

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290116** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2022.05.19

(22) Дата подачи заявки
2020.06.19

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

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

(31) **16/449,255**

(32) **2019.06.21**

(33) **US**

(86) **PCT/EP2020/067258**

(87) **WO 2020/254670 2020.12.24**

(71) Заявитель:

**УНИВЕРСИТА ДЕЛЬИ СТУДИ
МАНЬЯ ГРЕЧА КАТАНДЗАРО (IT)**

(72) Изобретатель:

Тассоне Пьерфранческо (IT)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к моноклональному антителу мыши, продуцируемому гибридной клеткой, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD n° 16001. Кроме того, изобретение относится к антителу, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH (SEQ ID NO: 1), YISSGSGNFYYVDTVKG (SEQ ID NO: 43), STYYHGSRGAMDY (SEQ ID NO: 3), SASSSVSSMYWY (SEQ ID NO: 4), DTSKMAS (SEQ ID NO: 5) и QQWSSYPPIT (SEQ ID NO: 6) соответственно. Кроме того, изобретение относится к антителам, распознающим тот же эпитоп.

A1

202290116

202290116

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-572441EA/026

МОНОКЛОНАЛЬНОЕ АНТИТЕЛО ПРОТИВ УНИКАЛЬНОГО ОПУХОЛЕАССОЦИИРОВАННОГО ЭПИТОПА CD43

1. ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] По настоящей заявке испрашивается приоритет по патентной заявке США № 16/449255, поданной 21 июня 2019 года, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

2. БИОЛОГИЧЕСКИЙ ДЕПОЗИТ

[0002] Гибридома, секретирующая mAb UMG1, депонирована в соответствии с Будапештским договором на 4 августа 2016 года в Interlab Cell Line Collection (ICLC) в Centro di Biotecnologie Avanzate (CBA) под регистрационным номером ICLC PD n° 16001.

3. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0003] CD43 является лейкоцитарным маркером, в норме ограниченным клетками гемопоэтического ростка. CD43 широко экспрессируется на большинстве периферических клеточных компонентов и клеточных компонентов костномозгового происхождения. Форма-предшественник CD43 мигрирует с кажущейся молекулярной массой 54 кДа. В своей зрелой форме CD43 является высокогликозилированным и имеет молекулярную массу от 115 до 200 кДа. CD4⁺ тимоциты и моноциты экспрессируют форму массой 115 кДа, в то время как активированные CD4⁺ 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 *et al.*, *Immunology Today* 19:546-50, 1998).

[0004] Моноклональное антитело мыши против CD43 человека, UN1, впервые описано 25 лет назад. Исходно выбранное по высокой реакционной способности против незрелых тимоцитов человека (Tassone *et al.*, *Tissue Antigens* 44:73-82, 1994), как было показано позже, mAb UN1 связывается не только с незрелыми тимоцитами, но также и с различными фетальными тканями (Cecco *et al.*, *Tissue Antigens* 51:528-535, 1998; Tassone *et al.*, *Int. J. Oncology* 20:707-711, 2002) и различными солидными опухолями, включая карциномы молочной железы, толстого кишечника, желудка и плоскоклеточные карциномы легких, но не с нормальными тканями и доброкачественными очагами (Tassone *et al.*, *Int. J. Oncol.* 20:707-11, 2002; Tassone *et al.*, *Anticancer Res.* 22:2333-40, 2002). Кроме того, показано, что уровень экспрессии эпитопа UN1 в клетках рака молочной железы коррелирует со стадией прогрессирования заболевания (Tassone *et al.*, *Anticancer Res.* 22:2333-40, 2002). Доказательства того, что эпитопа, распознаваемый UN1, являлся онкофетальным антигеном, экспрессирующимся в злокачественных тканях, но не в большинстве не-неопластических тканях взрослых, делает mAb UN1 привлекательным инструментом для детекции опухолей и иммунотерапии (обзор в Tuccillo *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 13(3), 2014).

[0005] Используя иммунопреципитацию и тандемную масс-спектрометрию, было показано, что антитело UN1 распознает эпитоп на CD43, включающий моносахарид, GalNAc, O-связанный с полипептидной цепью CD43 (de Laurentiis *et al.*, *Int. J. Biological Macromol.* 39:122-126, 2006; de Laurentiis *et al.*, *Molecular & Cellular Proteomics* 10:1-12, 2011).

[0006] Однако, несмотря на обширную функциональную характеристику антитела UN1, его последовательности CDR никогда не были определены. Гибридома, секретирующая антитело UN1, никогда не была депонирована в биологическом хранилище, и не был создан главный банк клеток или рабочий банк клеток гибридомы UN1. Существует потребность в антителах, связывающихся с тем же или схожим эпитопом, что и антитело UN1, для использования в лечении злокачественных опухолей, в частности, для лечения Т-клеточных острых лимфобластных лейкозов/ лимфобластных лимфом, и для использования в диагностике злокачественных новообразований.

4. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0007] За последние 25 лет авторы настоящего изобретения выращивали клетки, происходящие из исходной гибридомы UN1. Недавно полученный субклон секретирует моноклональное антитело, обозначенное как UMG1, сохраняющее некоторые из характеристик связывания исходного антитела UN1, но не все, и имеющее иную специфичность связывания, обеспечивающее конкретные преимущества.

[0008] В кратком изложении, антитело UMG1 связывается с небольшой субпопуляцией лимфоцитов в мононуклеарных клетках периферической крови (PBMC) здоровых людей-доноров (пример 1). UMG1-положительные лимфоциты, главным образом, являются CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD127⁺CCR7⁺ Т-лимфоцитами (пример 2).

[0009] Подобно UN1, антитело UMG1 связывается с линиями клеток T-ALL, главным образом, принадлежащим к классификации EGIL T3 (пример 3). Однако, в отличие от антитела UN1, антитело UMG1 не связывается с клетками рака молочной железы (пример 3). При первом тестировании антитело UMG1 не демонстрировало какого-либо связывания со злокачественными клетками при раке легких, колоректальном раке и раке молочной железы (пример 5), в отличие от предшествующих наблюдений в отношении UN1 (см. de Laurentiis *et al.*, *Molecular & Cellular Proteomics* 10:1-12, 2011, фиг. 9). Однако UMG1 связывается с клеточными иммунными инфильтратами в различных опухолях, включая рак легких, колоректальный рак и рак молочной железы (пример 5). Хотя UMG1 не связывается с клетками миелоидного происхождения среди PBMC здоровых доноров (пример 1), эпитоп UMG1 экспрессируется в опухолиассоциированных макрофагах, и экспрессия эпитопа UMG1 повышена, когда макрофаги сокультивируются и взаимодействуют со злокачественными клетками (пример 6).

[0010] UMG1 также связывается с некоторыми В-клеточными злокачественными новообразованиями, включая линию клеток макроглобулинемии Вальденстрема (пример 3).

[0011] UMG1 связывается с небольшой группой нейтрофилов здоровых доноров (пример 9). UMG1 не связывается с активированными Т-лимфоцитами здоровых доноров (пример 10).

[0012] С помощью тканевой матрицы здоровой ткани человека показано необычное распределение связывания mAb UMG1, ограниченное, главным образом, тимусом (главным образом, на кортикальных тимоцитах) и редкими рассеянными иммунными инфильтратами в органах, таких как лимфоузлы, кишечник и легкие (пример 11).

[0013] Данные, полученные с помощью тканевых матриц, свидетельствуют о том, что, в дополнение к лимфомам, эпитоп UMG1 также экспрессируется в меланоме и раке яичка различного происхождения (пример 11). Расширенный скрининг на множестве тканевых матриц также показал связывание антитела UMG1 с неопластическими клетками и иммунными инфильтратами, являющимися опухолями детского возраста различного происхождения (пример 11).

[0014] Химерные антитела, сконструированные посредством слияния переменных областей мышиного антитела UMG1 с Fc-областями IgG человека (ch-UMG1), могли индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против линии клеток Т-ALL HPB-ALL и линии клеток Т-клеточной лимфомы Н9 в присутствии эффекторных клеток из РВМС человека (пример 17). Антитела ch-UMG1 также могли индуцировать ADCC против клеток макроглобулинемии Вальденстрема (пример 18). Гуманизированные антитела, сконструированные посредством пересадки CDR из тяжелых и легких цепей UMG1 на каркасы человека (h-UMG1), могли снижать рост ксенотрансплантатов HPB-ALL в модели на мышах NSG (пример 21). И наконец, Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR) третьего поколения, в которых CAR-нацеливающим остатком является scFv, имеющий все 6 CDR антитела UMG1, активировались в присутствии клеток Т-клеточной лимфомы Н9 (пример 22), что позволяет предполагать, что UMG1-направляемая терапия CAR-Т-клетками будет эффективной при лечении Т-клеточной лимфомы.

[0015] Биспецифическое антитело UMG1-CD3 могло связываться с UMG1⁺ или CD3⁺ клетками и перенаправлять цитотоксичность Т-клеток на злокачественные клетки (примеры 23-30).

[0016] Специфичность антитела UMG1 делает его особенно подходящим для лечения подгруппы опухолей, экспрессирующих его целевой эпитоп, включая лимфомы (такие как неходжкинские лимфомы, образующиеся из периферических В-клеток или периферических Т-клеток, включая, в качестве неограничивающих примеров, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, MALT-лимфому, Т-клеточную лимфому, анапластическую крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому и лимфому из клеток мантийной зоны), рак яичка (такой как семинома, эмбриональная карцинома, опухоль желточного мешка и тератома), множественную миелому, меланому и солидные опухоли, аномально экспрессирующие эпитоп, такие как злокачественные опухоли

детского возраста или новообразования, в которых истощение опухолеассоциированных макрофагов окажется терапевтически полезным.

[0017] Таким образом, в первом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD43 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в способе лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем: введение терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 61-91 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0018] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 71-78 CD43 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 73-78 CD43 дикого типа.

[0019] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домен VH содержит: последовательность CDR1 VH SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 VH SEQ ID NO: 43 и последовательность CDR3 VH SEQ ID NO: 3; и где домен VL содержит: последовательность CDR1 VL SEQ ID NO: 4; последовательность CDR2 VL SEQ ID NO: 5 и последовательность CDR3 VL SEQ ID NO: 6.

[0020] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH представляет собой SEQ ID NO: 7, и последовательность VL представляет собой SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 является антителом мыши, продуцируемым гибридной линией клеток, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001 (UMG1). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 является химерным антителом, дополнительно содержащим домены константной области человека. В некоторых вариантах осуществления домены константной области человека являются доменами IgG. В некоторых вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 35.

[0021] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области переменного домена

человека. В некоторых вариантах осуществления домен VH имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; и домен VL имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

[0022] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент является F(ab), F(ab)'₂, scFv, диателом, однодоменным антителом, tandemным антителом или флексителом.

[0023] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может вызывать истощение опухолеассоциированных макрофагов (TAM).

[0024] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют с токсическим лекарственным средством.

[0025] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, MALT-лимфому, лимфому Беркитта, анапластическую крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому из клеток мантийной зоны.

[0026] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет множественную миелому.

[0027] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет меланому.

[0028] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет рак яичка. В некоторых вариантах осуществления рак яичка выбран из группы, состоящей из: семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли желточного мешка и тератомы.

[0029] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет нефробластому, нейробластому, карциному эндодермального синуса, ретинобластому, гепатобластому, медуллобластому, папиллому хориоидного сплетения, глиобластому, эпендимому, примитивную нейроэктодермальную опухоль, альвеолярную рабдомиосаркому, незрелую тератому или лейомиосаркому.

[0030] В другом аспекте настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу для применения в способе лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем: введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование, где биспецифическое антитело имеет первую специфичность связывания для эпитопа в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы,

нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет вторую специфичность связывания для CD3.

[0031] В другом аспекте настоящее изобретение относится к CAR-T-клетке для применения в способе лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем: введение терапевтически эффективного количества CAR-T-клеток пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование, где CAR-T-клетка связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0032] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD43 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в способе идентификации CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем: детектируемое приведение образца, содержащего CD43-положительную злокачественную клетку, в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0033] В другом аспекте настоящее изобретение относится к антителу против CD43 или его антигенсвязывающему фрагменту для применения в способе диагностики и лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем: детектируемое приведение образца от пациента в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом, постановку диагноза пациенту с CD43-положительным злокачественным новообразованием, если определяют связывание с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом, и введение пациенту терапевтически

эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0034] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения CD43-положительного злокачественного новообразования. Способ включает: введение терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 61-91 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0035] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 71-78 CD43 дикого типа. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 73-78 CD43 дикого типа.

[0036] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL), где домен VH содержит: последовательность CDR1 VH SEQ ID NO: 1; последовательность CDR2 VH SEQ ID NO: 43 и последовательность CDR3 VH SEQ ID NO: 3; и где домен VL содержит: последовательность CDR1 VL SEQ ID NO: 4; последовательность CDR2 VL SEQ ID NO: 5 и последовательность CDR3 VL SEQ ID NO: 6.

[0037] В некоторых вариантах осуществления последовательность VH представляет собой SEQ ID NO: 7, и последовательность VL представляет собой SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 является антителом мыши, продуцируемым гибридной линией клеток, депонируемой под регистрационным

номером ICLC PD № 16001 (UMG1). В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 является химерным антителом, дополнительно содержащим домены константной области человека. В некоторых вариантах осуществления домены константной области человека являются доменами IgG. В некоторых вариантах осуществления последовательность тяжелой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 35.

[0038] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области переменного домена человека. В некоторых вариантах осуществления домен VH имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; и домен VL имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

[0039] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 является моноклональным антителом. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент является F(ab), F(ab)'₂, scFv, диателом, однодоменным антителом, tandemным антителом или флексителом.

[0040] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может приводить к истощению опухолеассоциированных макрофагов (TAM).

[0041] В некоторых вариантах осуществления антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют с токсическим лекарственным средством.

[0042] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, MALT-лимфому, лимфому Беркитта, анапластическую крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому из клеток мантийной зоны.

[0043] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет множественную миелому.

[0044] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет меланому.

[0045] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет рак яичка. В некоторых вариантах осуществления рак яичка выбран из группы, состоящей из: семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли желточного мешка и тератомы.

[0046] В некоторых вариантах осуществления пациент имеет нефробластому, нейробластому, карциному эндодермального синуса, ретинобластому, гепатобластому, медуллобластому, папиллому хориоидного сплетения, глиобластому, эпендимому, примитивную нейроэктодермальную опухоль, альвеолярную рабдомиосаркому, незрелую тератому или лейомиосаркому.

[0047] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающему: введение

терапевтически эффективного количества биспецифического антитела пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование, где биспецифическое антитело имеет первую специфичность связывания для эпитопа в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело имеет вторую специфичность связывания для CD3.

