицировать любым подходящим способом эпитопного картирования, известным в этой области, в комбинации с антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

Примеры такого способ включают скрининг пептидов различной длины, полученных из CD43, на связывание с антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, при этом наименьший фрагмент, который может специфически связываться с антителом, как правило, содержит последовательность эпитопа, распознаваемого антителом. В основном, пептиды CD43 можно получать синтетически или посредством протеолитического расщепления CD43. Специалисту в этой области хорошо известны способы идентификации пептидов, связывающихся с антителом, такие как масс-спектрометрический анализ. В другом примере для идентификации остатков, взаимодействующих с антителом по настоящему изобретению, можно использовать ЯМР-спектроскопию. Например, пептид CD43, однородно меченый ^{15}N и ^2H , можно смешивать с немеченым антителом и можно определять аминокислоты в меченом пептиде, взаимодействующие с немеченым антителом, т.к. их положение в ЯМР-спектрах изменяется. Как правило, различие между двумя спектрами позволяет идентифицировать аминокислоты в CD43, вовлеченные во взаимодействие с антителом.

Предпочтительно масс-спектрометрический анализ используют для идентификации пептидов, связывающихся с антителом. Например, эпитоп, распознаваемый и связываемый антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, также можно идентифицировать способом, включающим амплификацию различных фрагментов ДНК CD43 посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР), встраивание этих фрагментов в экспрессирующий вектор, включающее их соединение с гистиридиновым слитым белком, и определение эпитопа после экспрессии белка, например, посредством вестерн-блоттинга.

В предпочтительном варианте осуществления антитело по первому или второму аспектам распознает эпитоп, содержащий GalNAc, являющийся O-связанным с CD43 человека.

В дополнительном примере для определения участка на CD43, распознаваемого и связываемого антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, экспрессирующий вектор, клонируемый с CD43, можно встраивать с помощью делегационной мутации способом ПЦР для получения серии мутантов, такой как серия мутантов *Escherichia coli* (*E. coli*), экспрессирующих белки с различными делегированными участками в CD43. Этих мутантов *E. coli* можно культивировать и индуцировать в них экспрессию. Вестерн-блоттинг можно осуществлять с использованием лизата клеток в качестве антигена.

Дополнительные способы идентификации эпитопа, распознаваемого и связываемого антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001, могут включать детекцию с помощью иммунологических анализов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

В рамках изобретения термин "аффинность" можно понимать в самом широком смысле как силу взаимодействия между эпитопом и эпитопсвязывающим участком антитела. Способы определения абсолютного значения аффинности антитела, т.е. константы аффинности, хорошо известны специалистам в этой области. Однако, как правило, также можно определять относительные значения аффинностей антител, т.е. сравнивают аффинность двух антител без определения их абсолютных значений. Способы сравнения аффинностей антител хорошо известны специалисту в этой области. Например, можно использовать проточную цитометрию, при которой клетки, имеющие желаемый эпитоп, можно независимо приводить в контакт с различными антителами, которые затем метят иммунофлуоресцентным вторичным антителом. Как правило, после детекции посредством проточной цитометрии можно сравнивать интенсивность сигналов антител.

Специалисту в этой области хорошо известны способы идентификации антител по второму аспекту, распознающих тот же эпитоп, что и антитело, соответствующее антителу по первому аспекту. Например, антитела по второму аспекту можно идентифицировать с помощью флюоресцентного дисплея на основе библиотек антител.

Таким образом, антитело по изобретению, распознающее тот же эпитоп, также может являться антителом человека.

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело, соответствующее антителу по второму аспекту, является химерным антителом. В более предпочтительном варианте осуществления антитело по второму аспекту является химерным антителом по первому аспекту.

Химерное антитело является антителом, в котором по меньшей мере одну область иммуноглобулина одного вида подвергают слиянию с другой областью иммуноглобулина другого вида с помощью генетической инженерии для снижения ее иммуногенности (см., например, патент США № 4816567 и патент США № 4816397).

В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по второму аспекту является гуманизированным антителом. В более предпочтительном варианте осуществления антитело по второму аспекту является химерным или гуманизированным антителом, соответствующим антителу по первому аспекту.

В основном, гуманизированные антитела являются конкретным типом химерных антител. Например, гуманизированные антитела можно получать посредством встраивания ДНК антитела человека в ДНК, кодирующую каркас антитела мыши, или встраивания ДНК антитела мыши в ДНК, кодирующую каркас антитела человека. Предпочтительно ДНК антитела человека встраивают в ДНК, кодирующую каркас антитела мыши. В основном, встраивание ДНК включает встраивание одной или более последовательностей ДНК в целевую ДНК, кодирующую каркас антитела. Необязательно, переменные и константные области, а также тяжелые и легкие цепи могут быть частично или полностью гуманизированными. Предпочтительно переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи антитела мышь являются гуманизированными. Более предпочтительно переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи антитела мышь гуманизуют, изменяя последовательность ДНК, кодирующую от 1 до 50, предпочтительно от 1 до 30, более предпочтительно от 1 до 20 аминокислот. Встроенная ДНК, как правило, может содержать области ДНК шести гиперпеременных петель, определяющих специфичность антигена, также называемых определяющими комплементарными областями (CDR), или области ДНК, не содержащие CDR, или те, и другие. Предпочтительно гуманизация включает встраивание ДНК, не содержащей CDR.

В основном, затем получаемую конструкцию ДНК можно использовать для экспрессии и получения антител, являющихся, как правило, менее иммуногенными или неиммуногенными по сравнению с не принадлежащим человеку родительским антителом. Это включает получение модифицированных антител, таких как агликозилированные антитела или афукозилированные антитела. Такие способы хорошо известны в этой области.

Таким образом, антитело по изобретению, распознающее тот же эпитоп, также может являться агликозилированным антителом или афукозилированным антителом.

В другом предпочтительном варианте осуществления моноклональное антитело, соответствующее антителу по второму аспекту, может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против клеток подгруппы EGIL T3 острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза (Т-ALL), клеток Т-клеточной лимфобластной лимфомы и клеток макроглобулинемии Вальденстрема (WM).

Лимфоциты принадлежат к группе лейкоцитов и являются медиаторами гуморального и клеточного иммунитета. Существует две группы лимфоцитов, В-клетки и Т-клетки.

Так же как и многие другие типы клеток, В- и Т-клетки могут аномально развиваться в В- и Т-клеточные опухоли. Т.к. существует множество стадий развития В- и Т-клеток, существуют различные типы опухолей. И В-клетки, и Т-клетки происходят из лимфоидных клеток-предшественников.

В случае В-клеток эти лимфоидные клетки-предшественники проходят через множество стадий развития В-клеток, каждая из которых включает конкретный определяемый тип клеток, до образования плазматических клеток. Одна из этих стадий включает так называемую "IgM-секретирующую В-клетку", которая в конечном итоге развивается в антителопродуцирующую плазматическую клетку. Опухоль,

развивающуюся из "IgM-секретирующей В-клетки", называют "макроглобулинемией Вальденстрема" (WM). WM является редким, вялотекущим и неизлечимым заболеванием. Она отличается накоплением в костном мозге клональных IgM-секретирующих лимфоплазматических клеток.

Т-клетки развиваются из лимфоидных клеток-предшественников до зрелых Т-клеток всего за несколько стадий развития. Опухоли, в частности, могут развиваться из зрелых Т-клеток или лимфоидных клеток-предшественников, в последнем случае это приводит к острому В- или Т-клеточному лимфобластному лейкозу (В-ALL) и (Т-ALL) соответственно. На Т-клеточный фенотип Т-ALL приходится приблизительно 20% всех случаев острого лимфобластного лейкоза, и он чаще возникает у взрослых, чем у детей. Т-ALL близок к Т-клеточной лимфобластной лимфоме (Т-LBL), и дифференциальная диагностика между этими двумя заболеваниями основана на преобладающей локализации в конкретных участках, таких как костный мозг при Т-ALL или вторичные лимфоидные органы при Т-LBL. Европейская группа по иммунологической характеристике лейкозов (EGIL) классифицировала Т-ALL на четыре подгруппы в соответствии с их иммунофенотипом (Venet MC, Leukemia 1995; 9:1783):

- 1) EGIL T1 (про-), цитоплазматически положительная по CD3 (сCD3) и отличающаяся поверхностной экспрессией CD7;
- 2) EGIL T2 (пре-), положительная по сCD3, CD7 и положительная по CD2 или CD5;
- 3) EGIL T3 (кортикальная), положительная по сCD3, CD1a и отличающаяся наличием или отсутствием поверхностного CD3 (sCD3), и
- 4) EGIL T4 (зрелый лейкоз), положительный по сCD3 и sCD3 и отрицательный по CD1a.

