

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **041205**

(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2022.09.27**

**(21)** Номер заявки  
**202092122**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2019.03.06**

**(51)** Int. Cl. **A61K 39/395** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)  
**C07K 16/30** (2006.01)  
**C07K 16/32** (2006.01)

---

**(54) АНТИТЕЛА ПРОТИВ TIP-1 И ИХ ПРИМЕНЕНИЯ**

---

**(31)** **62/640,123**

**(32)** **2018.03.08**

**(33)** **US**

**(43)** **2020.12.03**

**(86)** **PCT/US2019/020867**

**(87)** **WO 2019/173417 2019.09.12**

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
**ФЕЙНЗ ТЕРАПЬЮТИКС, ИНК. (US)**

**(72)** Изобретатель:  
**Ван Минхань, Цзоу Хой, Оукс Джошуа (US)**

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

**(56)** **WO-A1-2015116653**

YAN et al. "Anti-tax interacting protein-1 (TIP-1) monoclonal antibody targets human cancers," Oncotarget, 30 May 2016 (30.05.2016), Vol. 7, No 28, Pgs. 43352-43362, entire document

WANG et al. "TIP-1 Translocation onto the Cell Plasma Membrane is a Molecular Biomarker of Tumor Response to Ionizing Radiation," PLoS One, 11 August 2010 (11.08.2010), Vol. 5, Iss. 8, e12051, Pgs. 1-12, entire document

HALLAHAN, D.E. "3130: Antibodies Targeted to Radiation Inducible Neoantigens in Cancer," 01 October 2011 (01.10.2011), Vol. 81, Iss. 2, Supplement, Abstract 3130, Pg. S751, entire document

HALLAHAN et al. "PO-0981: Activation of immune cells and enhanced efficacy of radiotherapy by anti-TIP1 antibodies in cancer," ESTRO 35, Radiotherapy and Oncology, 29 April 2016 (29.04.2016), Vol. 119, Supplement 1, Pg. S447, entire document

KAPOOR et al. "5615: Antibodies targeting TIP1 enhance the efficacy of radiotherapy in lung cancer and glioblastoma," Proceedings of the American Association for Cancer Research Annual Meeting 2018, Cancer Research, 14 April 2018 (14.04.2018), Vol. 78, Iss. 13, Abstract 5615, Pg. 1 of 1, entire document

---

**(57)** Описаны антитела против TIP-1 и их антигенсвязывающие фрагменты. Описаны также нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела, композиции, содержащие антитела, способы получения антител и способы применения антител для лечения или предотвращения заболеваний, таких как злокачественная опухоль.

---

**B1**

**041205**

**041205 B1**

### Перекрестная ссылка на родственные заявки

По настоящей заявке испрашивается приоритет предварительной патентной заявки США No 62/640123, поданной 8 марта 2018 г., полное содержание которой приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

### Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к моноклональным антителам против TIP-1, к нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Настоящее изобретение относится также к способам получения антител и к способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественные опухоли.

### Ссылка на список последовательностей, принятый в электронной форме

Настоящая заявка содержит список последовательностей, принятый в электронной форме через EFS-Web как список последовательностей в формате ASCII с наименованием файла "689204-8WO Sequence Listing" и датой создания 1 марта 2019 г. и имеющий размер 4 кБ. Список последовательностей, принятый через EFS-Web, составляет часть описания, и его полное содержание приведено в настоящем описании в качестве ссылки.

### Уровень техники для изобретения

Взаимодействующий с tax белок 1 (TIP-1, также известный как Tax1bp3 или взаимодействующий с глутаминазой белок, GIP) представляет собой содержащий домен PDZ (гомологичный PSD-95/Discs large/ZO-1) внутриклеточный белок (124 аминокислот у человека и мыши). Один домен PDZ, включающий остатки 13-112 из 124-аминокислотного белка (Olalla, et al., FEBS Lett 2001; 488:116-122) является единственной функциональной и структурной единицей, которую можно идентифицировать в TIP-1, что позволяет предполагать, что TIP-1 является уникальным среди содержащих PDZ белков и может осуществлять свою функцию единственно посредством белок-белковых взаимодействий.

TIP-1 взаимодействует с множеством внутриклеточных белков посредством домена PDZ, включая глутаминазу L, Р-катенин, FAS, HTLV Tax, HPV E6, ротекин и Kir 2.3 (Zoetewey et al., Biochemistry 2011; 50:3528-3539). Однако, точная биологическая функция TIP-1 остается неясной. Увеличенную экспрессию TIP-1 детектировали в клетках инвазивной злокачественной опухоли молочной железы человека и показали, что она связана с адгезией, миграцией клеток опухоли и метастазированием в легкие (Han et al., Biochem Biophys Res Commun 2012; 422:139-145).

Недавно обнаружено, что TIP-1 транслоцируется к поверхности клеток злокачественных опухолей после индукции посредством облучения (Yan et al., Oncotarget 2016; 7:43352-43362), что позволяет предполагать, что TIP-1 может являться неоантигеном злокачественной опухоли после индукции. Таким образом, моноклональное антитело (mAb) против TIP-1 можно использовать, чтобы нацеливать на клетки злокачественных опухолей с избирательностью и чтобы служить в качестве потенциального терапевтического средства.

### Краткое изложение сущности изобретения

В одном общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связывают TIP-1.

Настоящее изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из

а) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TIP-1, предпочтительно, TIP-1 человека.

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2.

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит

а) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2.

В конкретных вариантах осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли посредством антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) и/или комплементзависимой цитотоксичности (CDC) посредством связывания TIP-1 на клеточной поверхности, и/или опосредовать привлечение конъюгированных лекарственных средств, и/или формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом с эффектом уничтожения злокачественной опухоли.

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В конкретных вариантах осуществления выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

Настоящее изобретение относится также к выделенным нуклеиновым кислотам, кодирующим моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к векторам, содержащим выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

Настоящее изобретение относится также к клеткам-хозяевам, содержащим векторы, содержащие выделенные нуклеиновые кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению.

В конкретных вариантах осуществления, настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится также к способам лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающим введение субъекту фармацевтических композиций по изобретению. Злокачественная опухоль может представлять собой любую жидкую или солидную злокачественную опухоль, например, она может быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжкинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

Настоящее изобретение относится также к способам получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению. Способы включают культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Настоящее изобретение относится также к способам получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Способы включают объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Настоящее изобретение относится также к способам определения уровня TIP-1 у субъекта. Способы включают

- (a) получение образца от субъекта;
- (b) приведение образца в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению;
- (c) определение уровня TIP-1 у субъекта. Образец может, например, представлять собой образец ткани или образец крови. Образец ткани может, например, представлять собой образец ткани злокачественной опухоли.

#### **Краткое описание чертежей**

Приведенное выше краткое изложение сущности изобретения, так же, как следующее подробное описание предпочтительных вариантов осуществления настоящего изобретения, станет лучше понятным при чтении в сочетании с прилагаемыми чертежами. Следует понимать, однако, что изобретение не ограничено точными вариантами осуществления, показанными на чертежах.

На фиг. 1 показано связывание очищенного мышинового mAb против TIP-1 T2 с TIP-1-Мус-DDK в анализе ELISA. Исползованные концентрации mAb T2 составляли (слева направо на графике): 500 нг/мл, 20 нг/мл, 5 нг/мл и 1 нг/мл соответственно; только 2-е Ab, группу не обрабатывали первичными антителами, но обрабатывали конъюгированными с HRP вторичными Ab против IgG мыши; без антитела, не добавляли ни первичное Ab, ни 2-е Ab.