[0048] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающему: введение терапевтически эффективного количества CAR-T-клеток пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование, где CAR-T-клетка связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0049] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу идентификации CD43-положительного злокачественного новообразования, включающему: детектируемое приведение образца, содержащего CD43-положительную злокачественную клетку, в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

[0050] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способу диагностики и лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающему: детектируемое приведение образца от пациента в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом, постановку диагноза пациенту с CD43-положительным злокачественным новообразованием, если определяют связывание с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом, и введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа, и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

5. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0051] Файл патента или заявки содержит по меньшей мере один чертеж, выполненный в цвете. Копии этого патента или публикации патентной заявки с цветными чертежами будет предоставлен Учреждением после запроса и оплаты необходимой пошлины.

[0052] Лучшего понимания признаков и преимуществ изобретения можно достичь с помощью следующего подробного описания, в котором приведены иллюстративные варианты осуществления, в которых используют принципы изобретения, и сопутствующих чертежей, на которых:

[0053] На фигурах 1A и 1B показана экспрессия эпитопа, распознаваемого антителом UMG1, на мононуклеарных клетках периферической крови панели здоровых доноров и сравнение с коммерческим антителом против CD43. На диаграмме рассеяния на фиг. 1A показаны данные, полученные посредством проточной цитометрии. По оси x показано определяемое прямое светорассеяние (FSC), по оси y показано боковое светорассеяние (SSC). Каждая точка соответствует одной клетке. На гистограмме на фиг. 1B по оси x показана интенсивность сигнала фикоэритрина. По оси y соотносят интенсивности сигнала с максимальной интенсивностью сигнала (т.е. 100%) неокрашенного образца. Красная кривая относится к неокрашенному контролю, синяя кривая относится к клеткам, окрашенным скремблированным IgG1 (т.е. отрицательному контролю), оранжевая кривая относится к окрашенным mAb UMG1 клеткам, и зеленая кривая относится к клеткам, окрашенным антителом против CD43.

[0054] На фигурах 2A-2D показаны четыре типичные диаграммы рассеяния популяций клеток, распознаваемых антителом UMG1, продуцируемым гибридной

клеткой, депонируемой по изобретению. На фиг. 2А и 2С показаны две диаграммы рассеяния, относящиеся к лимфоцитам. Фиг. 2В и 2D относятся к лимфоцитам, определяемым с помощью антитела UMG1, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой по изобретению. На фиг. 2А и 2В ось x соответствует интенсивности сигнала CD4, в то время как ось y соответствует интенсивности сигнала CD8. На фиг. 2С и 2D ось x соответствует интенсивности сигнала CD45го, и ось y соответствует интенсивности сигнала CCR7.

[0055] На фигурах 3А-3В показаны две гистограммы. На фиг. 3А показана экспрессия UMG1, определяемая с помощью антитела UMG1 на линии клеток BCWM.1. На фиг. 3В показана экспрессия UMG1 на линии клеток MWCL.1. Незакрашенная кривая соответствует неокрашенному контролю, кривая, заполненная горизонтальными полосами, соответствует клеткам, окрашенным вторичным mAb, кривая, заполненная вертикальными полосами, соответствует клеткам, окрашенным скремблированным IgG и вторичным mAb, и кривая, заполненная диагональными полосами, соответствует клеткам, окрашенным mAb UMG1.

[0056] На фигуре 4 показаны опухолеассоциированные макрофаги (TAM), распознаваемые антителом UMG1. Стрелками указаны TAM, инфильтрирующие образец колоректальной карциномы.

[0057] На фигурах 5А-5В показаны макрофаги THP1-происхождения. На фиг. 5А показаны макрофаги THP1-происхождения, окрашенные: контрольным IgG1 в отсутствие опухолевых клеток (первый ряд), ch-UMG1 (химерное антитело по аспекту 2 настоящего изобретения, где исходную Fc-область мыши заменяли полностью человеческой Fc-областью IgG1) в отсутствие опухолевых клеток (второй ряд) и ch-UMG1 в присутствии линии клеток рака поджелудочной железы PANC1 (третий ряд, и показано более подробно на фиг. 5В). Первый столбик соответствует окрашиванию DAPI, второй столбик соответствует антителу и меченому Alexa-Fluor 488 вторичному антителу, и третий столбик представляет собой наложенное изображение.

[0058] Фигуры 6А-6В представляют собой столбиковые диаграммы, на которых показаны результаты анализа дегрануляции для оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в отношении НРВ-ALL (фиг. 6А) и линии клеток Н9 (фиг. 6В). Числа по оси x соответствуют разным тестируемым образцам: образец без мишени указан как (1), эффектор и клетки-мишени (E+T) (2), отрицательный контроль (NC) 200 мкг/мл (3), ch-UMG1 10 мкг/мл (4), ch-UMG1 50 мкг/мл (5), ch-UMG1 100 мкг/мл (6), ch-UMG1 200 мкг/мл (7), положительный контроль (PC) 200 мкг/мл (8). Ось y соответствует процентной доли CD107a⁺ NK-клеток, затронутых ADCC, относительно общего количества тестируемых CD107a⁺ NK-клеток на образец.

[0059] Фигура 7 представляет собой столбиковую диаграмму, на которой показаны результаты анализа дегрануляции для оценки антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) в линии клеток BCWM.1. Числа по оси x соответствуют разным образцам. Числа по оси x соответствуют разным тестируемым образцам: образец без

мишени указан как (1), эффектор и клетки-мишени (E+T) (2), отрицательный контроль (NC) 200 мкг/мл (3), ch-UMG1 10 мкг/мл (4), ch-UMG1 50 мкг/мл (5), ch-UMG1 100 мкг/мл (6), ch-UMG1 200 мкг/мл (7), положительный контроль (PC) 200 мкг/мл (8). Ось у соответствует процентной доли CD107a⁺ NK-клеток, затронутых ADCC, относительно общего количества тестируемых CD107a⁺ NK-клеток на образец.

[0060] Фигура 8 представляет собой столбиковую диаграмму, на которой показано, что CD3⁺-экспрессирующие лимфоциты (CAR-T) могли высвобождать значимо более высокое количество интерферона гамма (ИФН γ) в присутствии клеток Н9. По оси у показана концентрация экспрессируемого ИФН γ в нг/мл. По оси x указанные числа соответствуют разным тестируемым клеткам: (1) указаны нетрансдуцированные Т-клетки (отрицательный контроль); (2) указаны Т-клетки, трансдуцированные с использованием контрольного CAR (контрольный носитель); и (3) указаны Т-клетки, трансдуцированные с использованием CAR-UMG1.

[0061] Фигура 9 представляет собой столбиковую диаграмму, на которой показано, что CAR-T могли высвобождать значимо более высокое количество интерлейкина 2 (ИЛ-2) в присутствии клеток Н9. По оси у показана концентрация экспрессируемого ИЛ-2 в нг/мл. По оси x указанные числа соответствуют разным тестируемым клеткам: (1) указаны нетрансдуцированные Т-клетки (отрицательный контроль); (2) указаны Т-клетки, трансдуцированные с использованием контрольного CAR (контрольный носитель); и (3) указаны Т-клетки, трансдуцированные с использованием CAR-UMG1.

[0062] Фигура 10 представляет собой столбиковую диаграмму, на которой показано, что CAR-T могли индуцировать селективное уничтожение клеток Н9. По оси у указано соотношение погибших/живых клеток. По оси x указаны: Н9 в отдельности (1), Н9 в присутствии нетрансдуцированных Т-клеток (2), Н9 в присутствии Т-клеток, трансдуцированных с использованием контрольного CAR (3), и Н9 в присутствии Т-клеток, трансдуцированных с использованием CAR-UMG1, также обозначаемого как UMG1-CAR (4).

[0063] Фигура 11 является линейным графиком, представляющим собой кривые объема опухоли в эксперименте *in vivo*, в котором сравнивали контрольный IgG1 (ритуксимаб) с гуманизированной версией UMG1-mAb (h-UMG1) и афукозилированной версией UMG1-mAb (a-h-UMG1). На графике h-UMG1 указано линией с квадратами, a-h-UMG1 указано линией с треугольниками, и контрольный IgG1 указан линией с кружками.

[0064] На фигурах 12А и 12В показаны типичные результаты проточной цитометрии при прямом окрашивании h-UMG1-PE и тремя коммерчески доступными антителами против CD43. На фиг. 12А показано окрашивание линии клеток человека ALL-SIL. На фиг. 12В показано окрашивание линии клеток KE-37.

[0065] На фигурах 13А и 13В показаны анализы конкурентного связывания. На фиг. 13А показаны типичные результаты анализа конкурентного связывания между h-UMG1, h-UMG1-PE и тремя коммерчески доступными антителами против CD43 на линии клеток СЕМ. На фиг. 13В показаны типичные результаты анализа конкурентного связывания

между h-UMG1, h-UMG1-PE и тремя коммерчески доступными антителами против CD43 на линии клеток HPB-ALL.

[0066] На фигурах 14A-14C показаны типичные изображения окрашивания m-UMG1 в воспалительном инфильтрате в трех разных опухолях человека. На фиг. 14A показано окрашивание m-UMG1 при колоректальной аденокарциноме. На фиг. 14B показано окрашивание m-UMG1 при раке легких аденокарцинома. На фиг. 14C показано окрашивание m-UMG1 при раке молочной железы.

[0067] На фигурах 15A-15F показаны типичные результаты из примера 12. На фиг. 15A показана аминокислотная последовательность полноразмерного CD43 (SEQ ID NO: 17). Фиг. 15B является иллюстрацией, на которой показаны варианты белка CD43, используемые для трансфекции клеток НЕК293Т. На фиг. 15C и 15E показаны результаты вестерн-блоттинга на белковых лизатах трансфицированных клеток НЕК293Т. Фиг. 15D и 15F представляют собой столбиковые диаграммы, на которых показаны результаты FACS трансфицированных клеток НЕК293Т.

[0068] На фигуре 16 показан скрининг антител h-UMG1 по их аффинности к антигену на линиях клеток HPB-ALL и H9, которые, как известно, являются положительными по эпитопу UMG1.

[0069] На фигурах 17A-17B показаны сравнительные профили проточной цитометрии h-UMG1 и UN1 на четырех разных линиях клеток гемопоэтического ростка. На фиг. 17A показаны зарегистрированные профили проточной цитометрии UN1 на линиях клеток гемопоэтического ростка, представленные в (Tassone *et al.*, *Tissue Antigens* 44:73-82, 1994). На фиг. 17B показаны профили проточной цитометрии UMG1 на линиях клеток гемопоэтического ростка, представленные в примере 8.

[0070] На фигурах 18A-18B показаны типичные изображения FACS обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 для осуществления анализа цитотоксичности Т-клеток на линиях клеток ALL-SIL (фиг. 18B) и KE-37 (фиг. 18A), как представлено в примере 23.

[0071] На фигуре 19 показана оценка кинетики связывания mAb h-UMG1 с анализом рекомбинантным CD43 человека (аминокислоты 20-253, SEQ ID NO: 42), экспрессирующимся в векторе *E. coli*, негликозилированный белок CD43. См., пример 15а.

[0072] На фигуре 20 показана плазмидная карта для конструкции, используемой для получения различных вариантов осуществления CAR-T, представленных в настоящем описании.

[0073] На фигурах 21A-21B показана эффективность mAb a-h-UMG1 (афукозилированного h-UMG1) и биспецифического антитела UMG1-CD3 на клетках Т-ALL, при этом на фиг. 21A показана эффективность mAb a-h-UMG1 и биспецифического антитела UMG1-CD3 на линии клеток СЕМ, и на фиг. 21B показана эффективность mAb a-h-UMG1 и биспецифического антитела UMG1-CD3 на первичных бластах Т-ALL.

[0074] На фигурах 22A-22C показана эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 на линиях клеток Т-ALL в разных концентрациях, при этом на фиг. 22A

показана эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 на линии клеток СЕМ, на фиг. 22В показана эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 на линии клеток КЕ37, и на фиг. 22С показана эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 на линии клеток ALL-SIL.

[0075] На фигуре 23 показано индуцирование апоптоза разными дозами биспецифического антитела UMG1-CD3 по сравнению с необработанным контролем (NC).

[0076] На фигуре 24 показана роль CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток в индуцировании ответа на обработку биспецифическим антителом UMG1-CD3.

[0077] На фигуре 25 показана пролиферация РВМС в отсутствие или в присутствии увеличивающихся концентраций биспецифического антитела UMG1-CD3.

[0078] На фигурах 26А-26В показана пролиферация РВМС в отсутствие или в присутствии биспецифического антитела UMG1-CD3, при этом на фиг. 26А показана пролиферация РВМС в отсутствие биспецифического антитела UMG1-CD3, и на фиг. 26В показана пролиферация РВМС в присутствии биспецифического антитела UMG1-CD3.

[0079] На фигурах 27А-27В показана экспрессия маркеров активации Т-клеток в отсутствие или в присутствии увеличивающихся концентраций биспецифического антитела UMG1-CD3, при этом на фиг. 27А показана процентная доля CD69-положительных клеток, и на фиг. 27В показана процентная доля CD25-положительных клеток.

[0080] На фигурах 28А-28D показано индуцирование ИФН γ и ФНО α в CD4⁺ и CD8⁺ Т-клетках, при этом на фиг. 28А показано индуцирование ИФН γ в CD4⁺ Т-клетках, на фиг. 28В показано индуцирование ИФН γ в CD8⁺ Т-клетках, на фиг. 28С показано индуцирование ФНО α в CD4⁺ Т-клетках, и на фиг. 28D показано индуцирование ФНО α в CD8⁺ Т-клетках.

[0081] На фигуре 29 показан эффект обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 в отношении экспрессии белка NF κ B в РВМС и линии клеток ССRF-СЕМ, соответственно.

[0082] На фигурах 30А-30F показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линий клеток множественной миеломы, при этом на фиг. 30А показана экспрессия эпитопа UMG1 на линии клеток Delta 47, на фиг. 30В показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток Delta 47, на фиг. 30С показана экспрессия эпитопа UMG1 на линии клеток H929, на фиг. 30D показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток H929, на фиг. 30Е показана экспрессия эпитопа UMG1 на линии клеток KMS26, и на фиг. 30С показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток KMS26.

[0083] На фигурах 31А-31С показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток рака яичка (семиномы), ТСАМ2, при этом на фиг. 31А показана экспрессия эпитопа UMG1 на линии клеток ТСАМ2, на фиг. 31В показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток ТСАМ2 по сравнению с отрицательным контролем (NC), и на фиг. 31С

показана эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток ТСАМ2 по сравнению с отрицательным контролем (NC) и моноклональным антителом а-h-UMG1.

[0084] На фигуре 32 показана связывающая активность биспецифического антитела UMG1-CD3 в разных концентрациях в отношении линий клеток СЕМ, Jurkat и KE37.