В рамках изобретения термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)" означает уничтожение клетки, связанной и помеченной антителами, цитотоксической эффекторной клеткой, такой как естественный киллер (NK).

Для исследования того, способно ли антитело индуцировать ADCC, можно использовать следующий анализ. Осуществляют анализ дегрануляции посредством сокультивирования моноклеарных клеток периферической крови (PBMC) от здоровых доноров, включающих эффекторные клетки, с клетками-мишенями, экспрессирующими эпитоп в присутствии различных концентраций антитела. 4×10^4 клеток-мишеней высевают в 96-луночный круглодонный планшет и культивируют в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ в присутствии различных концентраций антитела (0, 10, 50, 100 и 200 мкг/мл) или контрольного IgG1. Затем $0,4 \times 10^6$ PBMC (фиксированное соотношение эффекторные клетки (E):клетки-мишени (T)=10:1) того же донора добавляют в каждую лунку вместе с 20 мкг/мл конъюгированного с фикоэритрином (PE) моноклонального антитела (mAb) против CD107a (BD), а затем клетки инкубируют при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 ч. Через 1 ч в каждую лунку добавляют 6 мкг/мл монензина (GolgiStop, BD). В конце инкубации клетки окрашивают конъюгированным с аллофикоцианином (APC) антителом против CD56 и конъюгированным с белковым комплексом перидинин-хлорофилл (PerCp) антителом против CD3 и анализируют с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific). Определяя CD3⁻/CD56⁺/CD107a⁺ клетки, измеряют NK клетки (CD3⁻/CD56⁺), индуцирующие лизис клеток-мишеней (CD107a⁺). Таким образом, повышение CD3⁻/CD56⁺/CD107a⁺ клеток в соответствии с повышением концентраций антитела подтверждает потенциальную возможность индукции антителом ADCC. С помощью полученных данных можно создавать подходы иммунного таргетинга, например, соответствующие неотложной и неудовлетворенной клинической потребности в случае острых Т-клеточных лимфобластных лейкозов/лимфобластных лимфом. Также можно использовать дополнительные способы исследования того, способно ли антитело индуцировать ADCC, и они хорошо известны специалисту в этой области.

В третьем аспекте изобретение относится к связывающей молекуле, полученной из антитела по первому или второму аспекту.

В рамках изобретения связывающая молекула является молекулой, полученной из моноклонального антитела мыши, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001. Предпочтительно связывающая молекула является иммуноглобулинсодержащей молекулой, т.е. она содержит по меньшей мере один иммуноглобулиновый (Ig) домен.

В предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула по изобретению выбрана из группы, состоящей из одноцепочечных антител. В более предпочтительном варианте осуществления связывающая молекула выбрана из группы, состоящей из одноцепочечного переменного фрагмента (scFv), мультимера scFv, такого как диатело, триатело или тетратело, фрагментов антител, предпочтительно Fab, TandAb и флекситела.

Структура антитела и, особенно, функция его CDR, как правило, известны в этой области (Carter P.J. Potent antibody therapeutics by design. Nature Rev. Immunol. 6:343-357, 2006). Одноцепочечный Fv (scFv) и его мультимеры, TandAb, диатела и флекситела, в основном, являются стандартными форматами антитела, известными в этой области, например, из WO 1988/001649 A1, WO 1993/011161 A1, WO 1999/057150 A2 и EP 1293514 B1.

В scFv две антигенсвязывающие переменные области легкой и тяжелой цепи (V_H Fv и V_L Fv) антитела, в основном, искусственно соединяют с помощью линкерного пептида, обозначая его как одноцепочечный переменный фрагмент или одноцепочечное антитело (Bird, et al. (1988) Science 242:423-426;

Orlandi, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:3833-3837; Clarkson et al., Nature 352: 624-628 (1991)). Антигенсвязывающий участок может быть образован переменными доменами легких и тяжелых цепей моноклонального антитела. В нескольких исследованиях показали, что scFv-фрагмент, фактически, может иметь полную аффинность связывания антигена, характерную для участка связывания целого антитела.

В контексте настоящего изобретения диатела являются scFv с двумя специфичностями связывания и могут являться моноспецифическими и бивалентными или биспецифическими и бивалентными.

TandAb и флекситела являются дополнительными форматами антител, например, описанными в US 2007031436 и EP 1293514 B1 соответственно.

Фрагменты антител, содержащие идиотипы белка, можно получать способами, известными в этой области. Такие фрагменты включают в качестве неограничивающих примеров F(ab')₂-фрагмент, который можно получать посредством расщепления пепсином молекулы антитела; Fab'-фрагмент, который можно получать посредством восстановления дисульфидных мостиков F(ab')₂-фрагмента; Fab-фрагмент, который можно получать посредством обработки молекулы антитела папаином и восстановителем; и Fv-фрагменты.

Антитело или связывающую молекулу по изобретению можно дополнительно соединять с активным веществом, предпочтительно токсином, наночастицей, цитокином или радионуклидом. В этой области известны такие конъюгаты антител (Wu A.M., Senter P.D. Nature Biotechnol. 23:1137-1146, 2005, Pastan et al. Annu. Rev. Med. 58:221-237, 2007, WO 1990/012592 A1, WO 2007/030642 A2, WO 2004/067038 A1, WO 2004/003183 A1, US 2005/0074426 A1, WO 1994/004189 A1).

Изобретение в своем дополнительном аспекте относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему связывающую молекулу по третьему аспекту, соединенную с внутриклеточным доменом, предпочтительно содержащим один или более сигнальных доменов.

Предпочтительно изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему scFv из предпочтительного варианта осуществления связывающей молекулы по третьему аспекту, соединенный с внутриклеточной областью, содержащей цепь CD3 ζ , сигнальной областью T-клеточного рецептора и двумя костимуляторными доменами CD28 и 4-1BB.

CAR по изобретению представляет собой важный инструмент для таргетинга злокачественных клеток, несущих эпитоп, распознаваемый и связанный моноклональным антителом по первому или второму аспекту, при экспрессии в T-клетках или NK-клетках.

В рамках изобретения термин "химерные антигенные рецепторы" (CAR) относится к синтетическим рецепторам, содержащим молекулу для таргетинга, связанную с одним или более сигнальными доменами в одной слитой молекуле. В основном, связывающая молекула CAR содержит scFv, но также может содержать другие связывающие молекулы. Также успешно используют связывающие молекулы на основе доменов рецептора или лиганда. Сигнальные домены для CAR можно получать из цитоплазматической области CD3 ζ или цепей Fc-рецептора γ , но также можно получать из других цитоплазматических областей. Показано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют T-клеточную цитотоксичность. Для получения CAR второго и третьего поколения добавляют сигнальные домены из костимуляторных молекул, а также трансмембранные и шарнирные домены, что привело к нескольким успешным клиническим испытаниям на людях, в которых T-клетки можно было перенаправить против злокачественных клеток, экспрессирующих CD19 (Porter D.L. et al., N. Eng. J. Med., 2011).

В пятом аспекте изобретение относится к экспрессирующему вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор по четвертому аспекту, антитело по первому и второму аспекту или связывающую молекулу, соответствующую связывающей молекуле по третьему аспекту.

Как правило, экспрессирующие векторы являются плазмидами, используемыми для встраивания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты, такой как ген, в клетку-мишень, что приводит к транскрипции и трансляции белка, кодируемого последовательностью нуклеиновой кислоты, т.е. химерного антигенного рецептора, антитела или связывающей молекулы. Таким образом, экспрессирующий вектор, в основном, содержит регуляторные последовательности, такие как промоторные и энхансерные области, а также участок полиаденилирования для регуляции эффективной транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты на экспрессирующем векторе. Экспрессирующий вектор дополнительно может содержать дополнительные необходимые или полезные области, такие как селективный маркер для селекции в эукариотических или прокариотических клетках, метку для очистки получаемого белка, участок множественного клонирования или участок начала репликации.

Как правило, экспрессирующий вектор может являться вирусным или невирусным вектором. В основном, можно использовать различные типы вирусных векторов, таких как ретровирусные векторы, например лентивирусные или аденовирусные векторы, или плазмиды. В предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор по пятому аспекту является вирусным вектором. В более предпочтительном варианте осуществления экспрессирующий вектор является лентивирусным вектором.