На фиг. 2 показано связывание химерного mAb против TIP-1 (мышиных VH и VL, слитых с константными областями IgG1 и цепи каппа человека соответственно) T2 в анализе ELISA; исползованные концентрации химерного mAb T2 составляли (слева направо на графике): 18 нг/мл, 4 нг/мл и 1 нг/мл соответственно; только 2-е Ab, группу не обрабатывали первичными антителами, но обрабатывали конъюгированными с HRP вторичными Ab против IgG мыши; без антитела, не добавляли ни первичное Ab, ни 2-е Ab.

#### **Подробное описание изобретения**

Различные публикации, статьи и патенты процитированы или описаны в разделе уровень техники и на протяжении описания; полное содержание каждой из этих ссылок приведено в настоящем описании в качестве ссылки. Обсуждение документов, актов, материалов, устройств, изделий или т.п., которое включено в настоящее описание, приведено с целью предоставления контекста по изобретению. Такое

обсуждение не является признанием того, что любой или все из этих объектов составляют часть предшествующего уровня техники, применительно к любым описанным или заявленным изобретениям.

Если не определено иное, все технические и научные термины, используемые в настоящем описании, имеют такое же значение, которое является общепринятым для специалиста в области, к которой относится настоящее изобретение. В ином случае, конкретные термины, используемые в настоящем описании, имеют значения, как указано в описании.

Следует отметить, что, как используют в настоящем описании и в прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают объекты ссылки множественного числа, если контекст явно не требует иного.

Если не указано иное, любые числовые значения, такие как концентрация или диапазон концентраций, описанные в настоящем описании, следует понимать, как модифицированные во всех случаях термином "приблизительно". Таким образом, числовое значение, как правило, включает  $\pm 10\%$  от указанного значения. Например, концентрация 1 мг/мл включает 0,9 мг/мл - 1,1 мг/мл. Подобным образом, диапазон концентраций 1%-10% (мас./об.) включает 0,9% (мас./об.) - 11% (мас./об.). В рамках изобретения, использование числового значения явно включает все возможные поддиапазоны, все индивидуальные числовые значения в пределах этого диапазона, включая целые числа в пределах таких диапазонов и дроби значений, если контекст явно не указывает на иное.

Если не указано иное, термин "по меньшей мере", предшествующий сериям элементов, следует понимать как относящийся к каждому элементу в сериях. Специалисту в данной области известно, или он является способным определить с использованием не более, чем общепринятых экспериментов, множество эквивалентов конкретных вариантов осуществления изобретения, описанных в настоящем описании. Такие эквиваленты предназначены для включения в изобретение.

В рамках изобретения, термины "содержит", "содержащий", "включает", "включая", "имеет", "имеющий", "содержит" или "содержащий", или любые другие их варианты, понимают как подразумевающие включение указанного целого или группы целых, но не как исключение любого другого целого или группы целых, и они предназначены, чтобы является неисключительными или неограничивающими. Например, композиция, смесь, процесс, способ, изделие или устройство, которые включают список элементов, не обязательно ограничены только этими элементами, но могут включать другие элементы, явно не перечисленные или не присущие такой композиции, смеси, процессу, способу, изделию или устройству. Кроме того, если явно не указано обратное, "или" относится к включению, а не исключению. Например, условие А или В удовлетворено посредством любого из следующего: А является истинным (или присутствует) и В является ложным (или не присутствует), А является ложным (или не присутствует) и В является истинным (или присутствует), и А и В оба являются истинными (или присутствуют).

В рамках изобретения, соединительный термин "и/или" между множеством перечисленных элементов понимают как включающий как индивидуальные, так и объединенные варианты. Например, когда два элемента соединены посредством "и/или", первый вариант относится к применимости первого элемента в отсутствие второго. Второй вариант относится к применимости второго элемента в отсутствие первого. Третий вариант относится к применимости первого и второго элементов совместно. Любой из этих вариантов понимают как включенный в значение, и таким образом, удовлетворяющий требованию термина "и/или", в рамках изобретения. Одновременную применимость более одного из вариантов также понимают как включенную в значение, и таким образом, удовлетворяющую требованию термина "и/или".

В рамках изобретения, термин "состоит из" или его варианты, такие как "состоят из" или "состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, однако на то, что никакие дополнительные целое или группа целых не могут быть добавлены к указанному способу, структуре или композиции.

В рамках изобретения, термин "в основном состоит из" или варианты, такие как "в основном состоят из" или "в основном состоящий из", как используют на протяжении описания и формулы изобретения, указывает на включение любого из указанного целого или группы целых, и необязательное включение любого из указанного целого или группы целых, которые существенно не изменяют основные или новые свойства указанного способа, структуры или композиции. См. М.Р.Е.Р. § 2111.03.

В рамках изобретения, "субъект" обозначает любое животное, предпочтительно, млекопитающее, наиболее предпочтительно, человека. Термин "млекопитающее", в рамках изобретения, включает любое млекопитающее. Примеры млекопитающих включают, но без ограничения, коров, лошадей, овец, свиней, кошек, собак, мышей, крыс, кроликов, морских свинок, обезьян, человека и т.д., более предпочтительно, человека.

Следует также понимать, что термины "приблизительно", "около", "как правило", "по существу" и подобные термины, используемые в настоящем описании, применительно к измерению или характеристике компонента предпочтительного изобретения, указывают на то, что описанное измерение/характеристика не является точной границей или параметром, и не исключают незначительных отклонений от них, которые являются функционально одинаковыми или сходными, как понятно специалисту в данной области. Как минимум, такие ссылки, включающие числовой параметр, включают отклоне-

ния, которые, с использованием математических и промышленных принципов, принятых в данной области (например, округления, ошибок измерения или других систематических ошибок, технологических допусков и т.д.), не изменяют наименьшую значащую цифру.

Термины "идентичный" или процент "идентичности", в контексте двух или более последовательностей нуклеиновых кислот или полипептидных последовательностей (например, антитела против TIP-1 и кодирующие их полинуклеотиды, полипептиды TIP-1 и кодирующие их полинуклеотиды TIP-1), относятся к двум или более последовательностям или подпоследовательностям, которые являются одинаковыми или имеют указанный процент аминокислотных остатков или нуклеотидов, которые являются одинаковыми, при сравнении и выравнивании для максимального соответствия, как измерено с использованием одного из следующих алгоритмов сравнения последовательностей, или посредством визуальной проверки.

Для сравнения последовательностей, как правило, одна последовательность служит в качестве эталонной последовательности, с которой сравнивают тестируемые последовательности. При использовании алгоритма сравнения последовательностей, тестируемые и эталонные последовательности вводят в компьютер, назначают координаты подпоследовательности, при необходимости, и назначают параметры алгоритма программы сравнения последовательностей. Затем алгоритм сравнения последовательностей рассчитывает процентную идентичность последовательностей для тестируемой последовательности (последовательностей), относительно эталонной последовательности, на основании назначенных параметров программы.

Оптимальное выравнивание последовательностей для сравнения можно проводить, например, посредством алгоритма локальной гомологии Смита и Уотермана, *Adv. Appl. Math.* 2:482 (1981), посредством алгоритма выравнивания областей гомологии Нидлмана и Вунша, *J. Mol. Biol.* 48:443 (1970), посредством способа поиска сходства Пирсона и Липмана, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 85:2444 (1988), посредством компьютеризированных осуществлений этих алгоритмов (GAP, BESTFIT, FASTA и TFASTA в пакете программного обеспечения Wisconsin Genetics, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) или посредством визуальной проверки (см., в общем, *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M. Ausubel et al., eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1995 Supplement) (Ausubel)).