[0085] На фигуре 33 показано связывание mAb h-UMG1 на инактивированных и активированных нейтрофилах.

[0086] На фигурах 34А-34D показаны результаты FACS связывания IgG изотипического контроля и mAb h-UMG1 на активированных Т-клетках, при этом на фиг. 34А показано связывание IgG изотипического контроля на CD25-положительных клетках, на фиг. 34В показано связывание IgG изотипического контроля на CD69-положительных клетках, на фиг. 34С показано связывание mAb h-UMG1 на CD25-положительных клетках, и на фиг. 34D показано связывание mAb h-UMG1 на CD69-положительных клетках.

[0087] На фигуре 35 показаны результаты эпитопного картирования связывания mAb h-UMG1 (гуманизированного mAb против CD43) на пептидном микрочипе CD43 человека.

[0088] На фигуре 36 показаны результаты эпитопного картирования связывания mAb h-UMG1 (гуманизированного mAb против CD43) на пептидном микрочипе PPSTSINEGSPLWTS (SEQ ID NO: 51).

[0089] На фигурах 37А-С показаны тепловая карта, матрица замен и график аминокислот, на котором показаны консервативные аминокислоты для связывания mAb h-UMG1, при этом на фиг. 37А показана тепловая карта, на фиг. 37В показана матрица замен, и на фиг. 37С показан график аминокислот.

[0090] На фигурах 38А-С показано связывание mAb UMG1 на тканях человека, при этом на фиг. 38А показано связывание UMG1 на тимоцитах с характерным повышенным наличием положительных клеток в коре тимуса (вставка), на фиг. 38В показано мембранное и цитоплазматическое связывание mAb UMG1 на миндалинах человека, и на фиг. 38С показано цитоплазматическое связывание, наблюдаемое на тканевых макрофагах в легких.

[0091] На фигурах 39А-В показано связывание mAb UMG1 в отношении диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы и Т-клеточной лимфомы, при этом на фиг. 39А показано связывание UMG1 в отношении диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, и на фиг. 39В показано связывание UMG1 в отношении Т-клеточной лимфомы. Типичные изображения на тканевой матрице Ly2084.

[0092] На фигурах 40А-В показано связывание mAb UMG1 на тканях меланомы и семиномы, при этом на фиг. 40А показано связывание UMG1 на ткани меланомы (ME2081), и на фиг. 40В показано связывание UMG1 на ткани семиномы (TE2081).

6. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

6.1. Определения

[0093] Если не указано иначе, все термины в этой области, обозначения и другая научная терминология, используемая в настоящем описании, должна иметь значение, общепринято понятное специалистам в этой области.

[0094] Моноклональное антитело "UMG1" является антителом мыши против CD43 человека, продуцируемым гибридной линией клеток, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD n° 16001.

[0095] В рамках изобретения, если не указано иначе, термин "антитело" имеет наиболее широкое известное в этой области значение и включает все известные форматы, включая, в качестве неограничивающих примеров: бивалентные моноспецифические моноклональные антитела, бивалентные биспецифические антитела, тривалентные триспецифические антитела, F(ab)-фрагменты, F(ab)'₂-фрагменты, scFv-фрагменты, диатела, однодоменные антитела, включая однодоменные антитела V_HH верблюдовых, тандемные антитела и флекситела.

[0096] В рамках изобретения термины "лечить" или "лечение" используют в их наиболее широком приемлемом клиническом смысле. Термины включают, в качестве неограничивающих примеров, уменьшение признака или симптома заболевания; улучшение признака или симптома заболевания; облегчение симптомов; уменьшение степени заболевания; стабилизацию (т.е. неухудшение) состояния заболевания; задержку или замедление прогрессирования заболевания; улучшение или временное облегчение состояния заболевания; ремиссию (частичную или общую), детектируемую или недетектируемую; излечение; пролонгирование выживаемости по сравнению с выживаемостью, ожидаемой в отсутствие лечения. Если четко не указано иное, термины "лечить" или "лечение" не предназначены для обозначения профилактики или предотвращения развития заболевания.

[0097] Термин "индивидуум" означает любого индивидуума, в частности, млекопитающего, для которого желательной является диагностика, прогнозирование или терапия. Млекопитающие включают людей, домашних животных, сельскохозяйственных животных и зоопарковых животных, спортивных животных или животных-домашних питомцев, таких как собаки, кошки, морские свинки, кролики, крысы, мыши, лошади, крупный рогатый скот, коровы и т.д. Если не указано иначе, термин "пациент" предназначен для включения "индивидуума"-человека.

[0098] Термин "достаточное количество" означает количество, достаточное для достижения желаемого эффекта, например, количество, достаточное для модуляции агрегации белка в клетке.

[0099] Термин "терапевтически эффективное количество" является количеством, являющимся эффективным при лечении заболевания. "Профилактически эффективное количество" является количеством, являющимся эффективным для замедления дебюта или профилактики заболевания.

[00100] В настоящем описании термины "содержит", "содержащий", "имеющий", "включает", "включающий" и их грамматические варианты имеют значение,

приписываемое им в патентном праве США, допуская наличие дополнительных компонентов помимо конкретно перечисленных.

[00101] В рамках изобретения термины в единственном числе включают ссылку на множественное число, если контекст четко не указывает на иное. Термины "включают", "такие как" и т.п. предназначены для передачи включения без исключения, если не указано иначе.

[00102] Диапазоны, представленные в настоящем описании, следует понимать как краткую запись для всех значений в пределах диапазона, включая указанные конечные точки. Например, диапазон от 1 до 50 следует понимать как включающий любое число, комбинацию чисел или поддиапазон из группы, состоящей из 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49 и 50.

[00103] Если не указано иначе или иное не очевидно из контекста, в рамках изобретения термин "приблизительно" следует понимать как в пределах диапазона нормального допуска в этой области.

6.2. Общий обзор

[00104] Настоящее изобретение относится к новым гуманизированным и мышинным антителам против CD43 и полученным из них связывающим молекулам, имеющим иную экспрессию и связывающие свойства по сравнению другими, ранее описанными и коммерчески доступными антителами против CD43.

6.3. CD43-связывающие белки

6.3.1. Моноклональные антитела мыши UMG1

[00105] В первом аспекте изобретение относится к моноклональному антителу мыши, продуцируемому гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001.

[00106] Гибридную клетку депонировали в соответствии с Будапештским договором в Interlab Cell Line Collection (ICLC) в Centro Biotecnologie Avanzate (CBA), Largo Rosanna, 10, 16132 Genova, Italy под регистрационным номером ICLC PD n° 16001 на 4 августа 2016 года. Антитело тестировали в приведенных ниже примерах. Как показано в примерах, антитело связывается со специфическим эпитопом на CD43 в части белка, который может являться сиалогликозилированным.

[00107] В первом аспекте изобретение дополнительно относится к антителу, содержащему переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 содержат аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH (SEQ ID NO: 1), YISSGSGNFYYVDTVKG (SEQ ID NO: 43), STYYHGSRGAMDY (SEQ ID NO: 3), SASSSVSSMYWY (SEQ ID NO: 4), DTSKMAS (SEQ ID NO: 5) и QQWSSYPPI (SEQ ID NO: 6), соответственно. Эти последовательности также приведены как SEQ ID NO: 1-6.

[00108] В некоторых вариантах осуществления антитело содержит все три определяющие комплементарность области (CDR) тяжелой цепи и все три CDR легкой цепи антитела.

[00109] Упомянутые выше последовательности CDR являются последовательностями CDR из моноклонального антитела мыши, продуцируемого гибридомной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001, что определено посредством секвенирования.

[00110] 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), Kabat 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 перекрывание или подгруппы аминокислотных остатков при сравнении друг с другом. Аминокислотные остатки, составляющие CDR, определяемые с помощью каждой из процитированных выше ссылок, приведены для сравнения. Предпочтительно, термин "CDR" означает CDR, определяемую по Kabat на основе сравнений последовательностей. CDRH1, CDRH2 и CDRH3 означают CDR тяжелой цепи, и CDRL1, CDRL2 и CDRL3 означают CDR легкой цепи.

[00111] Это моноклональное антитело может иметь каркасные последовательности из любого биологического вида. Предпочтительно, оно может иметь каркас мыши или человека.

[00112] В рамках изобретения термин "аминокислотные остатки каркаса (FR)" 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).

[00113] 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.

[00114] Во втором аспекте изобретение относится к антителу, распознающему тот же эпитоп, что и антитело по первому аспекту.

[00115] Как правило, и как известно в этой области, антитело является белком, принадлежащим к семейству белков иммуноглобулинов и состоящим в своих варибельных областях из каркасных областей и определяющих комплементарность областей, как определено выше. В природе антитела продуцируются плазматическими клетками в ответ на некоторый антиген. В основном, каждое антитело имеет две идентичные тяжелые цепи иммуноглобулина и две идентичные легкие цепи

иммуноглобулина. Каждая тяжелая и каждая легкая цепь могут иметь переменную и константную область. Константная область тяжелой цепи может представлять собой один из пяти типов тяжелых цепей Ig млекопитающих: α , δ , ϵ , γ и μ . Тип присутствующей тяжелой цепи, как правило, определяет класс (изотип) антитела: антитела IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. Аналогично, константная область легкой цепи может представлять собой один из двух типов легких цепей Ig млекопитающих: κ и λ . Переменные области тяжелых и легких цепей, как правило, состоят из уникальной комбинации многочисленных белковых последовательностей, что делает возможным связывание с конкретным антигеном.

[00116] В рамках изобретения термин "антитело" также охватывает выделенное антитело.

[00117] В основном, каждая тяжелая цепь соединена с одной из легких цепей, при этом переменные 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 быть соединены с помощью константных областей их тяжелых цепей, образуя "Y"-образную молекулу, при этом два плеча представляют собой антигенсвязывающую переменную область, а стебель представляет собой константную область.

[00118] 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 соответствующие переменные домены, при этом каждый домен может содержать дополнительные модификации, такие как мутации, делеции или инсерции, не изменяющие общую доменную структуру.

[00119] Кроме того, антитело по второму аспекту настоящего изобретения может образовывать гомо- или гетеродимер или гомо- или гетеромультимер, при этом термины "димер" и "мультимер" означают, что два и по меньшей мере три антитела, соответственно, могут комбинироваться с образованием комплекса. Приставка "гомо" означает, что комплекс может образовываться из идентичных молекул антител, при этом приставка "гетеро" означает, что комплекс может образовываться из разных молекул антител.

[00120] В основном, термин "антитело" предназначен для включения всех указанных выше изотипов иммуноглобулинов, т.е. антитело может являться антителом IgA, IgD, IgE, IgG или IgM, включая любой подкласс этих изотипов. Предпочтительно, антитело является антителом IgG. Т.к. антитело можно экспрессировать и продуцировать рекомбинантно, антитело также может содержать две разные константные области тяжелых цепей, например, одну тяжелую цепь IgG1 и одну тяжелую цепь IgG2 или тяжелые цепи из разных биологических видов. Однако, тяжелые цепи, предпочтительно, получают из одного и того же биологического вида. Кроме того, антитело может содержать легкую цепь λ или κ .

[00121] Антитело, распознающее тот же эпитоп, что и одно из антител по первому аспекту изобретения, дополнительно может являться антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRH1, CDRH2 и CDRH3, и переменную область легкой цепи, содержащую определяющие комплементарность области CDRL1, CDRL2 и CDRL3, где CDRH1, CDRH2, CDRH3, CDRL1, CDRL2 и CDRL3 имеют аминокислотные последовательности GFTFSSFGMH (SEQ ID NO: 1), YISSGSGNFYYVDTVKG (SEQ ID NO: 43), STYYHGSRGAMDY (SEQ ID NO: 3), SASSSVSSMYWY (SEQ ID NO: 4), DTSKMAS (SEQ ID NO: 5) и QQWSSYPPI (SEQ ID NO: 6), соответственно.

[00122] Кроме того, антитело, распознающее тот же эпитоп, что и одно из антител по первому аспекту изобретения, может являться антителом, где CDR, по сравнению с указанными выше последовательностями, имеет по меньшей мере одну консервативную замену аминокислоты, например, схожую аминокислоту с химической структурой и свойствами и/или функцией, схожими с исходной аминокислотой.

[00123] 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 представлены в настоящем описании ниже.

[00124] Как правило, антитело по второму аспекту изобретения может иметь последовательность, особенно в своих 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 как ICLC PD n° 16001.

[00125] В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, имеющей 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7, например, имеющей 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSVAVSGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGSGNFYYVDTVKG RFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQGTSVTVSS (SEQ ID NO: 7). В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В

некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7.

[00126] В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, имеющей 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12, например, имеющей 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении

Q I A L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V S S M Y W Y Q L K P G S S P R L L I Y D T S K M A S G V P I R
F S G S G S G T S F S L T V S R V E A E D A A T Y Y C Q Q W S S Y P P I T F G A G S K L E L K (SEQ ID NO: 12).

В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную

последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12.

[00127] В некоторых вариантах осуществления антитело мыши содержит переменную область тяжелой цепи с аминокислотной последовательностью, имеющей 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 7, например, имеющей 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVA YISSGSGNF YYVDTVKGFRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQG TSVTVSS (SEQ ID NO: 7), и переменную область легкой цепи с аминокислотной последовательностью, имеющей 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 12, например, имеющей 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении QIALTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSSMYWYQLKPGSSPRLLIYDTSKMASGVPIR FSGSGSGTFSFLTVSRVEAEDAATYYCQWSSYPPIITFGAGSKLELK (SEQ ID NO: 12).

6.3.2. Моноспецифические, биспецифические и мультиспецифические антитела UMG1

[00128] Как правило, антитело по изобретению может являться моноклональным, биспецифическим или полиспецифическим антителом. Такие антитела известны в этой области.

[00129] В рамках изобретения термин "моноклональный" можно понимать в самом широком смысле описания антител, продуцируемых отдельным клоном В-лимфоцитов, или антител, имеющих ту же или схожую аминокислотную последовательность.

[00130] В рамках изобретения термин "биспецифический" можно понимать в самом широком смысле, как описывающий антитела, взаимодействующие с двумя разными эпитопами. Биспецифическое антитело можно получать из двух моноклональных антител. Необязательно, эти два разных эпитопа могут локализоваться на одном и том же антигене, но они также могут локализоваться на двух разных антигенах.

[00131] В рамках изобретения термин "мультиспецифический" можно понимать в самом широком смысле, как описывающий антитела, взаимодействующий с тремя или более разными типами эпитопов. Необязательно, эти эпитопы могут локализоваться на одном и том же антигене или двух или более антигенах.

[00132] Предпочтительно, антитело по второму аспекту изобретения является моноклональным антителом.

[00133] Кроме того, антитело по второму аспекту изобретения, предпочтительно, является биспецифическим или мультиспецифическим антителом.