В шестом аспекте изобретение относится к CD3⁺ лимфоциту, NK-клетке, цитокин-

индуцированному киллеру (СИК), гамма-дельта-лимфоциту, НКТ-клетке или другой иммунной эффекторной клетке, содержащей химерный антигенный рецептор по четвертому аспекту или экспрессирующий вектор по пятому аспекту.

Как правило, CD3 является комплексом из четырех сигнальных цепей, связанных с гетеродимером $\alpha:\beta$ Т-клеточного рецептора в функциональном Т-клеточном рецепторном комплексе. Комплекс CD3, как правило, необходим для передачи сигнала Т-клеточного рецептора. В основном, группа CD3⁺ лимфоцитов включает исключительно тимоциты и Т-клетки. Детекцию CD3⁺ клеток можно осуществлять, например, посредством проточной цитометрии.

В седьмом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело по первому или второму аспекту или связывающую молекулу по третьему аспекту или CD3⁺ лимфоцит, НК-клетку, цитокин-индуцированный киллер (СИК), гамма-дельта-лимфоцит, НКТ-клетку или другую иммунную эффекторную клетку по шестому аспекту.

В рамках изобретения термин "фармацевтическая композиция", можно использовать взаимозаменяемо с термином "лекарственное средство".

Содержание антитела, связывающей молекулы или CD3⁺ лимфоцита в фармацевтической композиции не ограничено до тех пор, пока ее можно использовать для лечения или профилактики, но предпочтительно составляет 0,000001-10 мас.% всей композиции. Кроме того, антитело, связывающая молекула или CD3⁺ лимфоцит, представленные в настоящем описании, предпочтительно используют в носителе. Выбор носителя может зависеть от пути введения и концентрации активных средств, и носитель может быть в форме лиофилизированной композиции или водного раствора. Как правило, в носителе используют подходящее количество фармацевтически приемлемой соли, чтобы сделать композицию изотонической. Неограничивающие примеры носителя включают физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Предпочтительно приемлемые эксципиенты, носители или стабилизаторы являются нетоксическими в используемых дозах и концентрациях, включая буферы, такие как цитрат, фосфат и другие органические кислоты; солеобразующие противоионы, например натрий и калий; низкомолекулярные полипептиды (>10 аминокислотных остатков); белки, например сывороточный альбумин или желатин; гидрофильные полимеры, например поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как гистидин, глутамин, лизин, аспарагин, аргинин или глицин; углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; моносахариды; дисахариды; другие сахара, например сахарозу, маннит, трегалозу или сорбит; хелатирующие средства, например ЭДТА; неионные поверхностно-активные средства, например Tween, плуроники или полиэтиленгликоль; антиоксиданты, включая метионин, аскорбиновую кислоту и токоферол; и/или консерванты, например хлорид октадецилдиметилбензил-аммония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, например метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол; 3-пентанол и m-крезол. Подходящие носители и их составы более подробно описаны в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th ed., 1985, Mack Publishing Co. Композиция также может содержать по меньшей мере одно дополнительное активное соединение, такое как химиотерапевтическое средство.

Предпочтительно антитело, связывающая молекула, CD3⁺ лимфоцит и/или активное соединение включены в эффективном количестве. Термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для индукции детектируемого терапевтического ответа у индивидуума, которому будут вводить фармацевтическую композицию.

В восьмом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, кодирующему антитело по первому или второму аспекту или связывающую молекулу по третьему аспекту.

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим антитело, подвергнутым оптимизации, например, посредством оптимизации кодонов/РНК, замены гетерологичными сигнальными последовательностями и устранения элементов нестабильности мРНК. Способы получения оптимизированных нуклеиновых кислот, кодирующих антитело или его фрагмент (например, легкую цепь, тяжелую цепь, домен VH или домен VL) для рекомбинантной экспрессии посредством включения изменений кодонов и/или устранения ингибиторных областей в мРНК, что можно осуществлять посредством адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США №№ 5965726; 6174666; 6291664; 6414132 и 6794498. Например, потенциальные участки сплайсинга и элементы нестабильности (например, A/T- или A/U-богатые элементы) в РНК можно подвергать мутагенезу без изменения аминокислот, кодируемых последовательностями нуклеиновой кислоты, для повышения стабильности РНК для рекомбинантной экспрессии. При изменении используют вырожденность генетического кода, например использование альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления желательным может быть изменение одного или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например схожей аминокислоты с химической структурой и свойствами и/или функцией, схожими с исходной аминокислотой. Такие способы могут повышать экспрессию антитела или его фрагмента по меньшей мере в 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100 раз или более относительно экспрессии антитела, кодируемого полинуклеотидами, не подвергнутыми оптимизации.

В некоторых вариантах осуществления оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL

и/или домен V_H), может гибридизоваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, представленное в настоящем описании или его фрагмент (например, домен V_L и/или домен V_H). В некоторых вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании, или фрагмент, гибридизуется в условиях с высокой строгостью с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент. В конкретном варианте осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент, гибридизуется в условиях с высокой, промежуточной или низкой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент. Условия гибридизации описаны, например, в публикации патентной заявки США № US 2005/0048549 (например, параграфы 72-73).

Можно получать полинуклеотиды по изобретению и определять их нуклеотидную последовательность любым известным в этой области способом. Нуклеотидные последовательности, кодирующие антитела, представленные в настоящем описании, и модифицированные версии этих антител можно определять способами, хорошо известными в этой области, т.е. кодоны нуклеотида, как известно, кодирующие конкретные аминокислоты, собирают так, чтобы получать нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело. Такой полинуклеотид, кодирующий антитело, можно собирать из химически синтезированных олигонуклеотидов (например, как описано в Kutmeier G. et al., (1994), *BioTechniques* 17: 242-6), что, в кратком изложении, включает синтез перекрывающихся олигонуклеотидов, содержащих части последовательности, кодирующей антитело, отжиг и лигирование этих олигонуклеотидов, а затем амплификацию лигированных олигонуклеотидов посредством ПЦР.

Альтернативно, полинуклеотид, кодирующий антитело, представленное в настоящем описании, можно получать из нуклеиновой кислоты из подходящего источника (например, гибридомы) способами, хорошо известными в этой области (например, ПЦР и другими способами молекулярного клонирования). Например, ПЦР-амплификацию с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно осуществлять с использованием геномной ДНК, полученной из гибридомных клеток, продуцирующих интересующее антитело. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь антитела. Такие способы ПЦР-амплификации можно использовать для получения нуклеиновых кислот, содержащих последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи антитела. Амплифицированные нуклеиновые кислоты можно клонировать в векторы для экспрессии в клетках-хозяевах и для дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

Если клон, содержащий нуклеиновую кислоту, кодирующую конкретное антитело, недоступен, но известна последовательность молекулы антитела, нуклеиновую кислоту, кодирующую иммуноглобулин, можно химически синтезировать или получать из подходящего источника (например, библиотеки кДНК антитела или библиотеки кДНК или нуклеиновой кислоты, предпочтительно поли-A+ РНК, полученных из любой ткани или клеток, экспрессирующих антитело, таких как гибридомные клетки, выбранные для экспрессии антитела, представленного в настоящем описании) посредством ПЦР-амплификации с использованием синтетических праймеров, гибридизующихся с 3'- и 5'-концами последовательности, или посредством клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для конкретной последовательности гена, подлежащего идентификации, например клон кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные посредством ПЦР, затем можно клонировать в реплицирующиеся клонирующие векторы любым способом, хорошо известным в этой области.

ДНК, кодирующую антитела по изобретению, представленные в настоящем описании, легко можно выделять и секвенировать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, способных специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител). Гибридомные клетки могут служить источником такой ДНК. После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, которые затем трансфицируют в клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьяны COS, клетки яичника китайского хомяка (CHO) (например, CHO клетки из CHO GS System™ (Lonza)) или миеломные клетки, в ином случае не продуцирующие иммуноглобулиновый белок, для синтеза антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

Для получения полных антител праймеры для ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности V_H или V_L , участок рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты участка рестрикции, можно использовать для амплификации последовательностей V_H или V_L в клонах scFv или других клонах. Используя способы клонирования, известные специалистам в этой области, ПЦР-амплифицированные домены V_H можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например константную область γ_4 человека, и ПЦР-амплифицированные домены V_L

можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например константные области κ или λ человека. В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии доменов V_H или V_L содержат промотор, сигнал секреции, участок клонирования для вариабельной области, константные домены и селективный маркер, например, для неомидина. Домены V_H и V_L также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем векторы для конверсии тяжелой цепи и векторы для конверсии легкой цепи котрансфицируют в линии клеток для получения линий клеток, стабильно или транзитивно экспрессирующих полноразмерные антитела, например, IgG, способами, известными специалистам в этой области.