Примерами алгоритмов, пригодных для определения процентной идентичности последовательностей и сходства последовательностей, являются алгоритмы BLAST и BLAST 2.0, описанные в Altschul et al. (1990) *J. Mol. Biol.* 215: 403-410 и Altschul et al. (1997) *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-3402, соответственно. Программное обеспечение для проведения анализов BLAST является публично доступным через Национальный центр биотехнологической информации. Этот алгоритм включает сначала идентификацию пар последовательностей с высоким показателем сходства (HSP) посредством идентификации коротких слов длиной  $W$  в запрашиваемой последовательности, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому положительному пороговому показателю  $T$  при выравнивании со словом такой же длины в последовательности из базы данных.  $T$  обозначает пороговую оценку сходства соседних слов (Altschul et al, выше). Эти исходные попадания в соседнее слово действуют в качестве затравок для инициации поисков с целью найти более длинные HSP, содержащие их. Попадания в слова затем расширяют в обоих направлениях вдоль каждой последовательности, пока кумулятивный показатель выравнивания может увеличиваться.

Кумулятивные показатели рассчитывают с использованием, для нуклеотидных последовательностей, параметров  $M$  (показатель вознаграждения за пару совпадающих остатков; всегда  $>0$ ) и  $N$  (показатель штрафа за несовпадающие остатки; всегда  $<0$ ). Для аминокислотных последовательностей, оценочную матрицу используют для расчета кумулятивного показателя. Расширение попадания в слова в каждом направлении прекращают, когда: кумулятивный показатель выравнивания уменьшается на значение  $X$  от его максимально достигнутого значения; кумулятивный показатель стремится к нулю или ниже, из-за накопления одного или нескольких отрицательно оцениваемых выравниваний остатков; или достигнут конец какой-либо из последовательностей. Параметры алгоритма BLAST  $W$ ,  $T$  и  $X$  определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) используют по умолчанию длину слова ( $W$ ) 11, ожидание ( $E$ ) 10,  $M=5$ ,  $N=-4$  и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей, в программе BLASTP используют по умолчанию длину слова ( $W$ ) 3 и ожидание ( $E$ ) 10, и оценочную матрицу BLOSUM62 (см. Henikoff & Henikoff, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:10915 (1989)).

В дополнение к расчету процента идентичности последовательностей, алгоритм BLAST осуществляет также статистический анализ сходства между двумя последовательностями (см., например, Karlin & Altschul, *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 90:5873-5787 (1993)). Одним из измерений сходства, предоставленных алгоритмом BLAST, является наименьшая сумма вероятностей ( $P(N)$ ), которая указывает на вероятность, с которой совпадение двух нуклеотидных или аминокислотных последовательностей может происходить случайно. Например, нуклеиновую кислоту считают сходной с эталонной последовательностью, если наименьшая сумма вероятностей при сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой составляет менее приблизительно 0,1, более предпочтительно, менее прибли-

зительно 0,01, и наиболее предпочтительно, менее приблизительно 0,001.

Дополнительным указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты или два полипептида являются в основном идентичными, является то, что полипептид, кодируемый первой нуклеиновой кислотой, обладает иммунологической перекрестной реакционной способностью по отношению к антителам, образованным против полипептида, закодированного второй нуклеиновой кислотой, как описано ниже. Таким образом, полипептид, как правило, является в основном идентичным второму полипептиду, например, когда два пептида отличаются только консервативными заменами. Другим указанием на то, что две последовательности нуклеиновой кислоты являются в основном идентичными, является то, что эти две молекулы гибридизуются друг с другом в строгих условиях.

#### Антитела

Изобретение, в общем, относится к выделенным антителам против TTP-1, нуклеиновым кислотам и экспрессирующим векторам, кодирующим антитела, к рекомбинантным клеткам, содержащим векторы, и к композициям, содержащим антитела. Изобретение также относится к способам получения антител и способам применения антител для лечения заболеваний, включая злокачественную опухоль. Антитела по изобретению обладают одним или несколькими желательными функциональными свойствами, включая, но без ограничения, высоко аффинное связывание с TTP-1, высокую специфичность для TTP-1 и способность ингибировать рост опухоли в моделях на животных, при введении отдельно или в комбинации с другими видами противораковой терапии.

В общем аспекте, изобретение относится к выделенным моноклональным антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают TTP-1.

В рамках изобретения, термин "антитело" используют в широком смысле, и он включает молекулы иммуноглобулина или антитела, включая человеческие, гуманизированные, композитные и химерные антитела, и фрагменты антител, которые являются моноклональными или поликлональными. Как правило, антитела представляют собой белковые или пептидные цепи, имеющие специфичность связывания для специфического антигена. Структуры антител хорошо известны. Иммуноглобулины можно приписать к пяти главным классам (т.е. IgA, IgD, IgE, IgG и IgM), в зависимости от аминокислотной последовательности константного домена тяжелой цепи. IgA и IgG далее подклассифицируют как изоформы IgA1, IgA2, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Соответственно, антитела по изобретению могут принадлежать к любому из пяти главных классов или соответствующих подклассов. Предпочтительно, антитела по изобретению представляют собой IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. Легкие цепи антител из видов позвоночных можно приписать к одному из двух явно отличающихся типов, а именно каппа и лямбда, на основании аминокислотных последовательностей их константных доменов. Соответственно, антитела по изобретению могут содержать константный домен легкой цепи каппа или лямбда. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антитела по изобретению включают константные области тяжелой и/или легкой цепи из крысиных или человеческих антител. В дополнение к тяжелым и легким константным доменам, антитела содержат антигенсвязывающую область, состоящую из варибельной области легкой цепи и варибельной области тяжелой цепи, каждая из которых содержит три домена (т.е. определяющие плементарность области 1-3; CDR1, CDR2 и CDR3). Домены варибельной области легкой цепи, альтернативно обозначены как LCDR1, LCDR2 и LCDR3, и домены варибельной области тяжелой цепи альтернативно обозначены как HCDR1, HCDR2 и HCDR3.

В рамках изобретения, термин "выделенное антитело" относится к антителу, которое является в основном свободным от других антител, имеющих другую антигенную специфичность (например, выделенное антитело, которое специфически связывает TTP-1, является в основном свободным от антител, которые не связывают TTP-1). Кроме того, выделенное антитело является в основном свободным от другого клеточного материала и/или химических веществ.

В рамках изобретения, термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. индивидуальные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных природных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела по изобретению можно получать посредством способа гибридомы, технологии фагового дисплея, технологии клонирования генов из отдельных лимфоцитов или способов рекомбинантной ДНК. Например, моноклональные антитела можно получать посредством гибридомы, включающей В-клетку, полученную из трансгенного не относящегося к человеку животного, такого как трансгенная мышь или крыса, имеющего геном, содержащий человеческий трансген тяжелой цепи и трансген легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "антигенсвязывающий фрагмент" относится к фрагменту антитела, например, такому как диатело, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub>, фрагмент Fv, стабилизированный дисульфидным мостиком фрагмент Fv (dsFv), (dsFv)<sub>2</sub>, биспецифический dsFv (dsFv-dsFv'), стабилизированное дисульфидным мостиком диатело (ds диатело), однопочечная молекула антитела (scFv), однодоменное антитело (sdab), димер scFv (двухвалентное диатело), мультиспецифическое антитело, образованное из чти антитела, содержащей одну или несколько CDR, камелизированное однодоменное антитело, наноантитело, доменное антитело, двухвалентное доменное антитело, или любой другой фрагмент антитела, который связывается с антигеном, но не содержит полную структуру антитела. Антигенсвязывающий фрагмент

является способным связываться с тем же самым антигеном, с которым связывается исходное антитело или фрагмент исходного антитела. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область легкой цепи, константную область легкой цепи и фрагмент Fd тяжелой цепи. В соответствии с другими конкретными вариантами осуществления, антигенсвязывающий фрагмент содержит Fab и F(ab').

В рамках изобретения, термин "одноцепочечное антитело" относится к общепринятому в данной области одноцепочечному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, соединенные коротким пептидом из от приблизительно 15 до приблизительно 20 аминокислот. В рамках изобретения, термин "однодоменное антитело" относится к общепринятому в данной области однодоменному антителу, которое содержит переменную область тяжелой цепи и константную область тяжелой цепи, или которое содержит только переменную область тяжелой цепи.