[00134] Способы получения антител хорошо известны специалистам в этой области. Предпочтительно, антитела получают, получая гибридомные клетки. Способы получения гибридомных клеток, а также способы получения антител с помощью гибридомных клеток хорошо известны специалистам в этой области. Как правило, мышам инъецируют желаемый антиген и умерщвляют через несколько дней для выделения клеток селезенки, секретирующих антитела против желаемого антигена. В основном, слияние этих антитело-секретирующих клеток селезенки с иммортализованными несекретирующими миеломными клетками приводит к получению гибридомных клеток. Затем эти гибридомные 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.

[00135] Бифункциональные или биспецифические антитела могут иметь антигенсвязывающие участки разной специфичности. Различные формы биспецифических антител и их получение известны специалистам в этой области. Например, они включают BSIgG, являющиеся молекулами IgG, содержащими две разные тяжелые цепи и две разные легкие цепи, секретируемые так называемыми "гибридными гибридами", и гетероантительные конъюгаты, получаемые посредством химической конъюгации антител или фрагментов антител разной специфичности (Segal DM et al. *Current Opin. Immunol.* 1999, 11:558-562; Van Spruiel AB et al. *Immunology Today* 2000, 21:391-397; каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

[00136] **Производство:** Биспецифические антитела можно получать для доставки клеток, цитотоксинов или лекарственных средств в конкретные участки. Важным может являться использование для доставки цитотоксических клеток организма-хозяина, таких как NK-клетки или цитотоксические Т-клетки, к специфическим клеточным мишеням (P. J. Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 79: 315, включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Другим важным использованием может являться доставка цитотоксических белков к специфическим клеточным мишеням (V. Raso, T. Griffin, *Cancer Res.* 1981, 41:2073; S. Honda et al., *Cytotechnology*, 1990, 4:59, включенные в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Дополнительным важным использованием может являться доставка противоопухолевых небелковых лекарственных средств к специфическим клеточным мишеням (J. Corvalan et al., *Intl. J. Cancer Suppl.* 1988, 2:22; M. Pimm et al., *British J. of Cancer* 1990, 61:508; каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме). Такие биспецифические антитела можно получать посредством химической перекрестной сшивки (M. Brennan et al., 1985, *Science* 229:81; включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), реакции 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; включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

[00137] В рамках изобретения термин "эпитоп" можно понимать в самом широком смысле как часть молекулы CD43, которую может распознавать и связывать антитело, продуцируемое гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 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.

[00138] Эпитопы, как правило, состоят из химически активных поверхностных группировок молекул, таких как аминокислоты или сахарные боковые цепи, и, как правило, имеют специфические трехмерные структурные характеристики, а также специфические зарядовые характеристики.

[00139] 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 дополнительно может быть основано на трехмерной структуре и соответствующих поверхностных признаках антигена, которые могут включать прерывистый участок аминокислотной последовательности, содержащий аминокислоты в отдаленных локациях, взаимодействующие с антителом.

[00140] 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 эпитопа идентичный или стерически перекрывающиеся эпитопы, являются конкурентные анализы, которые, как правило, можно сконфигурировать во всех из ряда различных форматов, с использованием меченого антигена или меченого антитела. Например, антиген иммобилизуют на 96-луночном планшете и измеряют способность немеченных антител блокировать связывание меченых антител с использованием радиоактивных или ферментативных меток.

[00141] Антитело, распознающее "тот же эпитоп", что и антитело по первому аспекту, как правило, относится к антителу, блокирующему связывание референсного антитела со своим 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.

[00142] В основном, эпитоп, распознаваемый и связываемый антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001, можно идентифицировать любым подходящим способом эпитопного картирования, известным в этой области, в комбинации с антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001.

[00143] Примеры такого способа включают скрининг пептидов различной длины, полученных из CD43, на связывание с антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 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. Способы идентификации пептидов, связывающихся с антителом, хорошо известны специалисту в этой области, 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 аминокислоты в меченом пептиде, взаимодействующем с немеченым антителом, можно определять по изменению их положения в спектрах ЯМР. Как правило, различия между двумя спектрами позволяют идентифицировать аминокислоты в CD43, участвующие во взаимодействии с антителом. Предпочтительно, масс-спектрометрический анализ используют для идентификации пептидов, связывающихся с антителом.

[00144] Например, эпитоп, распознаваемый и связываемый антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001, также можно идентифицировать способом, включающим амплификацию различных фрагментов ДНК CD43 посредством полимеразной цепной реакции (ПЦР), встраивание этих фрагментов в экспрессирующий вектор, включающее их присоединение к гистидиновому слитому белку, и, после экспрессии белка, детекцию эпитопа, например, посредством вестерн-блоттинга.

[00145] В дополнительном примере для определения участка на CD43, распознаваемого и связываемого антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001, экспрессирующий вектор, клонированный с CD43, можно встраивать с помощью делегационной мутации способом ПЦР для получения серии мутантов, такой как серия мутантов *Escherichia coli* (*E. coli*), экспрессирующей белки, имеющие различные делегированные участки в CD43. Этих мутантов *E. coli* можно культивировать и индуцировать в них экспрессию. Анализ вестерн-блоттинга можно осуществлять с использованием лизата клеток в качестве антигена.

[00146] Дополнительные способы идентификации эпитопа, распознаваемого и связываемого антителом, продуцируемым гибридной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001, могут включать детекцию посредством иммунологических анализов, таких как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA).

[00147] В рамках изобретения термин "аффинность" можно понимать в самом широком смысле как силу взаимодействия между эпитопом и эпитоп-связывающим участком антитела. Способы определения абсолютного значения аффинности антитела, т.е. константы аффинности, хорошо известны специалистам в этой области. Однако также как правило, можно определять относительные значения аффинностей антител, т.е. аффинность двух антител сравнивают без определения их абсолютных значений. Способы

сравнения аффинностей антител хорошо известны специалисту в этой области. Например, можно использовать проточную цитометрию, при этом 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.

[00148] **Способы скрининга:** Способы идентификации антител по второму аспекту, распознающие тот же эпитоп, что и антитело по первому аспекту, хорошо известны специалисту в этой области. Например, антитела по второму аспекту можно идентифицировать с помощью фагового дисплея на основе библиотек антител.

[00149] Таким образом, антитело по изобретению, распознающее тот же эпитоп, также может являться антителом человека.

[00150] В другом предпочтительном варианте осуществления антитело по второму аспекту является химерным антителом. В более предпочтительном варианте осуществления антитело по второму аспекту является химерным антителом по первому аспекту.

[00151] Химерное антитело является антителом, в котором по меньшей мере одна область иммуноглобулина биологического вида слита с другой областью иммуноглобулина другого биологического вида с помощью генетической инженерии для снижения его иммуногенности (см., например, патент США № 4816567 и патент США № 4816397).

6.3.3. Гуманизированные антитела UMG1

[00152] 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 в соответствии с антителом по первому аспекту.

[00153] В основном, гуманизированные антитела представляют собой конкретный тип химерных антител. Например, гуманизированные антитела можно получать посредством пересадки ДНК антитела человека на ДНК, кодирующую каркас антитела мыши, или посредством пересадки ДНК антитела мыши на ДНК, кодирующую каркас антитела человека. Предпочтительно, ДНК антитела человека пересаживают на ДНК, кодирующую каркас антитела мыши. В основном, пересадка ДНК включает пересадку одной или более последовательностей ДНК в целевую ДНК, кодирующую каркас антитела. Необязательно, переменные и константные области, а также тяжелые и легкие цепи, могут являться частично или полностью гуманизированными. Предпочтительно, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи антитела мыши являются гуманизированными. Более предпочтительно, переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи антитела мыши являются гуманизированными в результате изменения последовательности ДНК, кодирующей от 1 до 50, предпочтительно - от 1 до 30, более предпочтительно - от 1 до 20 аминокислот. Пересаженная ДНК, как правило, может содержать области ДНК шести гиперпеременных петель, определяющих специфичность антигена, также называемых определяющими комплементарность

областями (CDR), или области ДНК, несодержащие CDR, или и те, и другие. Предпочтительно, гуманизация включает пересадку ДНК, несодержащей CDR.

[00154] В основном, затем получаемую конструкцию ДНК можно использовать для экспрессии и продукции антител, как правило, являющихся менее иммуногенными или неиммуногенными по сравнению с принадлежащим человеку родительским антителом. Это включает продукцию модифицированных антител, таких как агликозилированный 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.

6.3.4. Сконструированные гуманизированные антитела

[00155] Настоящее изобретение также относится к сконструированным гуманизированным антителам, распознающим CD43. Антитело h-UMG1 может содержать одну или более из переменных областей тяжелой или легкой цепи, приведенных в SEQ ID NO: 8-11 и SEQ ID NO: 13-16, соответственно. Специалист в этой области может получать различные варианты осуществления, осуществляя одну или более консервативных замен аминокислотных остатков, представленных в настоящем описании. Термин "консервативная замена" или "консервативная аминокислотная замена" относится к замене аминокислоты химически или функционально схожей аминокислотой.

[00156] В некоторых вариантах осуществления антитело является IgG1, IgG2, IgG4 или IgM. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок является Fv-фрагментом, Fab-фрагментом, F(ab')₂-фрагментом, Fab'-фрагментом, scFv-фрагментом, scFv-Fc-фрагментом и/или однодоменным антителом.

[00157] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8, например, 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100%, или 99-100% идентичности последовательности в отношении EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSGNFYYVDTVKGFRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQGTLLVTVSS (SEQ ID NO: 8). В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых

вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 8.

[00158] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9, например, 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGSGNF YYVDTVKGFRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 9). В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,

96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 9.

[00159] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10, например, 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGNF YYVDTVKGFRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 10). В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 10.

[00160] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 11, например, 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGNF

YYVDTVKGFRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQ
 GTLVTVSS (SEQ ID NO: 11). В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1
 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности
 последовательности в отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления
 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или
 более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых
 вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную
 последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в
 отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1
 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности
 последовательности в отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления
 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или
 более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых
 вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную
 последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в
 отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1
 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности
 последовательности в отношении SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления
 антитело h-UMG1 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность,
 имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 11.
 В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную
 последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%,
 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO:
 11. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную
 последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ
 ID NO: 11.

[00161] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит
 аминокислотную последовательность, имеющую 60-100% идентичности
 последовательности в отношении SEQ ID NO: 13, например, 70-100%, 80-100%, 85-100%,
 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении
 EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSMYWYQKPGGLAPRLLIYDTSKMASGIPDRF
 SGSGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQQWSSYPPIFGQGTRLEIK (SEQ ID NO: 13).

[00162] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит
 аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности
 последовательности в отношении SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления
 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или
 более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 13. В некоторых
 вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную
 последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в
 отношении SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1

антитело h-UMG1 антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 14.

[00165] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60-100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15, например, 70-100%, 80-100%, 85-100%, 90-100%, 95-100%, 97-100% или 99-100% идентичности последовательности в отношении QVVMQTQSPAFLSVTPGEKVTITCSASSSVSSMYWYQQKPDQAPKLLIYDTSKMASGVPS RFSGSGSGTDFTFITSSLEAEDAATYYCQWSSYPPITFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 15).

[00166] В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 60% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 70% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 80% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 90% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 95% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 97% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 99% или более идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15. В некоторых вариантах осуществления антитело h-UMG1 содержит аминокислотную последовательность, имеющую 100% идентичности последовательности в отношении SEQ ID NO: 15.

антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против подгруппы EGIL T3 Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза (Т-ALL), против клеток Т-клеточной лимфобластной лимфомы и против клеток макроглобулинемии Вальденстрема (WM).

[00185] Лимфоциты принадлежат к группе лейкоцитов и являются медиаторами гуморального и клеточного иммунитета. Существует две группы лимфоцитов, В-клетки и Т-клетки.

[00186] Как и многие другие типы клеток, В- и Т-клетки могут аномально развиваться в В- и Т-клеточные опухоли. Из-за многочисленных стадий развития В- и Т-клеток, существуют различные типы опухолей. И В-клетки, и Т-клетки происходят из лимфоидных клеток-предшественников.

[00187] В случае В-клеток эта лимфоидная клетка-предшественник проходит через множества стадий развития В-клетки, каждая из которых включает некоторый определяемый тип клеток, до образования плазматической клетки. Одна из этих стадий включает так называемую "IgM-секретирующую В-клетку", которая, в конечном итоге, развивается в антитело-продуцирующую плазматическую клетку. Опухоль, происходящую из "IgM-секретирующей В-клетки", называют "макроглобулинемией Вальденстрема" (WM). WM является редким, вялотекущим и неизлечимым заболеванием. Оно отличается накоплением в костном мозге клональных IgM-секретирующих лимфоплазматических клеток.

[00188] Т-клетки развиваются из лимфоидных клеток-предшественников в зрелые Т-клетки всего за несколько стадий развития. Опухоли могут, в частности, развиваться из зрелых Т-клеток или лимфоидных клеток-предшественников, последние из которых приводят к В- или Т-клеточному острому 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 встречается у взрослых, чем у детей. Т-ALL тесно связан с Т-клеточной лимфобластной лимфомой (Т-LBL), и дифференциальный диагноз между двумя заболеваниями основан на преобладающей локализации в конкретных участках, таких как костный мозг при Т-ALL или вторичные лимфоидные органы при Т-LBL. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL) классифицировала Т-ALL по четырем подгруппам в соответствии с их иммунофенотипом (Vene MC, Leukemia 1995; 9:1783):

[00189] 1) EGIL T1 (про-) отличается цитоплазматической положительностью по CD3 (сCD3) и поверхностной экспрессией CD7;

[00190] 2) EGIL T2 (пре-) отличается положительностью по сCD3, CD7 и положительностью по CD2 или CD5;

[00191] 3) EGIL T3 (кортикальный) отличается положительностью по сCD3, CD1a и наличием или отсутствием поверхностного CD3 (сCD3), и

[00192] 4) EGIL T4 (зрелый лейкоз) отличается положительностью по сCD3 и сCD3 и отрицателен по CD1a.

[00193] В рамках изобретения термин "антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC)" означает уничтожение клетки, связанной и меченой антителами, под действием цитотоксических эффекторных клеток, таких как естественные киллеры (NK).