ДНК также можно модифицировать, например, посредством замены последовательностей мыши кодирующей последовательностью константных доменов тяжелой и легкой цепи человека или посредством ковалентного присоединения к кодирующей последовательности иммуноглобулина всей кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида или ее части.

Можно использовать сайт-специфический мутагенез или мутагенез высокой плотности вариабельной области или другие способы мутагенеза для оптимизации специфичности, аффинности и т.д. моноклонального антитела. В частности, в этой области известны стратегии созревания аффинности и стратегии перестановки цепей (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783), и их можно использовать для получения высокоаффинных антител человека.

В девятом аспекте изобретение относится к гибридной клетке, продуцирующей моноклональное антитело, соответствующее антителу по первому или второму аспекту.

В десятом аспекте изобретение относится к гибридоме, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

В одиннадцатом аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела по первому или второму аспекту, включающему выделение указанного антитела из гибридной клетки, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

В двенадцатом аспекте изобретение относится к способу идентификации или выделения клеток острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, клеток Т-клеточной лимфомы, клеток макроглобулинемии Вальденстрема или опухолеассоциированных макрофагов, включающему приведение образца клеток, содержащего указанные клетки, в контакт с моноклональным антителом по первому или второму аспекту или связывающей молекулой по третьему аспекту.

В основном, макрофаги являются наиболее многочисленными незлокачественными клетками в микроокружении опухоли. Считают, что эти опухолеассоциированные макрофаги (ТАМ) приобретают предопухолевый воспалительный и иммуносупрессорный фенотип и благоприятствуют резистентности к химиотерапии, ангиогенезу, подвижности клеток и интра/экстравазации. Таким образом, таргетинг ТАМ может представлять собой новую терапевтическую и еще не исследованную клиническую опцию для улучшения эффективности существующих способов лечения злокачественных новообразований.

Специалисту в этой области хорошо известны способы идентификации или выделения конкретных клеток, таких как клетки острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, клетки Т-клеточной лимфомы, клетки макроглобулинемии Вальденстрема или опухолеассоциированные макрофаги, с использованием антител или связывающих молекул, такие как способы на основе флуоресцентной сортировки клеток посредством проточной цитометрии, магнитного выделения клеток или сортировки отдельных клеток, например, с использованием клеточных сортеров.

В тринадцатом аспекте изобретение относится к способу получения $CD3^+$ лимфоцитов, НК-клеток, цитокин-индуцированных киллеров (CIK), гамма-дельта-лимфоцитов, НКТ-клеток или других иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор, соответствующий химерному антигенному рецептору по четвертому аспекту, включающему встраивание экспрессирующего вектора, соответствующего экспрессирующему вектору по пятому аспекту, в указанные $CD3^+$ лимфоциты, НК-клетки, цитокин-индуцированные киллеры (CIK), гамма-дельта-лимфоциты, НКТ-клетки или другие иммунные эффекторные клетки.

Это также включает возможность получения отдельной клетки или встраивания экспрессирующего вектора в отдельную клетку.

В четырнадцатом аспекте изобретение относится к способу идентификации или выделения $CD45^+$, $CD3^+$, $CD8^+$, $CD127^+$, $CCR7^+$ Т-лимфоцитов, включающему приведение образца клеток, содержащего указанные Т-лимфоциты, в контакт с антителом по первому или второму аспекту или связывающей молекулой по третьему аспекту.

Предпочтительным вариантом осуществления является антитело, соответствующее антителу по первому или второму аспекту, связывающая молекула по третьему аспекту, экспрессирующий вектор по пятому аспекту, $CD3^+$ лимфоцит, НК-клетка, цитокин-индуцированный киллер (CIK), гамма-дельта-лимфоцит, НКТ-клетка или другая иммунная эффекторная клетка по шестому аспекту или фармацевтическая композиция по седьмому аспекту для применения в способе лечения острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза или макроглобулинемии Вальденстрема.

Кроме того, также можно лечить другие злокачественные новообразования, при которых клетки экспрессируют эпителий, распознаваемый антителом по первому или второму аспекту изобретения.

Дополнительным предпочтительным вариантом осуществления является антитело по первому или второму аспекту или связывающая молекула по третьему аспекту для применения в способе идентификации или выделения CD45⁺, CD3⁺, CD8⁺, CD127⁺, CCR7⁺ Т-лимфоцитов.

Другим предпочтительным вариантом осуществления является антитело, соответствующее антителу по первому или второму аспекту, или связывающая молекула по третьему аспекту для применения в способе выделения или идентификации клеток острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, клеток Т-клеточной лимфомы, клеток макроглобулинемии Вальденстрема или опухолеассоциированных макрофагов.

Дополнительным предпочтительным вариантом осуществления является антитело, соответствующее антителу по первому или второму аспекту, или связывающая молекула по третьему аспекту для применения в способе диагностики острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза или макроглобулинемии Вальденстрема.

Кроме того, также можно диагностировать другие злокачественные новообразования, при которых клетки экспрессируют эпитоп, распознаваемый антителом по первому или второму аспекту изобретения. Далее изобретение описывают посредством чертежей и примеров, предназначенных для объяснения, а не ограничения изобретения.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - экспрессия эпитопа антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению, на мононуклеарных клетках периферической крови панели здоровых доноров и сравнение с известным из уровня техники антителом для детекции CD43.

На верхней диаграмме рассеяния представлены данные, полученные посредством проточной цитометрии. На оси x представлено определяемое прямое светорассеяние (FSC), на оси y представлено боковое светорассеяние (SSC). Каждая точка соответствует одной клетке.

На гистограмме ниже по оси x представлена интенсивность сигнала фикоэритрина. По оси y установлено соотношение интенсивностей сигнала и максимальной интенсивности сигнала неокрашенного образца, взятой за 100%. Незакрашенная кривая соответствует неокрашенному контролю, кривая, закрашенная горизонтальными линиями, соответствует клеткам, окрашенным рандомизированным IgG1 (т.е. отрицательный контроль), кривая, закрашенная перекрещивающимися линиями, соответствует клеткам, окрашенным mAb UN1 и кривая, закрашенная диагональными линиями, соответствует клеткам, окрашенным антителом против CD43.

Фиг. 2 - популяция клеток, распознаваемая антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой по изобретению.

На фиг. 2 показаны четыре диаграммы рассеяния. Две диаграммы рассеяния слева соответствуют лимфоцитам. Две диаграммы рассеяния справа соответствуют лимфоцитам, определяемым с помощью антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению.

На двух верхних диаграммах рассеяния ось x соответствует интенсивности сигнала CD4, в то время как ось y соответствует интенсивности сигнала CD8. На двух нижних диаграммах рассеяния ось x соответствует интенсивности сигнала CD45ro, а ось y соответствует интенсивности сигнала CCR7.

На фиг. 3 показаны две гистограммы. На верхней гистограмме представлена экспрессия эпитопа UN1, определяемого с помощью антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению (mAb UN1), на линии клеток BCWM.1. На нижней гистограмме представлена экспрессия UN1 на линии клеток MWCL.1. Незакрашенная кривая соответствует неокрашенному контролю, кривая, закрашенная горизонтальными линиями, соответствует клеткам, окрашенным вторичным mAb клетки, кривая, закрашенная вертикальными линиями, соответствует клеткам, окрашенным рандомизированным и вторичным IgG, и кривая, закрашенная диагональными линиями, соответствует клеткам, окрашенным mAb UN1.

Фиг. 4 - опухолеассоциированные макрофаги (TAM), распознаваемые антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой по изобретению. Белыми стрелками указаны TAM, инфильтрирующие образец колоректальной карциномы.

Фиг. 5 - полученные из THP1 макрофаги, окрашенные контрольным IgG1 в отсутствие опухолевых клеток (первый ряд), UMG1-CH (химерным антителом по второму аспекту настоящего изобретения, в котором исходную Fc-область мыши заменяли полностью человеческой Fc-областью IgG1) в отсутствие опухолевых клеток (второй ряд) и UMG1-CH в присутствии линии клеток рака поджелудочной железы PANC1 (третий ряд и, в частности, слева). Первая колонка соответствует окрашиванию DAPI, вторая колонка - окрашиванию антителом с меченым Alexa Fluor 488 вторичным антителом, а третья колонка представляет собой наложение изображений.