В рамках изобретения, термин "человеческое антитело" относится к антителу, продуцируемому человеком, или к антителу, имеющему аминокислотную последовательность, соответствующую антителу, продуцируемому человеком, полученному с использованием любого способа, известного в данной области. Это определение человеческого антитела включает интактные или полноразмерные антитела, их фрагменты и/или антитела, содержащие по меньшей мере один полипептид человеческой тяжелой и/или легкой цепи.

В рамках изобретения, термин "гуманизированное антитело" относится к не относящемуся к человеку антителу, модифицированному для увеличения гомологии последовательности с последовательностью человеческого антитела, таким образом, чтобы антигенсвязывающие свойства антитела сохранялись, но его антигенность в организме человека уменьшалась.

В рамках изобретения, термин "химерное антитело" относится к антителу, где аминокислотная последовательность молекулы иммуноглобулина происходит из двух или более видов. Переменная область как легкой, так и тяжелой цепей, что соответствует переменной области антитела, происходящего из одного вида млекопитающего (например, мыши, крысы, кролика и т.д.), имеющего желательную специфичность, аффинность и емкость, в то время как константные области соответствуют последовательностям антитела, происходящим из другого вида животного (например, человека), чтобы исключить вызов иммунного ответа у этого вида.

В рамках изобретения, термин "мультиспецифическое антитело" относится к антителу, содержащему множество последовательностей переменной домена иммуноглобулина, где последовательность первого переменной домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность второго переменной домена иммуноглобулина из множества имеет специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы не перекрываются или в основном не перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый переменный домен иммуноглобулина. В одном варианте осуществления, мультиспецифическое антитело представляет собой молекулу биспецифического антитела, молекулу триспецифического антитела, или молекулу тетраспецифического антитела.

В рамках изобретения, термин "биспецифическое антитело" относится к мультиспецифическому антителу, связывающему не более двух эпитопов или двух антигенов. Биспецифическое антитело характеризуется последовательностью первого переменной домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательностью второго переменной домена иммуноглобулина, имеющего специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на одном и том же антигене, например, на одном и том же белке (или субъединице мультимерного белка). В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы перекрываются или в основном перекрываются. В одном варианте осуществления, первый и второй эпитопы находятся на различных антигенах, например, на различных белках (или на различных субъединицах мультимерного белка). В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит последовательность переменной домена тяжелой цепи и последовательность переменной домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и последовательность переменной домена тяжелой цепи и последовательность переменной домена легкой цепи, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и полуантитело или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, биспецифическое антитело содержит scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для первого эпитопа, и scFv или его фрагмент, имеющие специфичность связывания для второго эпитопа. В одном варианте осуществления, первый эпитоп локализован на T1P-1, и вто-

рой эпитоп локализован на PD-1, PD-L1, LAG-3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD47, CD73, апелине, DLL3, клаудине 18.2 (CLDN18.2), FR $\alpha$  (рецепторе фолата альфа), CD3 и/или других опухолеассоциированных иммуносупрессорах или поверхностных антигенах.

Как применяют в настоящем документе, термин "TIP-1" относится к взаимодействующему с tax белку 1 (TIP-1, также известному как Tax1bp3 или взаимодействующий с глутаминой белок, GIP), представляющее собой содержащий домен PDZ (гомологичный PSD-95/Discs large/ZO-1) внутриклеточный белок (124 аминокислот у человека и мыши) (Besser et al., *Dev Growth Differ* 49:205-214(2007)). Домены PDZ представляют собой небольшие (80-100 остатков) мотивы для белок-белкового взаимодействия, которые, как правило, связываются с С-концом своих белков-партнеров (Lee and Zheng, *Cell Commun Signal* 8:8 (2010)). Один домен PDZ, включающий остатки 13-112 из 124-аминокислотного белка (Olalla, et al., *FEBS Lett* 488:116-122 (2001)), является единственной функциональной и структурной единицей, которую можно идентифицировать в TIP-1. TIP-1 повсеместно экспрессируется в тканях человека (Alewine et al., *Mol Biol Cell* 17:4200-4211 (2006)). TIP-1 взаимодействует со многими внутриклеточными белками посредством домена PDZ, включая глутаминазу L,  $\beta$ -катенин, FAS, HTLV Tax, HPV E6, ротекин и Kir 2.3 (Zoetewey et al., *Biochemistry* 50:3528-3539 (2011)), и может выполнять множество биологических функций. Например, посредством конкуренции с комплексом mLin-7/CASK базолатеральной клеточной мембраны за взаимодействие с калиевым каналом Kir 2.3, TIP-1 ингибирует нацеливание Kir 2.3 на поляризованную плазматическую мембрану (Alewine et al., *Mol Biol Cell* 17:4200-4211(2006)). Увеличенную экспрессию TIP-1 детектировали в клетках инвазивной злокачественной опухоли молочной железы человека и показали, что она связана с адгезией, миграцией клеток опухоли и метастазированием в легкие (Han et al., *Biochem Biophys Res Commun* 422:139-145 (2012)). TIP-1 транслоцируется к поверхности клеток злокачественных опухолей после индукции посредством облучения (Yan et al., *Oncotarget* 7:43352-43362 (2016)), что позволяет предполагать, что TIP-1 может являться неоантигеном злокачественной опухоли после индукции. Иллюстративная аминокислотная последовательность TIP-1 человека представлена посредством No. доступа в GenBank O14907.2 (SEQ ID NO: 9).

В рамках изобретения, антитело, которое "специфически связывает TIP-1" относится к антителу, которое связывает TIP-1, предпочтительно, TIP-1 человека, с KD  $1 \times 10^{-7}$  М или менее, предпочтительно,  $1 \times 10^{-8}$  М или менее, более предпочтительно,  $5 \times 10^{-9}$  М или менее,  $1 \times 10^{-9}$  М или менее,  $5 \times 10^{-10}$  М или менее, или  $1 \times 10^{-10}$  М или менее. Термин "KD" относится к константе диссоциации, которая получена из отношения Kd к Ka (т.е. Kd/Ka) и выражена как молярная концентрация (М). Значения KD для антитела можно определять с использованием принятых в данной области способов, в свете настоящего описания. Например, KD антитела можно определять с использованием поверхностного плазмонного резонанса, например, с использованием системы биосенсора, например, системы Biacore®, или с использованием технологии интерферометрии биослоя, например, системы Octet RED96.

Чем меньше значение KD антитела, тем выше аффинность, с которой антитело связывается с антигеном-мишенью.

В соответствии с конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему определяющую комплементарность область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарность область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из

а) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TIP-1, предпочтительно, TIP-1 человека.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 1, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 2. В соответствии с одним предпочтительным вариантом осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 2 соответственно.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, содержащему

а) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из

SEQ ID NO: 2.

В одном варианте осуществления, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащему HCDR1, HCDR2, HCDR3, LCDR1, LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно. В другом варианте осуществления, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность по меньшей мере на 85%, предпочтительно, на 90%, более предпочтительно, на 95% или более, например, на 95%, 96%, 97%, 98% или 99%, идентичную SEQ ID NO: 2. Предпочтительно, выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1; и вариабельную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

В соответствии с другим конкретным аспектом, изобретение относится к выделенному моноклональному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту по изобретению, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

В другом общем аспекте, изобретение относится к выделенной нуклеиновой кислоте, кодирующей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Специалисту в данной области понятно, что кодирующую последовательность белка можно изменять (например, заменять, делетировать, вставлять и т.д.) без изменения аминокислотной последовательности белка. Соответственно, специалисту в данной области понятно, что последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующие моноклональные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по изобретению, можно изменять без изменения аминокислотных последовательностей белков.