[00194] Для исследования того, может ли антитело индуцировать ADCC, можно использовать следующий анализ. Осуществляют анализ дегрануляции посредством сокультивирования мононуклеарных клеток периферической крови (PBMC) от здоровых доноров, включающих эффекторные клетки, с клетками-мишенями, экспрессирующими эпитоп в присутствии разных концентраций антител. 4×10^4 клеток-мишеней высевают в 96-луночный круглодонный планшет и культивируют в течение 30 минут при 37°C и 5% CO_2 в присутствии разных концентраций антитела (0, 10, 50, 100 и 200 мкг/мл) или контрольного IgG1. Затем в каждую лунку добавляют $0,4 \times 10^6$ PBMC (фиксированное соотношение эффекторных клеток (E):клеток-мишеней (T)=10:1) от того же донора вместе с 20 мкл/мл фикоэритрин (PE)-конъюгированного моноклонального антитела (mAb) против CD107a (BD), а затем клетки инкубируют при 37°C и 5% CO_2 в течение 3 ч. Через 1 ч. в каждую лунку добавляют 6 мкг/мл монензина (GolgiStop, BD). К концу периода инкубации клетки окрашивают аллофикоцианин (APC)-конъюгированным антителом против CD56 и конъюгированным с комплексом перидинин-хлорофилл-белок (PerCp) антителом против CD3 и анализируют с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific). Определяя $\text{CD3}^+/\text{CD56}^+/\text{CD107a}^+$ клетки, измеряют NK-клетки ($\text{CD3}^+/\text{CD56}^+$), индуцирующие лизис клеток-мишеней (CD107a^+). Таким образом, повышение $\text{CD3}^+/\text{CD56}^+/\text{CD107a}^+$ клеток с повышением концентраций антитела подтверждает, что антитело потенциально может индуцировать ADCC. Полученные данные позволяют создавать подходы иммунного таргетинга, например, представляющие собой неотложную и неудовлетворенную клиническую потребность в случае T-клеточных острых лимфобластных лейкозов/лимфобластных лимфом. Также можно использовать дополнительные способы исследования того, может ли антитело индуцировать ADCC, и они хорошо известны специалисту в этой области.

6.3.5. Связывающие молекулы UMG1

[00195] В третьем аспекте изобретение относится к связывающей молекуле, полученной из антитела UMG1 по первому аспекту или второму аспекту.

[00196] В рамках изобретения связывающая молекула представляет собой молекулу, полученную из моноклонального антитела мыши UMG1, продуцируемого гибридомной клеткой, депонируемой как ICLC PD n° 16001. Предпочтительно, связывающая молекула является иммуноглобулин-содержащей молекулой, т.е. она содержит по меньшей мере один иммуноглобулиновый (Ig) домен.

[00197] 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, тандемного антитела и флекситела.

[00198] Структура антитела и, в частности, функция его CDR, как правило, известны в этой области (Carter PJ. Potent antibody therapeutics by design. *Nature Rev. Immunol.* 6:343-357, 2006, включенная в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Одноцепочечный Fv (scFv) и его мультимеры, тандемные антитела, диатела и флекситела, в целом, являются стандартными форматами антител, известными в этой области, например, из WO 1988/001649 A1, WO 1993/011161 A1, WO 1999/057150 A2 и EP1293514B1, каждый из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00199] В scFv две антигенсвязывающие переменные области легкой и тяжелой цепи (VH Fv и VL Fv) антитела, в основном, искусственно соединяют линкерным пептидом, обозначая 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), каждая из которых включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме). Антигенсвязывающий участок может быть образован переменными доменами легкой и тяжелой цепи моноклонального антитела. Некоторые исследования показали, что scFv-фрагмент, фактически, может иметь полную характерную аффинность связывания антигена одного участка связывания целого антитела.

[00200] В контексте настоящего изобретения диатела являются scFv с двумя специфичностями связывания и могут являться моноспецифическими и бивалентными или биспецифическим и бивалентными.

[00201] Тандемные антитела и флекситела являются дополнительными форматами антител, например, определенными в US2007031436 и EP1293514B1, соответственно, включенных в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00202] 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.

6.3.6. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC)

[00203] Антитело или связывающую молекулу по изобретению можно дополнительно связывать с активным веществом, предпочтительно - токсином, наночастицей, цитокином или радионуклидом. Такие конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) известны в этой области (Wu AM, Senter PD. *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; каждая из которых включена в настоящее описание в качестве ссылки в

полном объеме). Также см. Yaghoubi et al., "*Potential drugs used in antibody-drug conjugate (ADC) architecture for cancer therapy*," J Cell Physiol. 2019 Jun 18. doi: 10.1002/jcp.28967. [Epub ahead of print]; Arlotta et al., "*Antibody and antibody derivatives as cancer therapeutics*," Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2019 Apr 9:e1556. doi:10.1002/wnan.1556. [Epub ahead of print]; Wolska-Washer et al., "*Safety and Tolerability of Antibody-Drug Conjugates in Cancer*," Drug Saf. 2019 Feb;42(2):295-314; Johnston et al., "*Antibody conjugated nanoparticles as a novel form of antibody drug conjugate chemotherapy*," Drug Discov Today Technol. 2018, 30:63-69; Lyon, "*Drawing lessons from the clinical development of antibody-drug conjugates*," Drug Discov Today Technol. 2018 Dec;30:105-109; и Abdollahpour-Alitappeh et al., "*Antibody-drug conjugates (ADCs) for cancer therapy: Strategies, challenges, and successes*," J Cell Physiol. 2019 May;234(5):5628-5642, описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00204] В различных вариантах осуществления связывающую молекулу конъюгируют с терапевтическим средством (т.е. лекарственным средством) для получения конъюгата связывающая молекула-лекарственное средство. Терапевтические средства включают, в качестве неограничивающих примеров, химиотерапевтические средства, средства для визуализации (например, радиоактивные изотопы), иммуномодуляторы (например, цитокины, хемокины или ингибиторы контрольных точек) и токсины (например, цитотоксические средства). В некоторых вариантах осуществления терапевтические средства соединяют со связывающей молекулой через линкерный пептид, как более подробно описано ниже в разделе 6.7.3.

[00205] Способы получения конъюгатов антитело-лекарственное средство (ADC), которые можно адаптировать для конъюгации лекарственных средств со связывающими молекулами, представленными в настоящем описании, описаны, например, в патенте США № 8624003 (однореакторный способ), патенте США № 8163888 (одностадийный способ), патенте США № 5208020 (двухстадийный способ), патенте США № 8337856, патенте США № 5773001, патенте США № 7829531, патенте США № 5208020, патенте США № 7745394, WO 2017/136623, WO 2017/015502, WO 2017/015496, WO 2017/015495, WO 2004/010957, WO 2005/077090, WO 2005/082023, WO 2006/065533, WO 2007/030642, WO 2007/103288, WO 2013/173337, WO 2015/057699, WO 2015/095755, WO 2015/123679, WO 2015/157286, WO 2017/165851, WO 2009/073445, WO 2010/068759, WO 2010/138719, WO 2012/171020, WO 2014/008375, WO 2014/093394, WO 2014/093640, WO 2014/160360, WO 2015/054659, WO 2015/195925, WO 2017/160754, Storz (*MAbs*. 2015 Nov-Dec; 7(6): 989-1009), Lambert *et al.* (*Adv Ther*, 2017 34: 1015), Diamantis *et al.* (*British Journal of Cancer*, 2016, 114, 362-367), Carrico *et al.* (*Nat Chem Biol*, 2007. 3: 321-2), We *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA*, 2009. 106: 3000-5), Rabuka *et al.* (*Curr Opin Chem Biol.*, 2011 14: 790-6), Hudak *et al.* (*Angew Chem Int Ed Engl.*, 2012: 4161-5), Rabuka *et al.* (*Nat Protoc.*, 2012 7:1052-67), Agarwal *et al.* (*Proc Natl Acad Sci USA.*, 2013, 110: 46-51), Agarwal *et al.* (*Bioconjugate Chem.*, 2013, 24: 846-851), Barfield *et al.* (*Drug Dev. u D.*, 2014, 14:34-41), Drake *et al.* (*Bioconjugate Chem.*, 2014, 25:1331-41), Liang *et al.* (*J Am Chem Soc.*, 2014, 136:10850-3), Drake *et al.* (*Curr Opin Chem Biol.*, 2015,

28:174-80), и York *et al.* (*BMC Biotechnology*, 2016, 16(1):23), каждый из которых, таким образом, включен в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

6.3.7. Химерные антигенные рецепторы (CAR)

[00206] Настоящее изобретение также относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему связывающую молекулу по третьему аспекту, связанному с внутриклеточным доменом, предпочтительно, содержащим один или более сигнальных доменов.

[00207] Предпочтительно, изобретение относится к химерному антигенному рецептору (CAR), содержащему scFv по предпочтительному варианту осуществления связывающей молекулы по третьему аспекту, связанный с внутриклеточной областью, содержащей цепь CD3 ζ , сигнальной областью Т-клеточного рецептора и двумя костимуляторными доменами CD28 и 4-1BB.

[00208] CAR по изобретению является важным инструментом для таргетинга злокачественных клеток, несущих эпитоп, распознаваемый и связываемый моноклональным антителом по первому аспекту или второму аспекту, при экспрессии в Т-клетках или НК-клетках. В рамках изобретения термин "химерный антигенный рецептор" (CAR) относится к синтетическим рецепторам, содержащим нацеливающий остаток, связанный с одним или более сигнальными доменами в единой слитой молекуле. В основном, связывающий остаток CAR содержит scFv, но также может содержать другие связывающие остатки. Также можно успешно использовать связывающие остатки на основе доменов рецептора или лиганда. Сигнальные домены для CAR можно получать из цитоплазматической области цепей CD3 ζ или Fc-рецептора гамма, но также можно получать из других цитоплазматических областей. Показано, что CAR первого поколения успешно перенаправляют Т-клеточную цитотоксичность. Для получения CAR второго и третьего поколений добавляли сигнальные домены из костимуляторных молекул, а также трансмембранные и шарнирные домены, что привело к некоторым успешным терапевтическим исследованиям на людях, где Т-клетки смогли перенаправить против злокачественных клеток, экспрессирующих CD19 (Porter DL *et al.*, *N Eng J Med*, 2011).

6.3.7.1. Варианты осуществления CAR-T

[00209] Специалистам в этой области будет понятно, что CAR-T по изобретению можно конструировать для конкретного применения по изобретению (D. Xu *et al.* *Oncotarget*. 2018 Mar 2; 9(17), включенная, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

[00210] В различных вариантах осуществления CAR является CAR 1-го поколения (Eshhar *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* (1993) 90(2)); в различных вариантах осуществления CAR является костимуляторным CAR (Krause *et al.* *J Exp Med.*(1998) 188(4)); в различных вариантах осуществления CAR является CAR 2-го поколения (Finney *et al.* *J Immunol* (1998) 161(6).; Maher *et al.* *Nat Biotechnol* (2002) 20(1); Finney *et al.* (2004) *J Immunol.* 172(1).; Imai *et al.* (2004) *Leukemia* 18(4)); в различных вариантах осуществления CAR является CAR 3-го поколения (Pulè *et al.* (2005) *Mol Ther.* 12(5); Geiger *et al.* *Blood* (2001) 98; Wilkie *et al.* (2008)

J Immunol. 180(7)); в различных вариантах осуществления CAR является CAR 4-го поколения TRUCKS (Chmielewski et al. Cancer Res (2011) 71.); в различных вариантах осуществления CAR является "защищенным" CAR (Pegram et al. (2012) Blood 119; Curran et al. (2015) Mol Ther. 2015 Apr;23(4)); в различных вариантах осуществления CAR является сконструированным костимуляторным CAR (Zhao et al. (2015) Cancer cell 28); в различных вариантах осуществления CAR является CAR с SynNotch/последовательным "И"-элементом (Roybal et al. (2016) Cell 164); в различных вариантах осуществления CAR является CAR, костимуляторным в цис- и транс-положении (Stephan et al. (2007) Nat Med 13(12)); в различных вариантах осуществления CAR является двунаправленным CAR (Wilkie et al. (2012) J Clin Immunol. 32(5)); в различных вариантах осуществления CAR является комбинаторным CAR/CAR с "И"-элементом (Kloss et al. (2013) Nat Biotechnol 31(1)); в различных вариантах осуществления CAR является TanCAR (Ahmed et al. (2013) Mol Ther Nucleic Acids. 2:e105); в различных вариантах осуществления CAR является Go-CART (Foster et al, (2014)); описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00211] В конкретных вариантах осуществления CAR является pCAR, как описано в патентной заявке США, опубликованной через 18 месяцев с даты приоритета, № US 2019/0002521, включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

6.3.7.2. Конструкции CAR (CAR-UMG1) с первичным внутриклеточным сигнальным доменом

[00212] В некоторых вариантах осуществления конструкция CAR содержит первичный внутриклеточный сигнальный домен. Первичный внутриклеточный сигнальный домен генерирует внутриклеточный сигнал, когда внеклеточный домен, например, антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывается с когнатным антигеном. Первичный внутриклеточный сигнальный домен получают из первичной стимуляторной молекулы, например, он содержит внутриклеточную последовательность первичной стимуляторной молекулы. Первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит последовательность первичной стимуляторной молекулы, достаточной для генерирования внутриклеточного сигнала, например, когда антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывается с когнатным антигеном.

[00213] Первичная стимуляторная молекула представляет собой молекулу, которая после связывания с когнатным лигандом опосредует иммунный эффекторный ответ, например, в клетке, в которой она экспрессируется. Как правило, она генерирует внутриклеточный сигнал, зависящий от связывания с когнатным лигандом, содержащим антиген. Комплекс TCR/CD3 является примером первичной стимуляторной молекулы; он генерирует внутриклеточный сигнал после связывания с когнатным лигандом, например, молекулой МНС, нагруженной пептидом. Как правило, например, в случае первичной стимуляторной молекулы TCR/CD3 генерирование внутриклеточного сигнала первичным внутриклеточным сигнальным доменом зависит от связывания первичной стимуляторной молекулы с антигеном.

[00214] Первичная стимуляция может опосредовать измененную экспрессию некоторых молекул, такую как отрицательная регуляция TGF- β , и/или реорганизацию структур цитоскелета и т.п.

[00215] Стимуляция, например, в присутствии костимуляции, может приводить к оптимизации, например, повышению, иммунной эффекторной функции CART-клетки. Стимуляция, например, в контексте CART-клетки, может опосредовать Т-клеточный ответ, например, пролиферацию, активацию, дифференцировку и т.п.

[00216] В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит сигнальный мотив, например, иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив или ITAM. Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать ITAM, содержащий цитоплазматические сигнальные последовательности из (например) TCR дзета (CD3 дзета, CD ζ), общего FcR гамма, (FCER1G), Fc гамма RIIa, FcR бета (Fc эпсилон Rib), CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эпсилон, CD5, CD22, CD79a, CD79b, CD278 (также известного как "ICOS"), FcsRI, DAP10, DAP 12 и CD66d.