Фиг. 6 - результаты анализа дегрануляции для оценки ADCC в линиях клеток HPB-ALL (левая диаграмма) и H9 (правая диаграмма). Числа по оси x соответствуют различным образцам, представляющим собой отсутствие мишени (1), E+T (2), отрицательный контроль (NC) 200 мкг/мл (3), UMG1-CH 10 мкг/мл (4), UMG1-CH 50 мкг/мл (5), UMG1-CH 100 мкг/мл (6), UMG1-CH 200 мкг/мл (7), положительный контроль (PC) 200 мкг/мл (8). По оси y показана процентная доля CD107a⁺ NK-клеток, подвергнутых ADCC, относительно общего количества тестируемых CD107a⁺ NK-клеток на образец.

Фиг. 7 - результаты анализа дегрануляции для оценки ADCC в линии клеток BCWM.1. Числа по оси x соответствуют различным образцам. Нумерация соответствует нумерации на фиг. 6. По оси y показана процентная доля CD107a⁺ NK-клеток, подвергнутых ADCC, относительно общего количества тестируемых CD107a⁺ NK-клеток на образец.

Фиг. 8 - CD3⁺-экспрессирующие лимфоциты (CAR-T) были способны высвобождать значимо более высокие количества интерферона гамма (ИФН γ) в присутствии клеток H9. По оси y показана концентрация экспрессируемого ИФН γ в нг/мл. По оси x показаны: нетрансдуцированные Т-клетки (1), Т-клетки, трансдуцированные с использованием контрольного CAR (2), и Т-клетки, трансдуцированные с использованием UMG-1 CAR (3).

Фиг. 9 - CAR-T были способны высвобождать значимо более высокие количества интерлейкина 2 (ИЛ-2) в присутствии клеток H9. По оси y показана концентрация экспрессируемого ИЛ-2 в нг/мл. По оси x показаны: нетрансдуцированные Т-клетки (1), Т-клетки, трансдуцированные с использованием контрольного CAR (2), и Т-клетки, трансдуцированные с использованием UMG-1 CAR (3).

Фиг. 10 - CAR-T были способны индуцировать селективный цитоллиз клеток H9. По оси y показано соотношение погибших/живых клеток. По оси x показаны только H9 (1), H9 в присутствии нетрансдуцированных Т-клеток (2), H9 в присутствии Т-клеток, трансдуцированных с использованием контрольного CAR (3), и H9 в присутствии Т-клеток, трансдуцированных с использованием UMG-1 CAR (4).

Фиг. 11 - показаны кривые объема опухоли в эксперименте *in vivo*, в котором контрольный IgG1 сравнивали с гуманизированной версией UN1-mAb (h-UN1) и афукозилированной версией UN1-mAb (a-h-UN1)



Следующие примеры представлены в целях иллюстрирования изобретения, и не следует истолковывать их как его ограничение. Примеры включают технические признаки, и следует понимать, что изобретение также относится к любым комбинациям технических признаков, представленных в разделе Примеры.

Пример 1. Экспрессия эпитопа антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению, на мононуклеарных клетках периферической крови панели здоровых доноров и сравнение с известным из уровня техники антителом для детекции CD43.

Сначала с помощью разделения в градиенте фиколла получали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) разных здоровых доноров. Затем клетки высевали в пробирки 5 мл и окрашивали 1 мкг/мл mAb, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой в ICLC под регистрационным номером ICLC PD № 16001 (mAb UN1), или 1 мкг/мл рандомизированного антитела IgG1 мыши в 100 мкл раствора для связывания (фосфатно-солевой буфер (PBS)+0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS)) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки 2 раза промывали раствором для связывания и окрашивали конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) вторичным антителом при 4°C в темноте в течение 30 мин. Затем клетки 2 раза промывали раствором для связывания и анализировали с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific). Одну пробирку для каждого донора оставляли неокрашенной и одну пробирку для каждого донора окрашивали только FITC-конъюгированным вторичным антителом. В целом, антитело, продуцируемое гибридной клеткой, депонируемой по изобретению, могло распознавать различные субпопуляции лимфоцитов (диапазон: 0-15%) разных доноров. Кроме того, не наблюдали какой-либо реактивности в отношении всех других популяций клеток в PBMC, включая клетки миелоидного происхождения, являвшиеся, таким образом, отрицательными по экспрессии соответствующего антигена (см. фиг. 1, сверху).

И наоборот, при анализе тех же PBMC на экспрессию CD43 с использованием коммерческого клона (S7 от Beckton Dickinson) обнаруживали, что все лимфоциты и миелоидные клетки были положительными (см. фиг. 1, внизу).

Таким образом, антитело, продуцируемое гибридной клеткой, депонируемой по изобретению, демонстрирует специфический ограниченный профиль реактивности и свойства, которых не имеют уже существующие антитела против CD43.

Пример 2. Популяция клеток, распознаваемая антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой по изобретению.

Для характеристики субпопуляции лимфоцитов с помощью антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению, авторы настоящего изобретения осуществляли иммуномагнитную сортировку соответствующих лимфоцитов (Easysep do-it-yourself, Stemcell technologies). В кратком изложении, 15 мкг антитела смешивали с компонентами, предоставленными производителем, для получения раствора, готового для иммуномагнитного разделения. Этот раствор добавляли к PBMC 3 различных доноров, определяя по меньшей мере 10% лимфоцитов с помощью антитела после блокиро-

вания FcR, и клетки инкубировали при комнатной температуре (r.t.) в течение 15 мин. Затем в раствор добавляли магнитные наночастицы EasySep® и инкубировали клетки еще в течение 10 мин при r.t. Затем раствор помещали в магнит и удаляли несвязавшиеся клетки. Клетки, определяемые с помощью антитела по изобретению, главным образом, представляли собой CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁺CD127⁺CCR7⁺ Т-лимфоциты, при этом большинство из них являются CD45ro⁻ (см. фиг. 2 и табл. 1).

Таблица 1

Маркер антиген UN1-положительных клеток

| МАРКЕР | +/- |
|--------|-----|
| CD45 | + |
| CD3 | + |
| CD4 | + |
| CD8 | - |
| CD127 | + |
| CCR7 | + |
| CD45ra | + |
| CD56 | - |

Пример 3. Антитело, продуцируемое гибридной клеткой, депонируемой по изобретению (mAb UN1), распознает линии клеток Т-ALL и макроглобулинемии Вальденстрема.

Различные линии злокачественных клеток (табл. 2) оценивали на экспрессию UN1 (ММ: множественная миелома). В кратком изложении, клетки высевали в пробирки 5 мл и окрашивали 1 мкг/мл mAb UN1 или 1 мкг/мл рандомизированного антитела IgG1 мыши в 100 мкл раствора для связывания (фосфатно-солевой буфер (PBS)+0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS)) и инкубировали при 4°C в течение 30 мин. Затем клетки 2 раза промывали раствором для связывания и окрашивали с помощью конъюгированного с флуоресцеинизотиоцианатом (FITC) вторичного антитела при 4°C в темноте в течение 30 мин. Затем клетки 2 раза промывали раствором для связывания и анализировали с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific). Одну пробирку для каждой линии клеток оставляли неокрашенной и одну пробирку для каждой линии клеток окрашивали только FITC-конъюгированным вторичным антителом. Наблюдали, что все линии клеток Т-ALL, принадлежащего к классу EGIL T3, и макроглобулинемии Вальденстрема (фиг. 3) были положительными по экспрессии UN1.

Таблица 2

Экспрессия UN1 в линиях злокачественных клеток

| Линии клеток | Тип злокачественного новообразования | UN1 +/- |
|--------------|--------------------------------------|---------|
| H929 | ММ | - |
| AMO | ММ | - |
| U266 | ММ | - |
| KMS11 | ММ | - |
| 8226 | ММ | - |
| BCWM.1 | WM | + |
| MWCL.1 | WM | + |
| H9 | Т-клеточная лимфома | + |

| | | |
|---------|--------------------------|-----|
| HPB-ALL | T-ALL | + |
| MOLT-4 | T-ALL | + |
| JURKAT | T-ALL | - |
| CEM | T-ALL | +/- |
| HSB2 | T-ALL | - |
| Thp1 | Моноцитарный лейкоз | - |
| MOJ | Глиобластома | - |
| SKMEL | Меланома | - |
| HCC | Рак молочной железы | - |
| MCF-7 | Рак молочной железы | - |
| 5637 | Рак мочевого пузыря | - |
| CAPAN 1 | Рак поджелудочной железы | - |
| BXPC 3 | Рак поджелудочной железы | - |

Пример 4. Антитело, продуцируемое гибридомной клеткой, депонируемой по изобретению (mAb UN1), распознает опухлеассоциированные макрофаги.