В другом общем аспекте, изобретение относится к вектору, содержащему выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Можно использовать любой вектор, известный специалисту в данной области в свете настоящего описания, такой как плазида, космида, фаговый вектор или вирусный вектор. В некоторых вариантах осуществления, вектор представляет собой рекомбинантный экспрессирующий вектор, такой как плазида. Вектор может включать любой элемент для осуществления общепринятой функции экспрессирующего вектора, например, промотор, элемент для связывания рибосомы, терминатор, энхансер, селективный маркер и точку начала репликации. Промотор может представлять собой конститутивный, индуцируемый или репрессируемый промотор. Ряд экспрессирующих векторов, способных к доставке нуклеиновых кислот в клетку, известны в данной области и могут быть использованы в настоящем описании для продукции антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в клетке. Общепринятые способы клонирования или искусственный синтез генов можно использовать для получения рекомбинантного экспрессирующего вектора в соответствии с вариантами осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению. Любую клетку-хозяина, известную специалисту в данной области в свете настоящего описания, можно использовать для рекомбинантной экспрессии антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению. В некоторых вариантах осуществления, клетки-хозяева представляют собой клетки *E. coli* TG1 или BL21 (для экспрессии, например, scFv или Fab антитела), клетки CHO-DG44 или CHO-K1, или HEK293 (для экспрессии, например, полноразмерного антитела IgG). В соответствии с конкретными вариантами осуществления, рекомбинантным экспрессирующим вектором трансформируют клетки-хозяева общепринятыми способами, такими как химическая трансфекция, тепловой шок или электропорация, где он стабильно интегрирует в геном клетки-хозяина, таким образом, чтобы рекомбинантная нуклеиновая кислота эффективно экспрессировалась.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, включающему культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по изобретению, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры клеток (например, из супернатанта). Экспрессированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты можно собирать из клеток и очищать в соответствии с общепринятыми способами, известными в данной области, и как описано в настоящем описании.

#### Фармацевтические композиции

В другом общем аспекте, изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению и фармацев-

тически приемлемый носитель. Термин "фармацевтическая композиция", в рамках изобретения обозначает продукт, содержащий антитело по изобретению вместе с фармацевтически приемлемым носителем. Антитела по изобретению и содержащие их композиции также можно использовать в изготовлении лекарственного средства для терапевтических применений, упомянутых в настоящем описании.

В рамках изобретения, термин "носитель" относится к любому расширителю, разбавителю, наполнителю, соли, буферу, стабилизатору, солюбилизатору, маслу, липиду, содержащей липид везикуле, микросфере, липосомной инкапсуляции или другому материалу, хорошо известному в данной области для использования в фармацевтических составах. Понятно, что характеристики носителя, наполнителя или разбавителя могут зависеть от способа введения для конкретного применения. В рамках изобретения, термин "фармацевтически приемлемый носитель" относится к нетоксичному материалу, который не создает помех для эффективности композиции по изобретению или для биологической активности композиции по изобретению. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, в свете настоящего описания, любой фармацевтически приемлемый носитель, пригодный для использования в фармацевтической композиции антитела, можно использовать по изобретению.

Получение состава фармацевтически активных ингредиентов с фармацевтически приемлемыми носителями известно в данной области, например, Remington: The Science and Practice of Pharmacy (например, 21st edition (2005), и любые более поздние издания). Неограничивающие примеры дополнительных ингредиентов включают: буферы, разбавители, растворители, регулирующие тоничность средства, консерванты, стабилизаторы и хелатирующие агенты. Один или несколько фармацевтически приемлемых носителей можно использовать в составлении фармацевтических композиций по изобретению.

В одном варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция представляет собой жидкий состав. Предпочтительным примером жидкого состава является водный состав, т.е. состав, содержащий воду. Жидкий состав может содержать раствор, суспензию, эмульсию, микроэмульсию, гель и т.п. Водный состав, как правило, содержит по меньшей мере 50% мас./мас. воды, или по меньшей мере 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, или по меньшей мере 95% мас./мас. воды.

В одном варианте осуществления, фармацевтическую композицию можно составлять в инъекционной форме, которую можно вводить, например, посредством устройства для инъекции (например, шприца или инфузионного насоса). Инъекцию можно вводить, например, подкожно, внутримышечно, внутривенно, в стекловидное тело или внутримышечно.

В другом варианте осуществления, фармацевтическая композиция представляет собой твердый состав, например, лиофилизированную или высушенную распылением композицию, которую можно использовать как есть, или в которую терапевт или пациент добавляет растворители и/или разбавители перед использованием. Твердые лекарственные формы могут включать таблетки, такие как прессованные таблетки, и/или покрытые таблетки, и капсулы (например, твердые или мягкие желатиновые капсулы). Фармацевтическая композиция может также находиться в форме, например, саше, драже, порошков, гранул, пастилок или порошков для разведения.

Лекарственные формы могут иметь немедленное высвобождение, в этом случае, они могут содержать водорастворимый или диспергируемый носитель, или они могут иметь отсроченное высвобождение, замедленное высвобождение или модифицированное высвобождение, в этом случае, они могут содержать нерастворимые в воде полимеры, которые регулируют скорость растворения лекарственной формы в желудочно-кишечном тракте или под кожей.

В других вариантах осуществления, фармацевтическую композицию можно доставлять интраназально, интрабуккально или подязычно.

pH в водном составе может составлять между pH 3 и pH 10. В одном варианте осуществления изобретения, pH состава составляет от приблизительно 7,0 до приблизительно 9,5. В другом варианте осуществления изобретения, pH состава составляет от приблизительно 3,0 до приблизительно 7,0.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит буфер. Неограничивающие примеры буферов включают аргинин, аспарагиновую кислоту, бисин, цитрат, гидрофосфат натрия, фумаровую кислоту, глицин, глицилглицин, гистидин, лизин, малеиновую кислоту, яблочную кислоту, ацетат натрия, карбонат натрия, дигидрофосфат натрия, фосфат натрия, сукцинат, виннокаменную кислоту, трицин и трис(гидроксиметил)аминометан, и их смеси. Буфер может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных буферов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения фармацевтическая композиция содержит консервант. Неограничивающие примеры консервантов включают хлорид бензэтония, бензойную кислоту, бензиловый спирт, бронопол, бутил-4-гидроксibenзоат, хлорбутанол, хлоркрезол, хлоргексидин, хлорфенилин, о-крезол, м-крезол, п-крезол, этил-4-гидроксibenзоат, имидамочевину, метил-4-гидроксibenзоат, фенол, 2-феноксиэтанол, 2-фенилэтанол, пропилен-4-гидроксibenзоат, дегидроацетат натрия, тиомерсал и их смеси. Консервант может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 мг/мл до при-

близительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных консервантов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит изотоническое средство. Неограничивающие примеры варианта осуществления включают соль (такую как хлорид натрия), аминокислоту (такую как глицин, гистидин, аргинин, лизин, изолейцин, аспарагиновая кислота, триптофан и треонин), альдит (такой как глицерин, 1,2-пропандиол пропиленгликоль), 1,3-пропандиол и 1,3-бутандиол), полиэтиленгликоль (например, PEG400) и их смеси. Другой пример изотонического средства включает сахар. Неограничивающие примеры сахаров могут представлять собой моно-, ди- или полисахариды, или водорастворимые глюкоаны, включая, например, фруктозу, глюкозу, маннозу, сорбозу, ксилозу, мальтозу, лактозу, сахарозу, трегалозу, декстран, пуллулан, декстрин, циклодекстрин, альфа и бета-HPCD, растворимый крахмал, гидроксипропилкрахмал и карбоксиметилцеллюлозу натрия. Другим примером изотонического средства является сахарный спирт, где термин "сахарный спирт" определяют как C(4-8)углеводород, имеющий по меньшей мере одну -ОН-группу. Неограничивающие примеры сахарных спиртов включают маннит, сорбит, инозитол, галактит, дульцит, ксилит и арабит. Изотоническое средство может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных изотонических средств, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит хелатирующий агент. Неограничивающие примеры хелатирующих агентов включают лимонную кислоту, аспарагиновую кислоту, соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА) и их смеси. Хелатирующий агент может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных хелатирующих агентов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор. Неограничивающие примеры стабилизаторов включают один или несколько ингибиторов агрегации, один или несколько ингибиторов окисления, одно или несколько поверхностно-активных веществ, и/или один или несколько ингибиторов протеаз.