[00217] Первичный внутриклеточный сигнальный домен содержит функциональный фрагмент или аналог первичной стимуляторной молекулы (например, CD3 дзета, CD3 ζ). Первичный внутриклеточный сигнальный домен может содержать целую внутриклеточную область или фрагмент внутриклеточной области, достаточный для генерирования внутриклеточного сигнала, когда антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывается с когнатным антигеном. В некоторых примерах первичный внутриклеточный сигнальный домен имеет по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 98 или 99% идентичности последовательности в отношении целой внутриклеточной области или фрагмента внутриклеточной области, достаточного для генерирования внутриклеточного сигнала, природной первичной стимуляторной молекулы, например, внутриклеточной первичной стимуляторной молекулы человека или другого млекопитающего, например, не являющихся человеком видов, например, грызуна, мартышкообразной обезьяны, человекообразной обезьяны или мыши.

[00218] В некоторых вариантах осуществления первичный внутриклеточный сигнальный домен имеет по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности или отличается на не более, чем 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от соответствующих остатков целой внутриклеточной области или фрагмента внутриклеточной области, достаточного для генерирования внутриклеточного сигнала, природной первичной стимуляторной молекулы человека, например, природной первичной стимуляторной молекулы человека, представленной в настоящем описании.

6.3.7.3. Конструкции CAR (CAR-UMG1) с костимуляторным сигнальным доменом

[00219] В некоторых вариантах осуществления конструкция CAR содержит костимуляторный сигнальный домен, генерирующий внутриклеточный сигнал, когда

внуклеточный домен, например, антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывается с когнатным лигандом. Костимуляторный сигнальный домен получают из костимуляторной молекулы. Костимуляторный сигнальный домен содержит последовательность первичной костимуляторной молекулы, достаточную для генерирования внутриклеточного сигнала, например, когда внуклеточный домен, например, антигенсвязывающий домен, с которым она слита, связывается с когнатным лигандом.

[00220] Костимуляторный домен может являться доменом, оптимизирующим характеристики, например, персистенцию или иммунную эффекторную функцию, Т-клетки, содержащей CAR, содержащий костимуляторный домен.

[00221] Костимуляторные молекулы являются молекулами поверхности клетки, иными, чем антигенные рецепторы или их когнатные лиганды, способствующие иммунному эффекторному ответу. В некоторых случаях они необходимы для эффективного или повышенного иммунного ответа. Как правило, костимуляторная молекула генерирует внутриклеточный сигнал, зависящий от связывания с когнатным лигандом, в некоторых вариантах осуществления являющимся иным, чем антиген, например, антиген, распознаваемым антигенсвязывающим доменом CART-клетки. Как правило, передача сигнала от первичной стимуляторной молекулы и костимуляторной молекулы участвует в иммунном эффекторном ответе, и в некоторых случаях обе из них необходимы для эффективного или повышенного иммунного эффекторного ответа.

[00222] Костимуляторный домен содержит функциональный фрагмент или аналог костимуляторной молекулы (например, ICOS, CD28 или 4-1BB). Он может содержать целую внутриклеточную область или фрагмент внутриклеточной области, достаточный для генерирования внутриклеточного сигнала, например, если антигенсвязывающий домен, с которым он слит, связывается с когнатным антигеном. В некоторых вариантах осуществления костимуляторный домен имеет по меньшей мере 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 98% или 99% идентичности последовательности в отношении целой внутриклеточной области или фрагмента внутриклеточной области, достаточного для генерирования внутриклеточного сигнала, природной костимуляторной молекулы, например, внутриклеточной костимуляторной молекулы человека или другого млекопитающего, например, не являющихся человеком видов, например, грызуна, мартышкообразной обезьяны, человекообразной обезьяны или мыши.

[00223] Неограничивающие примеры костимуляторных доменов включают домены, выбранные из CD27, CD27, CD28, 4-1BB (CD137), QX40, CD30, CD40, ICQS (CD278), ICAM-1, LFA-1 (CD11a/CD18), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганда, специфически связывающегося с CD8, CDS, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKP80 (KLRF1), CD160 (BY55), CD19, CD4, CD8 альфа, CD8 бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, C49f, ITGAD, CD11d, ITGAE, CD103, ITGAL, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (C244, 2B4), CD84, CD96 (Tactile),

CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Ly108), SLAM (SLAMF1, CD150, IP0-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS и PAG/Cbp.

[00224] В некоторых вариантах осуществления костимуляторный сигнальный домен имеет по меньшей мере 70, 75, 80, 85, 90, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичности или отличается на не более, чем 30, 25, 20, 15, 10, 5, 4, 3, 2 или 1 аминокислотный остаток от соответствующих остатков от целой внутриклеточной области или фрагмента внутриклеточной области, достаточного для генерирования внутриклеточного сигнала, природной костимуляторной молекулы человека, например, природной костимуляторной молекулы человека, представленной в настоящем описании.

6.3.7.4. Иммунная эффекторная клетка, содержащая химерный антигенный рецептор (CAR)

[00225] В шестом аспекте изобретение относится к CD3⁺ лимфоциту, НК-клетке, цитокин-индуцированному киллеру (CIK-клетке), гамма-дельта-лимфоциту, NKT-клетке или другой иммунной эффекторной клетке, содержащей химерный антиген ch-UMG1 по четвертому аспекту или экспрессирующий вектор по пятому аспекту.

[00226] Как правило, CD3 является комплексом из четырех сигнальных цепей, связанных с гетеродимером $\alpha:\beta$ Т-клеточного рецептора в функциональном комплексе Т-клеточного рецептора. Комплекс CD3, как правило, необходим для передачи сигнала Т-клеточного рецептора. В основном, группа CD3⁺ лимфоцитов содержит исключительно тимоциты и Т-клетки. Детекцию CD3⁺ клеток можно осуществлять, например, посредством проточной цитометрии.

6.3.8. Привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTE)

[00227] Два основных подхода перенаправления Т-клеток включают их генетическую модификацию с помощью химерных антигенных рецепторов (CAR) или использование рекомбинантных белков, обозначаемых как привлекающие Т-клетки биспецифические активаторы (BiTE).

[00228] Настоящее изобретение относится к различным вариантам осуществления конструкций BiTE-UMG1 (Huehls AM *et al.*, "*Bispecific T-cell engagers for cancer immunotherapy*" Immunol Cell Biol. 2015 Mar;93(3):290-6; Zhukovsky EA *et al.*, "*Bispecific antibodies and CARs: generalized immunotherapeutics harnessing T cell redirection.*" Curr Opin Immunol. 2016 Jun;40:24-35, описания которых включены в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме).

[00229] Как правило, BiTE конструируют из двух одноцепочечных варибельных фрагментов (scFv), соединенных тандемно гибким линкером. Один scFv связывается с Т-клеточно-специфической молекулой, как правило, CD3, в то время как второй scFv связывается с опухлеассоциированным антигеном. Эта структура и специфичность позволяют BiTE физически связывать Т-клетку с опухолевой клеткой, в конечном итоге, стимулируя активацию Т-клеток, уничтожение опухоли и продукцию цитокинов.

[00230] В некоторых вариантах осуществления конструкции ViTE-UMG1 нацелены на гемобластоз. В некоторых вариантах осуществления конструкции ViTE-UMG1 нацелены на злокачественные новообразования типа солидной опухоли. В некоторых вариантах осуществления конструкции ViTE-UMG1 нацелены на опухолеассоциированные макрофаги в солидной опухоли.

6.4. Фармацевтические композиции CD43-связывающих белков

[00231] В седьмом аспекте изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей моноклональное антитело UMG1 по аспектам 1 или 2, или UMG1-связывающую молекулу по третьему аспекту, или CD3⁺ лимфоцит, NK-клетку, цитокин-индуцированный киллер (CIK), гамма-дельта-лимфоцит, NKT-клетку или другую иммунную эффекторную клетку по шестому аспекту.

[00232] В рамках изобретения термин "фармацевтическая композиция" можно использовать взаимозаменяемо с термином "лекарственное средство".

[00233] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представляет собой антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых вариантах осуществления антитело является моноклональным. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело является химерным антителом. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело является гуманизированным антителом. В некоторых вариантах осуществления моноклональное антитело является антителом человека. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция является конъюгатом антитело-лекарственное средство.

[00234] В различных вариантах осуществления фармацевтические композиции более подробно описаны в патенте США № 8961964, патенте США № 8945865, патенте США № 8420081, патенте США № 6685940, патенте США № 6171586, патенте США № 8821865, патенте США № 9216219, патентной заявке США № 10/813483, WO 2014/066468, WO 2011/104381 и WO 2016/180941, каждый из которых включен в настоящее описание в полном объеме.

6.5. Способы производства

[00235] UMG1-связывающие молекулы (антитела, белок, антигены и т.д.) по изобретению можно производить стандартными известными в этой области способами.

[00236] Например, UMG1-связывающие молекулы можно получать посредством экспрессии с использованием стандартных подходов бесклеточной трансляции, транзиторной трансфекции и стабильной трансфекции, в настоящее время используемых для производства антител. В конкретных вариантах осуществления клетки Expi293 (ThermoFisher) можно использовать для продукции связывающих молекул с использованием способов и реагентов от ThermoFisher, таких как ExpiFectamine, или других реагентов, известных специалистам в этой области, таких как полиэтиленмин, как подробно описано в Fang *et al.* (*Biological Procedures Online*, 2017, 19:11), включенном в настоящее описание в полном объеме. Экспрессируемые белки легко можно очищать стандартными, известными в этой области способами, такими как, например,

использование CN1-аффинной смолы, такой как смолы CaptureSelect CN1, и соответствующего способа от ThermoFisher. Дальнейшую очистку можно осуществлять с использованием ионообменной хроматографии, как общепринято используют в этой области.

6.6. Введение

[00237] Фармацевтическую композицию UMG1 по изобретению можно вводить любым подходящим путем введения. Подходящие пути введения включают, в качестве неограничивающих примеров, парентеральное введение, включая подкожный, интрадермальный, внутривенный, внутримышечный, интраперитонеальный, назальный и легочный пути.

6.7. Комбинированные терапевтические средства

[00238] Настоящее изобретение также относится к комбинированным терапевтическим средствам. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическую композицию по изобретению вводят в комбинации с другим терапевтическим лечением. Терапевтическое лечение может представлять собой хирургическое вмешательство, лучевую терапию, холистическое лечение, клеточную терапию, регенерацию тканей или другую фармацевтическую композицию, известную для лечения пролиферативного заболевания или злокачественного новообразования.

[00239] В некоторых вариантах осуществления терапевтически эффективные дозы варьируются, если фармацевтические композиции по изобретению используют в лечебных комбинациях. Способы экспериментального определения терапевтически эффективных доз лекарственных средств и других средств для использования в комбинированных схемах лечения включают использование метрономных доз, т.е. введение более частых, более низких доз для минимизации токсических побочных эффектов.

[00240] Комбинированные схемы лечения включают схемы лечения, в которых введение соединения, представленного в настоящем описании, начинают до, во время или после лечения вторым средством, описанным выше, и продолжают до любого момента во время лечения вторым средством или после прекращения лечения вторым средством. Такие схемы лечения также включают лечение, в котором соединение, представленное в настоящем описании, и второе средство, используемые в комбинации, вводят одновременно или в разные моменты времени и/или с уменьшающимися или увеличивающимися интервалами во время периода лечения.

[00241] Комбинированное лечение дополнительно включает периодическое лечение, начинаемое и прекращаемое в различные моменты времени и сопутствующее клиническому ведению пациента. Например, соединение, представленное в настоящем описании, при комбинированном лечении вводят еженедельно в начале лечения, уменьшая введение до введения раз в две недели и при необходимости уменьшая дополнительно.

6.8. Составы

[00242] Настоящее изобретение также относится к различным фармацевтическим составам UMG1, содержащим эффективное количество антигена, антитела или связывающей молекулы или белка UMG1.

[00243] В некоторых вариантах осуществления фармацевтические композиции составляют любым общепринятым способом с использованием одного или более физиологически приемлемых носителей, включающих эксципиенты и вспомогательные средства, облегчающие переработку активных соединений в препараты, которые можно использовать фармацевтически. Правильный состав зависит от выбранного пути введения. Любые фармацевтически приемлемые способы, носители и эксципиенты, необязательно, используют соответствующим образом. Фармацевтические композиции, содержащие антитело UMG1 или UMG1-связывающую молекулу, производят общепринятым способом, таким как, исключительно в качестве примера, общепринятое смешивание, растворение, грануляцию, дражирование, растирание в порошок, эмульгацию, инкапсуляцию, заключение или прессование.

[00244] Фармацевтические композиции UMG1, необязательно, могут включать другие медицинские или фармацевтические средства, носители, вспомогательные средства, такие как консерванты, стабилизаторы, увлажнители или эмульгаторы, стимуляторы растворимости, соли для регуляции осмотического давления, буферы и/или другие терапевтически значимые вещества. Способы получения композиций, содержащих соединения, представленные в настоящем описании, включают составление соединений с одним или более инертными, фармацевтически приемлемыми эксципиентами или носителями для получения твердого, полутвердого или жидкого состава.

[00245] Твердый состав композиции включает, в качестве неограничивающих примеров, порошки, таблетки, диспергируемые гранулы, капсулы, крахмальные капсулы и суппозитории.

[00246] Жидкий состав композиции включает растворы, в которых соединение растворено, эмульсии, содержащие соединение, или раствор, содержащий липосомы, мицеллы или наночастицы, содержащие соединение, как представлено в настоящем описании. Полутвердые композиции включают, в качестве неограничивающих примеров, гели, суспензии и кремы. Формы фармацевтических композиций, представленных в настоящем описании, включают жидкие растворы или суспензии, твердые формы, подходящие для растворения или суспендирования в жидкости перед использованием, или эмульсии. Эти композиции также, необязательно, содержат незначительные количества нетоксичных, вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы, pH-буферные средства и т.д.

[00247] Содержание антитела, связывающей молекулы или CD3⁺ лимфоцита в фармацевтической композиции не ограничено, пока его можно использовать для лечения или профилактики, но, предпочтительно, составляет 0,0000001-10% по массе общей композиции. Кроме того, антитело, связывающую молекулу 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 находиться в форме лиофилизированной композиции или водного раствора. Как правило, используют соответствующее количество фармацевтически приемлемой соли в носителе, чтобы сделать композицию изотонической. Неограничивающие примеры носителей включают физиологический раствор, раствор Рингера и раствор декстрозы. Предпочтительно, приемлемые эксципиенты, носители или стабилизаторы являются нетоксичными 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 октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония, хлорид бензетония; фенол, бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, например, метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогесанол; 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.

[00248] Предпочтительно, антитело, связывающая молекула, CD3⁺ лимфоцит и/или активное соединение включают в эффективном количестве. Термин "эффективное количество" относится к количеству, достаточному для индуцирования детектируемого терапевтического ответа у индивидуума, которому фармацевтическую композицию будут вводить.

6.9. Полинуклеотиды, кодирующие CD43-связывающие белки

[00249] В восьмом аспекте изобретение относится к нуклеиновой кислоте или полинуклеотиду, кодирующему антитело UMG1 по первому или второму аспектам или связывающую молекулу UMG1 по третьему аспекту.