Как описано ранее, CD43 является специфическим маркером лейкоцитов, в основном ограниченными различными клетками гемопоэтического ростка. Обнаруживали, что специфический эпитоп, связываемый mAb UN1 находящийся на изоформе CD43, экспрессируется опухлеассоциированными макрофагами (TAM) на высоком уровне.

Оценивая образцы различных типов злокачественных новообразований посредством иммуногистохимии (табл. 3, фиг. 4), наблюдали, что UN1 + макрофаги в большом количестве инфильтрируют большинство опухолей, при этом особенно высокую степень инфильтрации наблюдают при раке поджелудочной железы и раке яичников.

Кроме того, с помощью модели дифференцировки макрофагов оценивали, изменяется ли экспрессия UN1 в присутствии или отсутствие сокультивируемых злокачественных клеток.

Для этой цели использовали клетки моноцитарного лейкоза THP1, которые, как показано ранее, не экспрессируют UN1. Для получения дифференцированных неполяризованных макрофагов MO человека (THP1-M) эти клетки культивировали в течение 48 ч в соответствующей полной среде в присутствии 50 нг/мл форбол-12-миристат-13-ацетата (PMA). Затем среды заменяли свежей средой без PMA. На этой стадии в выбранные лунки добавляли клетки рака поджелудочной железы PANC1 в соотношении 1:1 на 48 ч. Затем все клетки подготавливали к иммунофлуоресцентному анализу. В кратком изложении, после фиксации THP1-M окрашивали с помощью UMG1-CN или контрольного IgG1 человека и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем FITC-конъюгированное вторичное mAb против человека добавляли к клеткам на 2 ч. После промывки к клеткам добавляли заливочную среду против выгорания с DAPI (Vectashield, Vectorlabs) и накрывали покровными стеклами для считывания.

Как показано на фиг. 5 справа, полученные из THP1 макрофаги, окрашенные контрольным IgG1, были полностью отрицательными, в то время как окрашенные UMG1-CN были слабоположительными. Примечательно, что в присутствии PANC1 полученные из THP1 макрофаги становятся светлыми по экспрессии UN1. В частности, показано взаимодействие между полученными из THP1 макрофагами (белая стрелка) и PANC1 (красная стрелка) (фиг. 5, слева). Эти результаты свидетельствуют о том, что специфический эпитоп UN1 подвергается значительной положительной регуляции, когда макрофаги сокультивируют со злокачественными клетками, и они взаимодействуют с ними в микроокружении опухоли. Эта положительная регуляция важна сама по себе как хорошо представленная мишень для терапевтических подходов, сфокусированных на удалении опухлеассоциированных макрофагов. Помимо этого важного потенциального использования в качестве терапевтического инструмента, mAb UN1 также может быть полезным для детекции, анализа прогностической роли и прогностических исследований.

Таблица 3

| Инфильтрация различных опухолей UN1 ⁺ TAM | |
|--|--|
| Тип злокачественного новообразования | Инфильтрация UN1 ⁺ TAM (+: низкая; ++: средняя; +++: высокая) |
| Лимфома Ходжкина | + |
| Неходжкинская лимфома | ++ |

| | |
|---------------------------|-----|
| Плазмоцитома | ++ |
| Колоректальный рак | + |
| Рак поджелудочной железы | +++ |
| Рак легких | ++ |
| Рак предстательной железы | + |
| Рак молочной железы | ++ |
| Рак яичников | +++ |
| Рак мочевого пузыря | ++ |
| Меланома | ++ |

Пример 5. Химерное mAb UMG1-CH (по второму аспекту настоящего изобретения) является активным иммунотерапевтическим инструментом в случае острых Т-клеточных лимфобластных лейкозов/лимфобластных лимфом.

Для определения потенциальной активности mAb UMG1-CH в качестве иммунотерапевтического инструмента сначала оценивали его способность индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В связи с этим осуществляли анализ дегрануляции посредством сокультивирования PBMC здоровых доноров (эффекторных клеток) с линиями клеток HPB-ALL или H9 T-ALL (клетками-мишенями) в присутствии различных концентраций mAb UMG1-CH следующим образом.

4×10^4 клеток-мишеней высевали в 96-луночный круглодонный планшет и культивировали в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ в присутствии различных концентраций mAb UMG1-CH (0, 10, 50, 100, 200 мкг/мл) или химерного отрицательного или положительного контрольного (NC и PC, соответственно, по 200 мкг/мл каждого) IgG1 в наиболее высокой дозе (200 мкг/мл). Затем $0,4 \times 10^6$ PBMC (фиксированное соотношение E:T=10:1) того же донора добавляли в каждую лунку вместе с 20 мкл/мл PE-конъюгированного mAb против CD107a (BD), а затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 3 ч. Через 1 ч в каждую лунку добавляли 6 мкг/мл монензина (GolgiStop, BD). К концу периода инкубации клетки окрашивали APC-конъюгированным антителом против CD56 и PerCp-конъюгированным антителом против CD3 и анализировали с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific).

Обнаруживали, что CD3⁺/CD56⁺/CD107a⁺ клетки значительно повышались в зависимости от концентрации mAb UMG1-CH, что, таким образом, подтверждает потенциал mAb UMG1-CH в качестве индуктора ADCC (фиг. 6).

Эти данные позволяют создавать подходы иммунного таргетинга, соответствующие неотложной и неудовлетворенной клинической потребности в случае острых Т-клеточных лимфобластных лейкозов/лимфобластных лимфом.

Пример 6. Химерное mAb UMG1-CH (по второму аспекту настоящего изобретения) является активным иммунотерапевтическим инструментом в случае макроглобулинемии Вальденстрема.

Для исследования иммунотерапевтического потенциала mAb UMG1-CH авторы настоящего изобретения оценивали его способность индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC). В связи с этим авторы настоящего изобретения осуществляли анализ дегрануляции посредством сокультивирования очищенных NK-клеток здоровых доноров (эффекторных клеток) и линии клеток BCWM.1 (клеток-мишеней) в присутствии различных концентраций mAb UMG1-CH или отрицательных/положительных контролей. Авторы настоящего изобретения выбрали mAb цетуксимаб в качестве отрицательного контроля и mAb ритуксимаб в качестве положительного контроля. В частности, 10^5 клеток-мишеней высевали в 96-луночный круглодонный планшет и культивировали в течение 30 мин при 37°C и 5% CO₂ в присутствии различных концентраций mAb UMG1-CH (0, 10, 50, 100, 200 мкг/мл), 200 мкг/мл цетуксимаба или 200 мкг/мл ритуксимаба. Затем 10^5 NK-клеток (фиксированное соотношение E:T=1:1) того же донора добавляли в каждую лунку вместе с 20 мкл/мл PE-конъюгированного mAb против CD107a (BD), а затем инкубировали клетки при 37°C и 5% CO₂ в течение 2 ч. Через 1 ч в каждую лунку добавляли 6 мкг/мл монензина (GolgiStop, BD). В конце периода инкубации клетки окрашивали APC-конъюгированным антителом против CD56 и PerCp-конъюгированным антителом против CD3 и анализировали с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific). Обнаруживали, что CD3⁺/CD56⁺/CD107a⁺ клетки значимо повышались в зависимости от концентрации mAb UMG1-CH, достигая точно такого же эффекта, как в случае ритуксимаба, что, таким образом, подтверждает потенциал mAb в качестве индуктора ADCC (фиг. 7).

Пример 7. Химерный антигенный рецептор (CAR)-UMG1 индуцирует значительную цитотоксичность против клеток, экспрессирующих эпитоп антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению.