В другом варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит стабилизатор, где указанный стабилизатор представляет собой карбокси-/гидроксицеллюлозу и ее производные (такие как НРС, НРС-SL, НРС-L и НРМС), циклодекстрины, 2-метилтиоэтанол, полиэтиленгликоль (такие как PEG 3350), поливиниловый спирт (PVA), поливинилпирролидон, соли (такие как хлорид натрия), содержащие серу вещества, такие как монотиоглицерин) или тиогликолевая кислота. Стабилизатор может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,01 мг/мл до приблизительно 50 мг/мл, например, от приблизительно 0,1 мг/мл до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных стабилизаторов, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующих вариантах осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит одно или несколько поверхностно-активных веществ, предпочтительно, поверхностно-активное вещество, по меньшей мере одно поверхностно-активное вещество или два различных поверхностно-активных вещества. Термин "поверхностно-активное вещество" относится к любым молекулам или ионам, состоящим из водорастворимой (гидрофильной) части и жирорастворимой (липофильной) части. Поверхностно-активное вещество может, например, быть выбрано из группы, состоящей из анионных поверхностно-активных веществ, катионных поверхностно-активных веществ, неионных поверхностно-активных веществ и/или цвиттерийных поверхностно-активных веществ. Поверхностно-активное вещество может быть представлено индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждое из этих конкретных поверхностно-активных веществ, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В следующем варианте осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит один или несколько ингибиторов протеаз, например, таких как ЭДТА и/или соль бензамидина и соляной кислоты (HCl). Ингибитор протеазы может быть представлен индивидуально или в комбинации, в концентрации от приблизительно 0,1 до приблизительно 20 мг/мл. Фармацевтические композиции, содержащие каждый из этих конкретных ингибиторов протеаз, составляют альтернативные варианты осуществления изобретения.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по изобретению, включающему объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

#### Способы применения

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу нацеливания на TTP-1 на поверхности клетки злокачественной опухоли у субъекта, включающему введение субъекту выделенного монокло-

нального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего TTP-1, или фармацевтической композиции по изобретению. Моноклональное антитело против TTP-1 или его антигенсвязывающий фрагмент является способным связывать TTP-1 на поверхности клетки злокачественной опухоли у субъекта. Связывание моноклонального антитела против TTP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента с транслоцированным TTP-1 на клеточной поверхности может позволять привлечение эффекторных клеток иммунной системы, системы комплемента и/или конъюгированных лекарственных средств для опосредования видов активности уничтожения злокачественных опухолей у субъекта. Моноклональное антитело против TTP-1 может, например, формировать биспецифическое антитело с другим моноклональным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, которое также может опосредовать виды активности уничтожения злокачественных опухолей у субъекта.

Функциональную активность антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих TTP-1, можно характеризовать посредством способов, известных в данной области, и как описано в настоящем описании. Способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих TTP-1, включают, но без ограничения, анализы аффинности и специфичности, включая анализы ViaCore, ELISA и OctetRed; анализы связывания для детекции связывания антител с TTP-1 на клетках злокачественных опухолей посредством FACS. В соответствии с конкретными вариантами осуществления, способы характеристики антител и их антигенсвязывающих фрагментов, связывающих TTP-1, включают способы, описанные ниже.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающему введение субъекту выделенного моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, специфически связывающего TTP-1, или фармацевтической композиции по изобретению. Злокачественная опухоль может, например, быть выбрана, но без ограничения, из рака легкого, рака желудка, рака ободочной кишки, печеночноклеточной карциномы, почечноклеточной карциномы, уротелиальной карциномы мочевого пузыря, метастазирующей меланомы, рака молочной железы, рака яичника, рака шейки матки, рака головы и шеи, рака поджелудочной железы, глиомы, глиобластомы и других солидных опухолей, и неходжскинской лимфомы (NHL), острого лимфоцитарного лейкоза (ALL), хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), хронического миелогенного лейкоза (CML), множественной миеломы (MM), острого миелоидного лейкоза (AML) и других жидких опухолей.

В соответствии с вариантами осуществления изобретения, фармацевтическая композиция содержит терапевтически эффективное количество антитела против TTP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента. В рамках изобретения, термин "терапевтически эффективное количество" относится к количеству активного ингредиента или компонента, вызывающему желательный биологический или медицинский ответ у субъекта. Терапевтически эффективное количество можно определять эмпирически и общепринятым образом, применительно к поставленной цели.

В рамках изобретения, применительно к антителам против TTP-1 или их антигенсвязывающим фрагментам, терапевтически эффективное количество обозначает количество антитела против TTP-1 или его антигенсвязывающего фрагмента, модулирующее иммунный ответ у нуждающегося в этом субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, терапевтически эффективное количество относится к количеству лекарственного средства, которое является достаточным для достижения одного, двух, трех, четырех или более из следующих эффектов: (i) уменьшение или облегчение тяжести заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (ii) уменьшение длительности заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iii) предотвращение прогрессирования заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (iv) вызов регрессии заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (v) предотвращение развития или начала заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vi) предотвращение рецидива заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома; (vii) уменьшение случаев госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (viii) уменьшение длительности госпитализации субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, или ассоциированный с ним симптом; (ix) увеличение выживаемости субъекта с заболеванием, нарушением или состоянием, подлежащим лечению, или ассоциированным с ним симптомом; (x) ингибирование или уменьшение заболевания, нарушения или состояния, подлежащего лечению, или ассоциированного с ним симптома у субъекта; и/или (xii) усиление или улучшение профилактического или терапевтического эффекта(эффектов) другой терапии.

Терапевтически эффективное количество или дозу можно менять, в соответствии с различными факторами, такими как заболевание, нарушение или состояние, подлежащее лечению, способы введения, уток-мишень, физиологическое состояние субъекта (включая, например, возраст, массу тела, общее состояние здоровья), является ли субъект человеком или животным, другие вводимые лекарственные средства, и то, является ли лечение профилактическим или терапевтическим. Дозы для лечения оптимально титруют для оптимизации безопасности и эффективности.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, композиции, описанные в настоящем описании, составляют, чтобы они являлись пригодными для намеченного способа введения субъекту. Например, композиции, описанные в настоящем описании, можно составлять, чтобы они являлись пригодными для внутривенного, подкожного или внутримышечного введения.