[00250] Настоящее изобретение также относится к полинуклеотидам, кодирующим антитело, оптимизированное, 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 внесения изменений в кодоны и/или устранения ингибиторных областей в мРНК можно осуществлять посредством адаптации способов оптимизации, описанных, например, в патентах США №№ 5965726;

6174666; 6291664; 6414132 и 6794498, таким образом; каждая из которых включена в качестве ссылки в полном объеме. 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. Для изменений используют вырожденность генетического кода, например, с использованием альтернативного кодона для идентичной аминокислоты. В некоторых вариантах осуществления желательным может являться изменение одного или более кодонов для кодирования консервативной мутации, например, схожей аминокислоты с химической структурой и свойствами и/или функцией, схожей с исходной аминокислотой. Такие способы могут повышать экспрессию антитела или его фрагмента по меньшей мере в 1 раз, 2 раза, 3 раза, 4 раза, 5 раз, 10 раз, 20 раз, 30 раз, 40 раз, 50 раз, 60 раз, 70 раз, 80 раз, 90 раз или 100 раз или более относительно экспрессии антитела, кодируемого полинуклеотидами, которые не оптимизировали.

[00251] В некоторых вариантах осуществления оптимизированная полинуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH), может гибридизоваться с антисмысловым (например, комплементарным) полинуклеотидом неоптимизированной полинуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент (например, домен VL и/или домен VH). В конкретных вариантах осуществления оптимизированная нуклеотидная последовательность, кодирующая антитело, представленное в настоящем описании, или фрагмент, гибридизуется в условиях высокой строгости 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 высокой строгости, промежуточной или низкой строгости с антисмысловым полинуклеотидом неоптимизированной нуклеотидной последовательности, кодирующей антитело, представленное в настоящем описании, или его фрагмент. Описана информация, касающаяся условий гибридизации, см., например, публикацию патентной заявки США № US 2005/0048549 (например, абзацы 72-73).

[00252] Можно получать полинуклеотиды по изобретению и определять нуклеотидную последовательность полинуклеотидов 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 нуклеотидов, как известно, кодирующие конкретные аминокислоты, собирают таким образом, 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; включенной в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме), 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.

[00253] 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, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами известной последовательности, можно осуществлять с использованием геномной ДНК, получаемой 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 дальнейшего клонирования, например, для получения химерных и гуманизированных антител.

[00254] 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 антител или библиотеки кДНК, полученной из, или нуклеиновой кислоты, предпочтительно, поли А⁺ РНК, выделенной 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, гибридизуемых с 3'- и 5'-концами последовательности или посредством клонирования с использованием олигонуклеотидного зонда, специфического для конкретной последовательности гена, для идентификации, например, клона кДНК из библиотеки кДНК, кодирующей антитело. Затем амплифицированные нуклеиновые кислоты, полученные посредством ПЦР, можно клонировать в реплицирующиеся клонирующие векторы любым способом, хорошо известным в этой области.

[00255] ДНК, кодирующую антитела по изобретению, представленные в настоящем описании, легко можно выделять и секвенировать общепринятыми способами (например, с использованием олигонуклеотидных зондов, которые могут специфически связываться с генами, кодирующими тяжелые и легкие цепи антител). Гибридомные клетки могут служить в качестве источника такой ДНК. После выделения ДНК можно помещать в экспрессирующие векторы, с помощью которых затем трансфицируют клетки-хозяева, такие как клетки *E. coli*, клетки обезьян COS, клетки яичника китайского хомяка (СНО)

(например, клетки CHO из CHO GS System™ (Lonza)), или миеломные клетки, которые в ином случае не продуцируют иммуноглобулиновый белок, для достижения синтеза антител в рекомбинантных клетках-хозяевах.

[00256] Для получения целых антител праймеры для ПЦР, включающие нуклеотидные последовательности VH или VL, участок рестрикции и фланкирующую последовательность для защиты участка рестрикции, можно использовать для амплификации последовательностей VH или VL в клонах scFv или других клонах. Используя способы клонирования, известные специалистам в этой области, ПЦР-амплифицированные домены VH можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область тяжелой цепи, например, константную область гамма 4 человека, и ПЦР-амплифицированные домены VL можно клонировать в векторы, экспрессирующие константную область легкой цепи, например, константные области каппа или лямбда человека. В некоторых вариантах осуществления векторы для экспрессии доменов VH или VL содержат промотор, секреторный сигнал, участок клонирования для вариабельной области, константные домены и селективный маркер, такой как неомицин. Домены VH и VL также можно клонировать в один вектор, экспрессирующий необходимые константные области. Затем конверсионные векторы тяжелой цепи и конверсионные векторы легкой цепи котрансфицируют в линии клеток для получения стабильных или транзиторных линий клеток, экспрессирующих полноразмерные антитела, например, IgG, способами, известными специалистам в этой области.

[00257] ДНК также можно модифицировать, например, посредством замены кодирующей последовательностью константных доменов тяжелой и легкой цепи человека вместо последовательностей мыши или посредством ковалентного соединения с кодирующей последовательности иммуноглобулина всей или частью кодирующей последовательности неиммуноглобулинового полипептида.

[00258] Для оптимизации специфичности, аффинности и т.д. моноклонального антитела можно использовать Сайт-специфический мутагенез, или мутагенез высокой плотности вариабельной области, или другие способы мутагенеза. В частности, стратегии созревания аффинности и стратегии перестановки цепей (Marks et al., 1992, Bio/Technology 10:779-783; включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме) известны в этой области, и их можно использовать для получения высокоаффинных антител человека.

6.10. Гибридная клетка, продуцирующая моноклональное антитело UMG1

[00259] В девятом аспекте изобретение относится к гибридной клетке, продуцирующей моноклональное антитело в соответствии с антителом по первому или второму аспектам.

6.11. Композиция гибридомы

[00260] Изобретение также относится к композиции гибридомы, депонируемой как ICLC PD n° 16001.

6.12. Способ получения моноклонального антитела UMG1

[00261] В одиннадцатом аспекте изобретение относится к способу получения моноклонального антитела по первому или второму аспектам, включающему выделение указанного антитела из гибридомной клетки, депонируемой как ICLC PD n° 16001.

6.13. Выделение клеток с использованием антитела UMG1 и/или связывающих молекул

[00262] В двенадцатом аспекте изобретение относится к способу идентификации или выделения клеток Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клеток Т-клеточной лимфомы, клеток макроглобулинемии Вальденстрема или опухолиассоциированных макрофагов, включающему приведение образца клеток, содержащего указанные клетки, в контакт с моноклональным антителом по первому или второму аспектам или связывающей молекулой по третьему аспекту.

[00263] В основном, макрофаги являются наиболее распространенными незлокачественными клетками в микроокружении опухоли. Считают, что опухолиассоциированные макрофаги (ТАМ) приобретают проопухолевый воспалительный и иммуносупрессорный фенотип и способствуют резистентности к химиотерапии, ангиогенезу, клеточной подвижности и интра-/экстравазации. Таким образом, таргетинг ТАМ может представлять собой новый терапевтический и все еще неизученный вариант лечения для улучшения эффективности существующего противоопухолевого лечения.

[00264] Способы идентификации или выделения конкретных клеток, таких как клетки Т-клеточного острого лимфобластного лейкоза, клетки Т-клеточной лимфомы, клетки макроглобулинемии Вальденстрема или опухолиассоциированные макрофаги, на основе антител или связывающих молекул, в основном, хорошо известны специалисту в этой области, например, способы на основе флуоресцентной сортировки клетки посредством проточной цитометрии, магнитного выделения клеток или сортировки отдельных клеток, например, с помощью клеточных сортеров.

6.14. Способ получения иммунных эффекторных клеток

[00265] В тринадцатом аспекте изобретение относится к способу получения CD3⁺ лимфоцитов, NK-клеток, цитокин-индуцированных киллеров (CIK), гамма-дельта-лимфоцитов, NKT-клеток или других иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор по четвертому аспекту, включающему встраивание экспрессирующего вектора по пятому аспекту в указанные CD3⁺ лимфоциты, NK-клетки, цитокин-индуцированные киллеры (CIK), гамма-дельта-лимфоциты, NKT-клетки или другие иммунные эффекторные клетки.

6.15. Композиции экспрессирующих векторов

[00266] В пятом аспекте изобретение относится к экспрессирующему вектору, содержащему последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую химерный антигенный рецептор по четвертому аспекту, антитело по первому или второму аспекту или связывающей молекулы по третьему аспекту.

[00267] Как правило, экспрессирующие векторы являются плазидами, используемыми для встраивания желаемой последовательности нуклеиновой кислоты,

такой как ген, в клетку-мишень, приводящего 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 направления эффективной транскрипции последовательности нуклеиновой кислоты на экспрессирующем векторе. Экспрессирующий вектор может дополнительно содержать дополнительные необходимые или полезные области, такие как селективный маркер для селекции в эукариотических или прокариотических клетках, метку для очистки полученного белка, участок множественного клонирования или участок начала репликации.

[00268] Как правило, экспрессирующий вектор может являться вирусным или невирусным вектором. В основном, можно использовать различные типы вирусных векторов, такие 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.

6.16. Способы лечения

[00269] В другом аспекте настоящее изобретение относится к способам лечения, включающим введение связывающей молекулы или антитела, представленного в настоящем описании, пациенту в количестве, эффективном для лечения пациента.

[00270] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение связывающей молекулы или антитела, представленного в настоящем описании, пациенту в количестве, эффективном для лечения пациента с использованием CAR или CAR-T.

[00271] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение связывающей молекулы или антитела, представленного в настоящем описании, пациенту в количестве, эффективном для лечения пациента с использованием BiTE.

[00272] В некоторых вариантах осуществления способ включает введение связывающей молекулы или антитела, представленного в настоящем описании, пациенту в количестве, эффективном для лечения пациента с использованием конъюгата антитело-лекарственное средство.

6.16.1. Показания

[00273] В некоторых вариантах осуществления антитело или связывающую молекулу по изобретению можно использовать для лечения пролиферативного заболевания или злокачественного новообразования. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является солидной опухолью. В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование является гемобластозом, включая в качестве неограничивающих примеров, Т-клеточные злокачественные новообразования, Т-клеточный лейкоз, Т-клеточную лимфому, Т-клеточный острый лимфобластный лейкоз, множественную миелому, В-клеточные злокачественные новообразования, миелоидные злокачественные новообразования, острый миелолейкоз и хронический миелолейкоз.

[00274] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование или пролиферативное заболевание может являться злокачественным новообразованием из клеток мочевого пузыря, крови, иммунных клеток крови (например, Т-клеток или В-клеток, моноцитов и т.п.), клеток кости, костного мозга, головного мозга, молочной железы, толстого кишечника, толстой и прямой кишки, пищевода, желудочно-кишечного тракта, десен, головы, почки, печени, легких, носоглотки, шеи, яичника, предстательной железы, поджелудочной железы, кожи, желудка, яичка, языка или матки.

[00275] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование или опухоль, подвергнутое лечению с использованием антитела или связывающей молекулы по изобретению может являться неоплазией, злокачественным новообразованием; незлокачественным новообразованием; карциномой; недифференцированной карциномой; гигантоклеточной и веретенчатой карциномой; мелкоклеточной карциномой; папиллярной карциномой; плоскоклеточной карциномой; лимфоэпителиальной карциномой; базально-клеточной карциномой; пилломатриксной карциномой; переходноклеточной карциномой; папиллярной переходноклеточной карциномой; аденокарциномой; злокачественной гастриномой; холангиокарциномой; печеночноклеточной карциномой; комбинированной печеночноклеточной карциномой и холангиокарциномой; трабекулярной аденокарциномой; железисто-кистозной карциномой; аденокарциномой в аденоматозном полипе; аденокарциномой, семейным коли-полипозом; солидной карциномой; злокачественной карциноидной опухолью; бронхоальвеолярной аденокарциномой; папиллярной аденокарциномой; хромофобной карциномой; ацидофильной карциномой; оксифильной аденокарциномой; базофильной карциномой; светлоклеточной аденокарциномой; зернистоклеточной карциномой; фолликулярной аденокарциномой; папиллярной и фолликулярной аденокарциномой; неинкапсулирующей склерозирующей карциномой; карциномой коры надпочечников; эндометриоидной карциномой; карциномой из придатков кожи; апокринной аденокарциномой; сальной аденокарциномой; аденокарциномой церуминозной железы; мукоэпидермоидной карциномой; цистаденокарциномой; папиллярной цистаденокарциномой; папиллярной серозной цистаденокарциномой; муцинозной цистаденокарциномой; муцинозной аденокарцинома; перстневидноклеточной карциномой; инфильтративно-протоковой карциномой; медуллярной карциномой; дольковой карциномой; воспалительной карциномой; болезнь Педжета, молочной железы; ацинарно-клеточной карциномой; железисто-плоскоклеточной карциномой; аденокарциномой с плоскоклеточной метаплазией; тимомой, злокачественной; стромальной опухолью яичника, злокачественной; текомой, злокачественной; гранулезоклеточной опухолью, злокачественной; андробластомой, злокачественной; карциномой клеток Сертоли; опухолью клеток Лейдига, злокачественной; опухолью липидных клеток, злокачественной; параганглиомой, злокачественной; экстрамамиллярной параганглиомой, злокачественной; феохромоцитомой; гломангиосаркомой; злокачественной меланомой; амеланотической меланомой; поверхностной распространяющейся меланомой; злокачественной меланомой в

гигантском пигментном невусе; эпителиоидно-клеточной меланомой; голубым невусом, злокачественным; саркомой; фибросаркомой; фиброзной гистиоцитомой, злокачественной; миксосаркомой; липосаркомой; лейомиосаркомой; рабдомиосаркомой; эмбриональной рабдомиосаркомой; альвеолярной рабдомиосаркомой; стромальной саркомой; смешанной опухолью, злокачественной; смешанной опухолью Мюллера; нефробластомой; гепатобластомой; карциносаркомой; мезенхимомой, злокачественной; опухолью Бреннера, злокачественной; листовидной опухолью, злокачественной; синовиальной саркомой; мезотелиомой, злокачественной; дисгерминомой; эмбриональной карциномой; тератомой, злокачественной; струмой яичника, злокачественной; хориокарциномой; мезонефромой, злокачественной; гемангиосаркомой; гемангиоэндотелиомой, злокачественной; саркомой Капоши; гемангиоперицитомой, злокачественной; лимфангиосаркомой; остеосаркомой; периостальной остеосаркомой; хондросаркомой; хондробластомой, злокачественной; мезенхимальной хондросаркомой; гигантоклеточной опухолью костной ткани; саркомой Юинга; одонтогенной опухолью, злокачественной; амелобластической одонтосаркомой; амелобластомой, злокачественной; амелобластической фибросаркомой; пинеаломой, злокачественной; хордомой; глиомой, злокачественной; эпендимомой; астроцитомой; протоплазматической астроцитомой; фибриллярной астроцитомой; астробластомой; глиобластомой; олигодендроглиомой; олигодендробластомой; примитивной нейроэктодермальной опухолью; саркомой мозжечка; ганглионейробластомой; нейробластомой; ретинобластомой; ольфакторной нейрогенной опухолью; менингиомой, злокачественной; нейрофибросаркомой; неврилеммой, злокачественной; зернистоклеточной опухолью, злокачественной; злокачественной лимфомой; болезнью Ходжкина; парагранулемой Ходжкина; злокачественной лимфомой, мелкоклеточной лимфоцитарной; злокачественной лимфомой, крупноклеточной, диффузной; злокачественной лимфомой, фолликулярной; фунгоидным мукозом; другими определенными неходжкинскими лимфомами; злокачественным гистиоцитозом; множественной миеломой; тучноклеточной саркомой; иммунопролиферативной болезнью тонкого кишечника; лейкозом; лимфоидным лейкозом; плазмоклеточным лейкозом; эритролейкозом; лимфосаркомой; миелолейкозой; базофильным лейкозом; эозинофильным лейкозом; моноцитарным лейкозом; тучноклеточным лейкозом; мегакариобластным лейкозом; миелоидной саркомой; волосатоклеточным лейкозом и/или макроглобулинемией Вальденстрема.