Для дальнейшего улучшения иммунотерапевтического потенциала антитела, продуцируемого гибридной клеткой, депонируемой по изобретению, в качестве иммунотерапевтического инструмента

разрабатывали CAR третьего поколения. В частности, CAR-T получали посредством соединения внеклеточного домена, состоящего из scFv, полученного из последовательности антитела, с внутриклеточной областью, состоящей из цепи CD3 ζ , сигнальной области TCR и 2 костимуляторных доменов, CD28 и 4-1BB, чтобы, таким образом, имитировать физиологическую активацию Т-клеток. В связи с этим для получения лентивирусного вектора антитело scFv с 3 выбранными костимуляторными доменами клонировали в каскету CAR. Затем вирусные частицы использовали для трансдукции CD3⁺ лимфоцитов здоровых доноров при множественности заражения (MOI) 5 и оценивали эффективность трансдукции посредством проточной цитометрии (приблизительно 38%). В конечном итоге CAR-T против эпитопа антитела анализировали на способность высвобождать ИФН γ и ИЛ-2 в присутствии клеток-мишеней и селективную цитотоксичность. Как показано на фиг. 8 и 9, CAR-UMG1 могли высвобождать значимо более высокие количества интерферона гамма (ИФН γ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2) только в присутствии клеток H9. Кроме того, только CAR-UMG1 могли индуцировать селективный цитолиз клеток H9 (см. фиг. 10), что, таким образом, свидетельствует о способности полученного CAR распознавать клетки H9 и индуцировать активацию Т-клеток.

Пример 8. В этом примере приведены кривые объема опухоли в эксперименте *in vivo*, в котором контрольный IgG1 сравнивали с гуманизированной версией UN1-mAb (h-UN1) и афукозилированной версией UN1-mAb (a-h-UN1). В этом эксперименте 15 мышам NOD-SCID-g-chain-null (NSG) подкожно пересаживали 5×10^6 клеток HPB-ALL. Затем мышей случайным образом распределяли по группам для еженедельного интраперитонеального введения 15 мг/кг контрольного IgG1, h-UN1 или a-h-UN1 со дня 1 до гибели, достижения объема опухоли >2000 мм³ или неприемлемой токсичности. Объем опухоли оценивали через день, и средний объем для каждой группы в каждый момент времени приведен на фиг. 11. Начиная со дня 29, в случае h-UN1 и a-h-UN1 наблюдали значимое снижение бремени заболевания, что подтверждает высокую активность *in vivo* обоих антител.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Моноклональное антитело мыши, которое специфически связывается с CD43, где указанное антитело продуцируется гибридомной клеткой, депонированной в ICLC под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

2. Антитело или его фрагмент, которое специфически связывается с CD43, содержащее варибельную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и варибельную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH, YISSGSGNFYYVDTVKG, STYYHGSRGAMDY, SASSSVSSMYWY, DTSKMAS и QQWSSYPPII соответственно.

3. Антитело или его фрагмент по п.2, где антитело является моноклональным, человеческим, химерным или гуманизированным антителом.

4. Антитело или его фрагмент по п.3, где антитело способно индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против клеток подгруппы EGIL T3 острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза (Т-ALL), клеток Т-клеточной лимфобластной лимфомы и клеток макроглобулинемии Вальденстрема (WM).

5. Антитело или его фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело распознает эпитоп, содержащий GalNAc, являющийся O-связанным с CD43 человека.

6. Антитело или его фрагмент по п.2, где антитело или его фрагмент выбраны из группы, состоящей из scFv, мультимера scFv, подобного диателу, триателу или тетрателу, фрагментов антител, предпочтительно Fab, TandAb и флекситела.

7. Биспецифическое антитело, содержащее антитело или его фрагмент по любому из пп.2-6.

8. Химерный антигенный рецептор, содержащий антитело или его фрагмент по п.6, соединенное с внутриклеточным доменом, содержащим один или более сигнальных доменов.

9. Экспрессирующий вектор, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, которая кодирует химерный антигенный рецептор по п.8, антитело по любому из пп.1-7.

10. Вектор по п.9, где вектор является вирусным или невирусным.

11. Вектор по п.10, где вирусный вектор является лентивирусным вектором.

12. CD3⁺ лимфоцит, содержащий химерный антигенный рецептор по п.8 или экспрессирующий вектор по любому из пп.9-11.

13. NK-клетка, содержащая химерный антигенный рецептор по п.8 или экспрессирующий вектор по любому из пп.9-11.

14. Цитокин-индуцированная киллерная клетка (CIK), содержащая химерный антигенный рецептор по п.8 или экспрессирующий вектор по любому из пп.9-11.

15. γ - δ -Лимфоцит, содержащий химерный антигенный рецептор по п.8 или экспрессирующий вектор по любому из пп.9-11.

16. NKT-клетка, содержащая химерный антигенный рецептор по п.8 или экспрессирующий вектор

по любому из пп.9-11.

17. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело по любому из пп.1-6, или биспецифическую молекулу по п.7, или $CD3^+$ лимфоцит по п.12, НК-клетку по п.13, цитокин-индуцированный киллер (CIK) по п.14, γ - δ -лимфоцит по п.15 или NKT-клетку по п.16.

18. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело по любому из пп.2-6 или биспецифическое антитело по п.7.

19. Способ получения моноклонального антитела по любому из пп.1-6, где способ включает выделение указанного антитела из гибридомной клетки, депонированной в ICLC под регистрационным номером ICLC PD № 16001.

20. Способ идентификации или выделения $CD45^+$, $CD3^+$, $CD8^-$, $CD127^+$, $CCR7^+$ Т-лимфоцитов, включающий приведение образца клетки, содержащего указанные Т-лимфоциты, в контакт с антителом по любому из пп.1-6 или биспецифическим антителом по п.7, таким образом, идентифицируя или выделяя $CD45^+$, $CD3^+$, $CD8^-$, $CD127^+$, $CCR7^+$ Т-лимфоциты.

21. Способ идентификации или выделения клеток острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, клеток Т-клеточной лимфомы, клеток макроглобулинемии Вальденстрема или опухолеассоциированных макрофагов, включающий приведение образца клеток, содержащего указанные клетки, в контакт с моноклональным антителом по любому из пп.1-6 или биспецифическим антителом по п.7, таким образом, идентифицируя или выделяя $CD45^+$, $CD3^+$, $CD8^-$, $CD127^+$, $CCR7^+$ Т-лимфоциты.

22. Способ получения $CD3^+$ лимфоцитов, НК-клеток, цитокин-индуцированных киллеров (CIK), γ - δ -лимфоцитов или NKT-клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор по п.8, включающий встраивание экспрессирующего вектора по любому из пп.9-11 в указанные $CD3^+$ лимфоциты, НК-клетки, цитокин-индуцированные киллеры (CIK), γ - δ -лимфоциты или NKT-клетки.

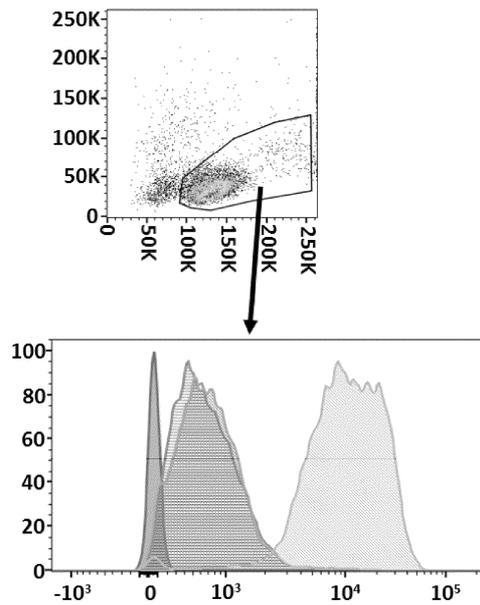
23. Применение антитела по любому из пп.1-7, экспрессирующего вектора по любому из пп.9-11, $CD3^+$ лимфоцита по п.12, НК-клетки по п.13, цитокин-индуцированного киллера (CIK) по п.14, γ - δ -лимфоцита по п.15 или NKT-клетки по п.16 или фармацевтической композиции по п.17 в способе лечения острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза или макроглобулинемии Вальденстрема.

24. Применение антитела по любому из пп.1-7 в способе идентификации или выделения $CD45^+$, $CD3^+$, $CD8^-$, $CD127^+$, $CCR7^+$ Т-лимфоцитов.