В рамках изобретения, термины "лечить", "лечение" и "обработка" все предназначены для обозначения облегчения или обращения по меньшей мере одного поддающегося измерению физического параметра, относящегося к злокачественной опухоли, который, необязательно, является различимым у субъекта, но может являться различимым у субъекта. Термины "лечить", "лечение" и "обработка", могут также относиться к вызову регрессии, предотвращению прогрессирования или по меньшей мере замедлению прогрессирования заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к облегчению, предотвращению развития или начала, или уменьшению длительности одного или нескольких симптомов, ассоциированных с заболеванием, нарушением или состоянием, таким как опухоль или более предпочтительно, злокачественная опухоль. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к предотвращению заболевания, нарушения или состояния. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к увеличению выживаемости субъекта, имеющего заболевание, нарушение или состояние. В конкретном варианте осуществления, "лечить", "лечение" и "обработка" относятся к прекращению заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

В соответствии с конкретными вариантами осуществления, настоящее изобретение относится к композициям, используемым для лечения злокачественной опухоли. Для терапии злокачественной опухоли, композиции можно использовать в комбинации с другим лечением, включая, но без ограничения, химиотерапию, mAb против CD20, mAb против TIM-3, mAb против LAG-3, mAb против CD73, mAb против CD47, mAb против апелина, mAb против клаудина 18.2, mAb против DLL3, mAb против FRa, антитело против CTLA-4, антитело против PD-L1, антитело против PD-1, терапию PD-1/PD-L1, другие иммуноонкологические лекарственные средства, антиангиогенное средство, радиотерапию, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC), направленную терапию или другие противораковые лекарственные средства. Антитела против TIG-1 можно использовать для конструирования биспецифических антител с партнерами - mAb против PD-1, PD-L1, LAG3, TIM-3, CTLA-4, EGFR, HER-2, CD19, CD20, CD33, CD73, CD47, CD3, апелина, DLL-3, CLDN18.2, рецептора фолата альфа (FOLR1) и/или других антигенов поверхности опухолей, для лечения злокачественных опухолей/опухолей, экспрессирующих как CLDN18.2, так и специфический опухолеассоциированный антиген.

В рамках изобретения, термин "в комбинации", в контексте введения двух или более терапевтических средств субъекту, относится к использованию более одного терапевтического средства. Использование термина "в комбинации" не ограничивает порядок, в котором терапевтические средства вводят субъекту. Например, первое терапевтическое средство (например, композицию, описанную в настоящем описании) можно вводить до (например, за 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель до, одновременно или после, например, через 5 мин, 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч, 12 ч, 16 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч, 96 ч, 1 неделю, 2 недели, 3 недели, 4 недели, 5 недель, 6 недель, 8 недель или 12 недель после) введения второго терапевтического средства субъекту.

В другом общем аспекте, изобретение относится к способу определения уровня TIG-1 у субъекта. Способы включают (а) получение образца от субъекта; (б) приведение образца в контакт с моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по изобретению; и (с) определение уровня TIG-1 у субъекта.

В рамках изобретения, "образец" относится к биологическому образцу, выделенному от субъекта, и может включать, но без ограничения, цельную кровь, сыворотку, плазму, клетки крови, эндотелиальные клетки, биоптаты ткани (например, ткани злокачественной опухоли), лимфатическую жидкость, асцитную жидкость, интерстициальную жидкость, костный мозг, спинномозговую жидкость, слюну, слезу, мокроту, пот, мочу или любой другой продукт секреции, экскреции, или другие физиологические жидкости. "Образец крови" относится к цельной крови или любой ее фракции, включая клетки крови, сыворотку и плазму.

В конкретных вариантах осуществления, уровень TIG-1 у субъекта можно определять с использованием анализов, выбранных, но без ограничения, из анализа Вестерн-блоттинга, анализа ELISA и/или иммуногистохимии (ИНС). Относительные уровни белка можно определять с использованием анализа Вестерн-блоттинга и иммуногистохимии (ИНС), и абсолютные уровни белка можно определять с использованием анализа ELISA. При определении относительных уровней TIG-1, уровни TIG-1 можно определять в сравнении между по меньшей мере двумя образцами, например, между образцами от одного и того же субъекта в различных временных точках, между образцами из различных тканей одного и того же субъекта и/или между образцами от различных субъектов. Альтернативно, при определении абсолютных уровней TIG-1, например, посредством анализа ELISA, абсолютный уровень TIG-1 в образце можно определять посредством получения стандарта для анализа ELISA до тестирования образца. Специалисту в данной области понятно, какие аналитические способы использовать для определения уровня TIG-1 в

образце от субъекта с использованием антител или их антигенсвязывающих фрагментов по изобретению.

Использование способов определения уровня TTP-1 в образце от субъекта может приводить к диагностике аномальных (увеличенных, уменьшенных или недостаточных) уровней TTP-1 при заболевании и к принятию соответствующих терапевтических решений. Такое заболевание может включать, например, злокачественную опухоль. Кроме того, посредством мониторинга уровней TTP-1 у субъекта, риск развития заболевания, как указано выше, можно определять на основании знаний об уровне TTP-1 при конкретном заболевании и/или в ходе прогрессирования конкретного заболевания.

#### **Варианты осуществления**

Это изобретение относится к следующим неограничивающим вариантам осуществления.

Вариант осуществления 1 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из

а) SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8, соответственно;

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывает TTP-1, предпочтительно, TTP-1 человека.

Вариант осуществления 2 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 1, содержащие переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 1, или переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, по меньшей мере на 95% идентичную SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 3 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из варианта осуществления 1 или 2, содержащие:

а) переменную область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность из SEQ ID NO: 2.

Вариант осуществления 4 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-3, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является способным индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли.

Вариант осуществления 5 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным.

Вариант осуществления 6 представляет собой выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является человеческим или гуманизированным.

Вариант осуществления 7 представляет собой выделенную нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-6.

Вариант осуществления 8 представляет собой вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту из варианта осуществления 7.

Вариант осуществления 9 представляет собой клетку-хозяина, содержащую вектор из варианта осуществления 8.

Вариант осуществления 10 представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

Вариант осуществления 11 представляет собой способ лечения злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 10.

Вариант осуществления 12 представляет собой способ нацеливания на TTP-1 на поверхности клетки злокачественной опухоли у нуждающегося в этом субъекта, включающий введение субъекту фармацевтической композиции из варианта осуществления 10.

Вариант осуществления 13 представляет собой способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из любого из вариантов осуществления 1-6, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

Вариант осуществления 14 представляет собой способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент из любого из вариантов осуществления 1-6, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем для получения фармацевтической композиции.

Вариант осуществления 15 представляет собой способ определения уровня TIP-1 у субъекта, включающий:

- получение образца от субъекта;
- приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-6;
- определение уровня TIP-1 у субъекта.

Вариант осуществления 16 представляет собой способ из варианта осуществления 15, где образец представляет собой образец ткани.

Вариант осуществления 17 представляет собой способ из варианта осуществления 16, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.

Вариант осуществления 18 представляет собой способ по п.15, где образец представляет собой образец крови.

### Примеры

Пример 1. Идентификация моноклональных антител против TIP-1.

Мышей подвергали иммунизации слитым белком, содержащим глутатион-S-трансферазу (GST) и TIP-1 (GST-TIP-1), и бустер-иммунизации другим слитым белком, содержащим метку HIS, фрагмент дифтерийного токсина А (DTA) и TIP-1 (HisDTA-TIP-1). Титр в плазме определяли посредством ELISA. После эвтаназии, лимфатические узлы собирали для получения гибридом. Гибридомы выращивали в 96-луночных культуральных планшетах, и супернатанты из индивидуальных лунок подвергали скринингу посредством ELISA с использованием GST-TIP-1 для положительных сигналов и GST для контрскрининга. Наилучшие положительные сигналы подтверждали посредством ELISA с использованием меченого Мус-DDK TIP-1 (TIP1-Мус-DDK). Наилучшие положительные клоны выделяли и секвенировали.

Последовательности переменных областей тяжелой и легкой цепи для моноклонального антитела против TIP-1 T2 представлены в табл. 1 и 2, и области CDR для моноклонального антитела против TIP-1 T2 представлены в табл. 3 и 4.

Таблица 1. Последовательности переменной области тяжелой цепи для mAb против TIP-1

клоны mAb	VH
T2	EVKLEQSGPELKKPGETVKISCKASGYFTDYSMHWVKQAPGKGLKWM GWINTKTRKPTYADDFKGRFAFSLETSARTAYLQINNLKNEDTATYFCAP TGLDYWGQGTSTVSS (SEQ ID NO: 1)

VH: переменная область тяжелой цепи

Таблица 2. Последовательности переменной области легкой цепи для mAb против TIP-1

клоны mAb	VL
T2	DIVITQTTLTSLVSIQGPASISCKSSQSLDSDGKTYLNWLLQRPQSPKRLI YLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLVVYCWQGTHTFPRTF GGGKLEIK (SEQ ID NO: 2)

VL: переменная область легкой цепи

Таблица 3. Области CDR 1-3 тяжелой цепи для mAb против TIP-1

клоны mAb	HC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
T2	GYTFTDYS (3)	INTKTRKP (4)	APTGLDY (5)

HC: тяжелая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область HC

CDR для mAb против TIP-1 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Таблица 4. Области CDR 1-3 легкой цепи для mAb против TIP-1

клоны mAb	LC		
	CDR1 (SEQ ID NO:)	CDR2 (SEQ ID NO:)	CDR3 (SEQ ID NO:)
T2	QSLDSDGKTY (6)	LVS (7)	WQGTHTFPRT (8)

LC: легкая цепь;

CDR: определяющая комплементарность область LC

CDR для mAb против TIP-1 определяли с использованием способа IMGT (Lefranc, M.-P. et al., Nucleic Acids Res. 1999; 27:209-212).

Пример 2. Продукция и очистка mAb T2 из супернатанта гибридомы и культуральных сред от трансфицированных клеток 293E.

Мышиное mAb против TIP-1 T2 очищали из сред/супернатантов от гибридомы с использованием аффинной хроматографии с белком А. Для получения рекомбинантных химерных mAb против TIP-1, экспрессирующими векторами, содержащими мышинные VH и VL, слитые с константными областями тяжелой цепи IgG1 и легкой цепи каппа человека, соответственно, временно трансфицировали клетки 293E. Рекомбинантное антитело, продуцированное в суспензии клеток 293E, очищали с использованием аффинной хроматографии с белком А.

Пример 3. Анализ ELISA связывания очищенных антител TIP1-Мус-DDK в карбонатном буфере

для покрытия покрывали планшет для ELISA при комнатной температуре (50 мкл/лунку при 1 мкг/мл) в течение 1 ч. После промывки, планшет для ELISA блокировали в 5% BSA в PBS в течение 1 ч и промывали снова. mAb против TIP-1 добавляли, перемешивали и инкубировали в течение 60 мин при комнатной температуре. Планшет промывали, и связывание mAb против TIP-1 с иммобилизованным TIP-1-Мус-DDK детектировали посредством добавления вторичного антитела, антитела против IgG мыши, конъюгированного с пероксидазой хрена (ThermoFisher Scientific, #A16084) или антитела против IgG человека, конъюгированного с пероксидазой хрена (hlgG-HRP) (ThermoFisher Scientific, #31410), в PBS и инкубации в течение 1 ч, и затем промывки. ELISA проявляли с использованием раствора для одностадийной детекции (ThermoFisher Scientific, кат.#: 34028) и измеряли как оптическую плотность при 450 нм. Результат связывания мышинового mAb против TIP-1 T2 представлен на фиг. 1; использованные концентрации mAb T2 составляли (слева направо на графике): 500 нг/мл, 20 нг/мл, 5 нг/мл и 1 нг/мл, соответственно; только 2-е Ab, группу не обрабатывали первичными антителами, но обрабатывали конъюгированными с HRP вторичными Ab против IgG мыши; без антитела, не добавляли ни первичное Ab, ни 2-е Ab). Результат связывания химерного варианта mAb против TIP-1 T2 представлен на фиг. 2; использованные концентрации mAb T2 составляли (слева направо на графике): 18 нг/мл, 4 нг/мл и 1 нг/мл, соответственно; только 2-е Ab, группу не обрабатывали первичными антителами, но обрабатывали конъюгированными с HRP вторичными Ab против IgG мыши; без антитела, не добавляли ни первичное Ab, ни 2-е Ab.

Специалисту в данной области понятно, что изменения можно вносить в варианты осуществления, описанные выше, без отклонения от их широкого изобретательского замысла. Понятно, таким образом, что это изобретение не ограничено конкретными описанными вариантами осуществления, но предназначено для включения модификаций в пределах содержания и объема настоящего изобретения, как определено посредством настоящего описания.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связываются с TIP-1, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат определяющую комплементарную область 1 тяжелой цепи (HCDR1), HCDR2, HCDR3, определяющую комплементарную область 1 легкой цепи (LCDR1), LCDR2 и LCDR3, имеющие полипептидные последовательности из SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, 7 и 8 соответственно.

2. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где TIP-1 представляет собой TIP-1 человека.

3. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащие варируемую область тяжелой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 1, или варируемую область легкой цепи, имеющую полипептидную последовательность, которая по меньшей мере на 95% идентична SEQ ID NO: 2.

4. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-3, где моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент способны индуцировать опосредованный эффекторами лизис клеток опухоли.

5. Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным, или человеческим, или гуманизированным.

6. Биспецифическое антитело, содержащее моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.

7. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5.

8. Вектор, содержащий выделенную нуклеиновую кислоту по п.7.

9. Клетка-хозяин, содержащая вектор по п.8.

10. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5 и фармацевтически приемлемый носитель.

11. Способ лечения злокачественной опухоли у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.10.

12. Способ нацеливания на TIP-1 на поверхности клетки злокачественной опухоли у пациента, включающий введение пациенту фармацевтической композиции по п.10.

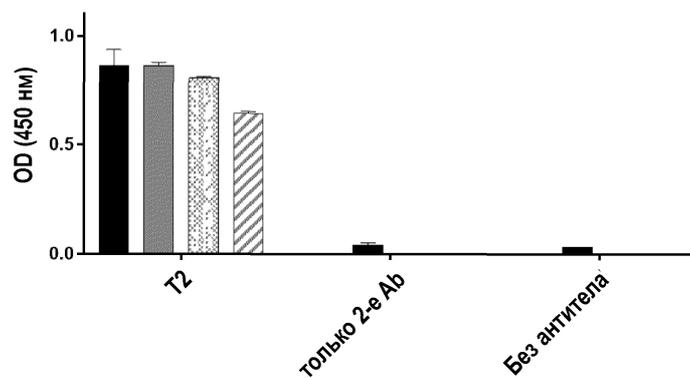
13. Способ получения моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-5, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновую кислоту, кодирующую моноклональное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, в условиях для продукции моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, и выделение антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из клетки или культуры.

14. Способ получения фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-5, включающий объединение моноклонального антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с фармацевтически приемлемым носителем с получением

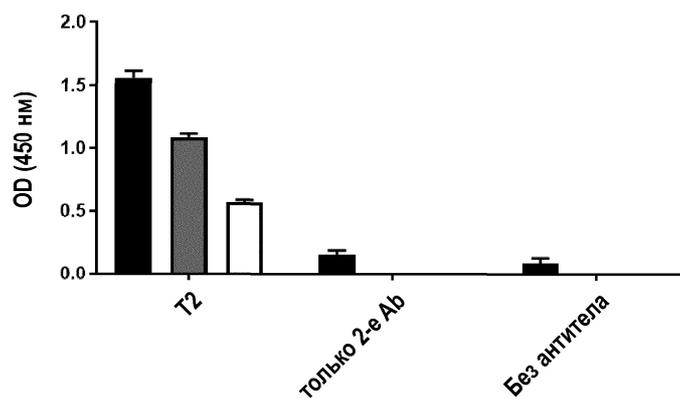
фармацевтической композиции.

15. Способ определения уровня ТПР-1 у индивида, включающий:

- a) получение образца у индивида;
  - b) приведение образца в контакт с выделенным моноклональным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-5;
  - c) определение уровня ТПР-1 у индивида.
16. Способ по п.15, где образец представляет собой образец ткани или образец крови.
17. Способ по п.16, где образец ткани представляет собой образец ткани злокачественной опухоли.



Фиг. 1



Фиг. 2