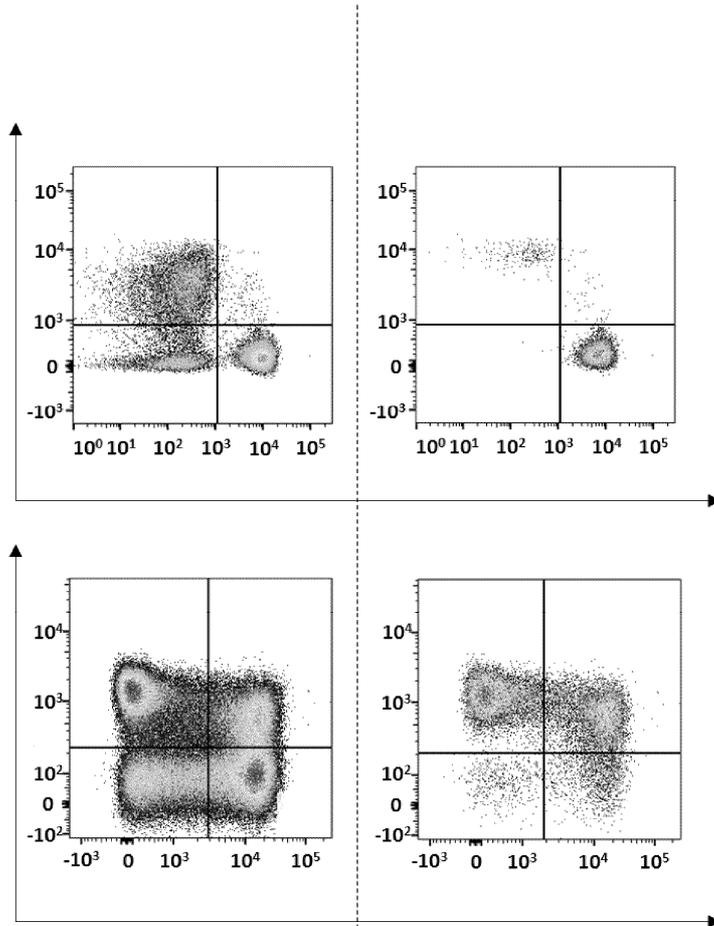
25. Применение антитела по любому из пп.1-7 в способе выделения или идентификации клеток острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза, клеток Т-клеточной лимфомы, клеток макроглобулинемии Вальденстрема или опухолеассоциированных макрофагов.

26. Применение антитела по любому из пп.1-7 в способе диагностики острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза или макроглобулинемии Вальденстрема.

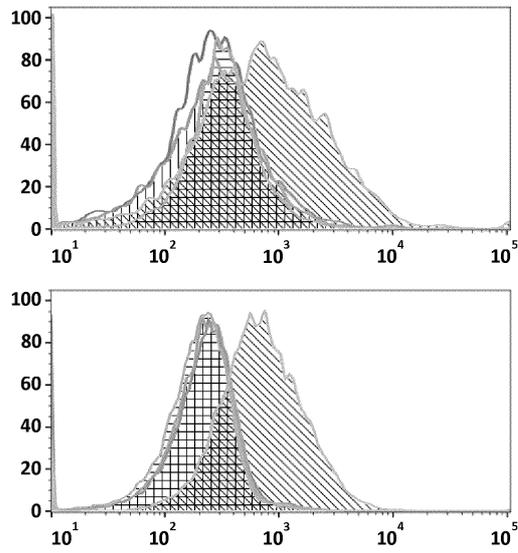
27. Гибридома, депонированная в ICLC под регистрационным номером ICLC PD № 16001, которая продуцирует моноклональное антитело по любому из пп.1-6.



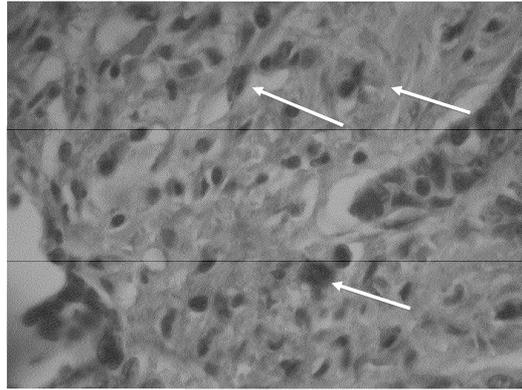
Фиг. 1



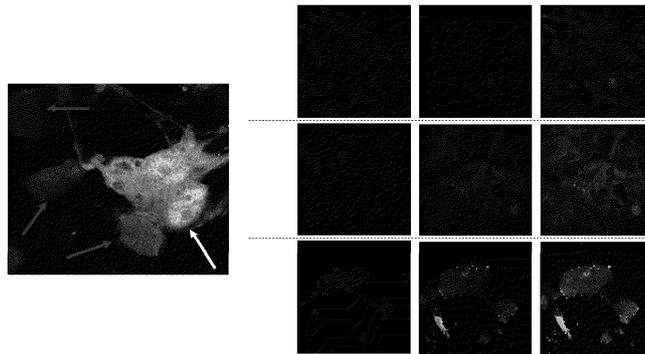
Фиг. 2



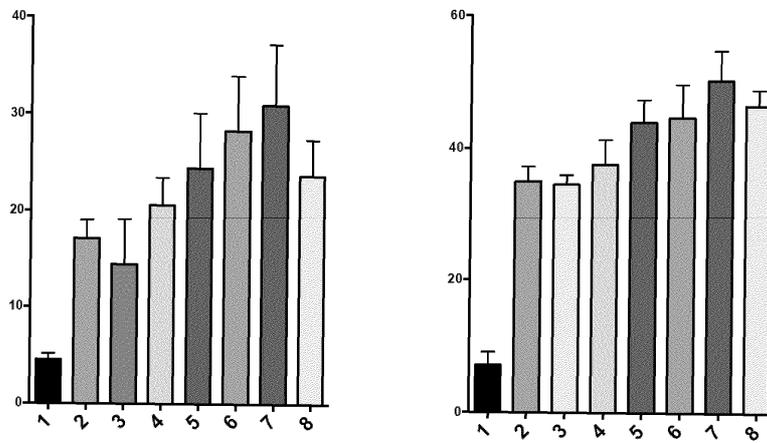
Фиг. 3



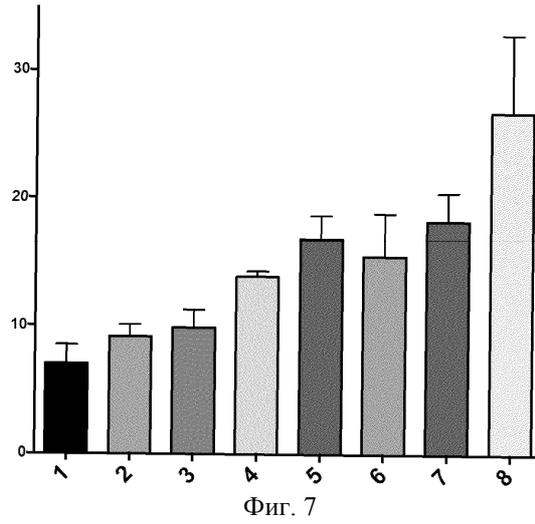
Фиг. 4



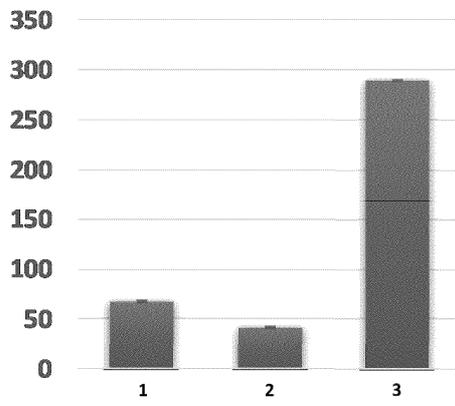
Фиг. 5



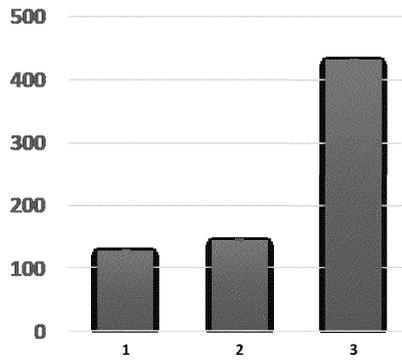
Фиг. 6



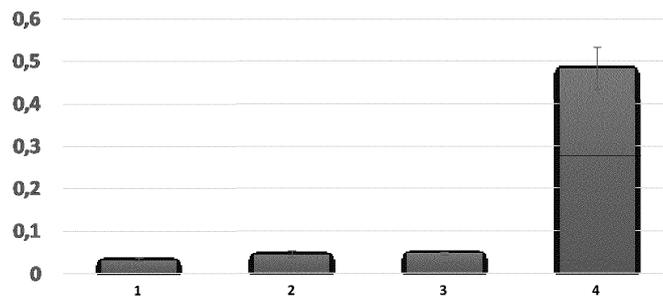
Фиг. 7



Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10