[00276] В тринадцатом аспекте изобретение относится к способу получения CD3⁺ лимфоцитов, NK-клеток, цитокин-индуцированных киллеров (CIK), гамма-дельта-лимфоцитов, NKT-клеток или других иммунных эффекторных клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор по четвертому аспекту, включающему встраивание экспрессирующего вектора по пятому аспекту в указанные CD3⁺ лимфоциты, NK-клетки, цитокин-индуцированные киллеры (CIK), гамма-дельта-лимфоциты, NKT-клетки или другие иммунные эффекторные клетки.

[00277] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование, подлежащее лечению с помощью антитела, представленного в настоящем описании, является неходжкинской лимфомой, происходящей из периферической В-клетки или периферической Т-клетки, включая, в качестве неограничивающих примеров, диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, MALT-лимфому, лимфому Беркитта, анапластическую крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому и лимфому из клеток мантийной зоны.

[00278] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование, подлежащее лечению с помощью антитела, представленного в настоящем описании, является множественной миеломой.

[00279] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование, подлежащее лечению с помощью антитела, представленного в настоящем описании, является меланомой.

[00280] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование, подлежащее лечению с помощью антитела, представленного в настоящем описании, является раком яичка, включая в качестве неограничивающих примеров, семиному, эмбриональную карциному, опухоль желточного мешка и тератому.

[00281] В некоторых вариантах осуществления злокачественное новообразование, подлежащее лечению с помощью антитела, представленного в настоящем описании, является злокачественной опухолью детского возраста, такой как нефробластома, нейробластома, карцинома эндодермального синуса, ретинобластома, гепатобластома, медуллобластома, папиллома хориоидного сплетения, глиобластома, эпендимомы, примитивная нейроэктодермальная опухоль, альвеолярная рабдомиосаркома, незрелая тератома или лейомиосаркома.

6.17. Примеры

[00282] Следующие примеры приведены с целью иллюстрирования настоящего изобретения, но не следует истолковывать их как ограничение изобретения. Примеры включают технические признаки, и следует понимать, что изобретение также относится к любым комбинациям технических признаков, представленных в примерах.

6.17.1. Пример 1: Специфичность связывания UMG1 - антитело UMG1 связывается с лимфоцитами, но не с клетками миелоидного происхождения в РВМС

[00283] Тестировали связывание UMG1 с мононуклеарными клетками периферической крови (РВМС) человека от здоровых доноров.

[00284] **Способы:** Мононуклеарные клетки периферической крови (РВМС) от разных здоровых доноров получали посредством разделения в градиенте фиколла. Затем клетки высевали в пробирки 5 мл и окрашивали с помощью 1 мкг/мл антитела UMG1 или 1 мкг/мл "скремблированного" антитела IgG1 мыши отрицательного контроля в 100 мкл связывающего раствора (фосфатно-солевого буфера (PBS) + 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS)) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали 2 раза связывающим раствором и окрашивали с помощью флуоресцеинизотиоцианат (FITC)-

конъюгированного вторичного антитела при 4°C в темноте в течение 30 минут. Затем клетки промывали 2 раза связывающим раствором. Клетки 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 качестве отрицательного контроля.

[00285] **Результаты:** Антитело UMG1 могло распознавать субпопуляцию лимфоцитов, имеющую переменную распространенность (диапазон: 0-15%) у разных людей-доноров. Антитело UMG1 не демонстрировало какую-либо реактивность в отношении любой другой популяции клеток среди PBMC, включая клетки миелоидного происхождения, что свидетельствует о том, что клетки миелоидного происхождения в PBMC из здоровых индивидуумов являются отрицательными по экспрессии эпитопа UMG1 (см. фиг. 1A и фиг. 1B).

[00286] В отличие от этого, при анализе тех же PBMC на экспрессию CD43 с использованием коммерческого антитела против CD43 (S7 от Becton Dickinson) обнаруживали, что все лимфоциты и миелоидные клетки являлись положительными (см. фиг. 1B).

[00287] Таким образом, эпитоп на CD43, распознаваемый антителом UMG1, демонстрирует специфический, рестрицированный профиль экспрессии в клетках PBMC, отличающийся от профиля экспрессии эпитопа, распознаваемого коммерческим антителом против CD43 (S7).

6.17.2. Пример 2: Специфичность связывания UMG1 - субпопуляции Т-лимфоцитов PBMC, связываемые антителом UMG1

[00288] В этом примере дополнительно охарактеризовывают субпопуляцию лимфоцитов, определяемую с помощью антитела UMG1 с использованием иммуномагнитной сортировки соответствующих лимфоцитов.

[00289] **Способы:** В кратком изложении, 15 мкг антитела UMG1 смешивали с компонентами, предоставленными производителем (набор EasySep™ "Do-it-yourself" Selection Kit, STEMCELL Technologies) для получения раствора, готового для иммуномагнитного разделения. Этот раствор добавляли к PBMC от 3 разных доноров, имеющих по меньшей мере 10% лимфоцитов, определяемых с помощью антитела, после блокирования FcR, и клетки инкубировали при комнатной температуре (r.t.) в течение 15 минут. Затем в раствор добавляли магнитные наночастицы EasySep® и инкубировали клетки еще в течение 10 минут при r.t. Затем раствор помещали в магнит и удаляли несвязанные клетки.

[00290] **Результаты:** Почти все клетки, определенные с помощью антитела UMG1, представляли собой CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD8⁻CD127⁺CCR7⁺ Т-лимфоциты (см. фиг. 2A-2D и таблицу 1).

Таблица 1: Маркер клеток, положительных по антигену для UMG1

Таблица 1: Маркер клеток, положительных по антигену для UMG1	
Маркер	+/-

CD45	+
CD3	+
CD4	+
CD8	-
CD127	+
CCR7	+
CD45ra	+
CD45ro	+/- (40% положительных; см. фиг. 2)
CD56	-

6.17.3. Пример 3: Специфичность связывания UMG1 - только линии злокачественных клеток T-ALL и макроглобулинемии Вальденстрема экспрессируют эпитоп UMG1

[00291] В этом эксперименте различные линии злокачественных гемопоэтических и негемопоэтических клеток оценивали на экспрессию эпитопа UMG1.

[00292] **Способы:** В кратком изложении клетки высевали в пробирки 5 мл и окрашивали с помощью 1 мкг/мл mAb UMG1 или 1 мкг/мл скремблированного антитела IgG1 мыши в 100 мкл связывающего раствора (фосфатно-солевого буфера (PBS) + 0,5% эмбриональной телячьей сыворотки (FBS)) и инкубировали при 4°C в течение 30 минут. Затем клетки промывали 2 раза связывающим раствором и окрашивали с помощью флуоресцеинизотиоцианат (FITC)-конъюгированного вторичного антитела при 4°C в темноте в течение 30 минут. Затем клетки промывали 2 раза связывающим раствором 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 с помощью FITC-конъюгированного вторичного антитела.

[00293] **Результаты:** Наблюдали, что все из линий клеток T-ALL, принадлежащие к классу EGIL T3, и клеток макроглобулинемии Вальденстрема (фиг. 3А-3В) являлись положительными по экспрессии эпитопа UMG1, в то время как другие анализируемые линии клеток являлись отрицательными по эпитопу UMG1 (см. таблицу 2). Антитело UMG1 распознает линии клеток T-ALL и клеток макроглобулинемии Вальденстрема, но не другие гемопоэтические злокачественные новообразования и негемопоэтические опухоли.

Таблица 2		
Экспрессия эпитопа UMG1 в различных линиях злокачественных клеток		
Линии клеток	Тип злокачественного новообразования	UMG1 +/-
H929	Множественная миелома (ММ)	+
АМО	ММ	-
U266	ММ	-

KMS11	MM	-
KMS26	MM	+
8226	MM	-
BCWM.1	Макроглобулинемия Вальденстрема (WM)	+
MWCL.1	WM	+
H9	T-клеточная лимфома	+
HPB-ALL	T-ALL	+
MOLT-4	T-ALL	+
JURKAT	T-ALL	-
CEM	T-ALL	+
HSB2	T-ALL	-
THP-1	Моноцитарный лейкоз	-
MOJ	Глиобластома	-
SKMEL	Меланома	-
HCC	Молочная железа	-
MCF-7	Молочная железа	-
5637	Мочевой пузырь	-
CAPAN	Поджелудочная железа	-
BXPC 3	Поджелудочная железа	-
TCAM2	Рак яичка	+

6.17.4. Пример 4: Специфичность связывания UMG1 - UMG1 связывается с линиями клеток T-ALL человека с профилем связывания, отличающимся от других коммерчески доступных антител против CD43

[00294] В этом примере показаны уникальные связывающие свойства антитела UMG1 по сравнению с коммерчески доступными антителами против CD43 в двух разных линиях клеток T-ALL человека, ALL-SIL и KE-37.

[00295] **Способы:** Коммерчески доступные антитела против CD43: клоны, CD43 1G10 (Becton Dickinson), CD43 MEM-59 (Invitrogen) и CD43 L-10 (Invitrogen), сравнивали с антителом UMG1.

[00296] Собирали клетки из различных линий клеток человека (100000 клетки/пробирку). Клетки промывали посредством добавления 2 мл холодного буфера для окрашивания и центрифугирования клеток при 1200 об./мин. в течение 5 минут при комнатной температуре и выбрасывали супернатант. Первичное антитело UMG1 добавляли в концентрации 1 мкг/мл в конечный объем 100 мкл клеток для окрашивания. Клетки осторожно перемешивали с помощью центрифуги типа вортекс. Затем клетки инкубировали в течение 15 минут при 2-8°C, защищали от света. Клетки промывали дважды

посредством добавления 2 мл буфера для окрашивания, центрифугировали клетки при 1200 об./мин. в течение 5 минут при комнатной температуре и выбрасывали супернатант. Вторичное, меченое флуорохромом антитело разводили по инструкциям производителя в конечном объеме 100 мкл клеток и инкубировали в течение по меньшей мере 15 минут при 2-8 °С, защищая от света. Клетки промывали дважды, как указано выше, а затем ресуспендировали в 500 мкл 1-кратного PBS и анализировали посредством проточной цитометрии.

[00297] **Результаты:** При анализе FACS авторы настоящего изобретения наблюдали разную плотность и интенсивность экспрессии в линиях клеток ALL-SIL и KE-37 в случае антитела UMG1 и CD43 1G10 (Becton Dickinson), CD43 MEM-59 (Invitrogen) и CD43 L-10 (Invitrogen). См. фиг. 12А и 12В. Эти наблюдения позволяют предполагать, что антитело UMG1 имеет иной участок связывания на CD43, чем три других коммерческих антитела против CD43.

6.17.5. Пример 5: Специфичность связывания UMG1 - UMG1 является реакционноспособным в отношении иммунного инфильтрата опухоли

[00298] В этом примере показаны уникальные связывающие свойства и экспрессия m-UMG1 в тканях рака толстого кишечника, рака легких и рака молочной железы человека по сравнению с другими охарактеризованными антителами против CD43.

[00299] **Способы:** Из погруженных в парафин образцов ткани трех разных злокачественных новообразований человека получали срезы, депарафинировали, а затем анализировали посредством иммуногистохимии на экспрессию эпитопа UMG1 следующим способом.

[00300] Образцы помещали в нагревательное устройство для депарафинизации на 30 минут при 65° С. Затем срезы вымачивали в (1) ксилоле в течение 10 минут, (2) ксилоле в течение 5 минут, а затем регидратировали с помощью батареи спиртов: 90% этанол в течение 2 минут; 70% этанол в течение 2 минут. Предметные стекла промывали проточной водопроводной водой, а затем осуществляли конечную промывку деионизированной водой.

[00301] Демаскирование антигена осуществляли с использованием растворов для демаскирования эпитопов Novocastra, pH 9, (Leica Biosystems) в термостатической бане при 98°С в течение 30 минут. Эндогенную пероксидазу нейтрализуют с использованием реагента Peroxidase Block в течение 10 минут. Реагент Peroxidase Block, 3/4% (об./об.) H₂O₂. Затем образцы промывали PBS 2 раза по 5 минут. После промывки образцы инкубировали с реагентом Protein Block в течение 8 минут. Реагент Protein Block, 0,4% казеина в фосфатно-солевом буфере. После блокирования предметные стекла промывали PBS 2 раза по 5 минут.

[00302] Срезы окрашивали с использованием первичного антитела UMG1 ("m-UMG1") в течение ночи при 4°С в разведении 1:300. Затем окрашенные срезы промывали PBS 2 раза по 5 минут. После промывки образцы инкубировали с антителом кролика против IgG мыши в течение 30 минут, а затем промывали PBS 2 раза по 5 минут. После промывки

образцы инкубировали с реагентом Novolink Polymer в течение 30 минут, поли-HRP-IgG против кролика, а затем промывали PBS 2 раза по 5 минут.

[00303] Окрашивание срезов выявляли с помощью субстрата-хромогена АЕС (3-амино-9-этилкарбазола) (Dako), а затем промывали проточной водопроводной водой. Срезы докрашивали гематоксилином в течение 5 минут, а затем снова промывали проточной водопроводной водой. Срезы заключали в среду Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium (Dako). Тканевые срезы анализировали на окрашивание UMG1 с помощью оптического микроскопа (Leica Microsystems) и получали микрофотографии с использованием цифровой камеры (Leica).

[00304] **Результаты:** Авторы настоящего изобретения наблюдали окрашивание UMG1 в иммунном инфильтрате различных солидных опухолей. Более конкретно, авторы настоящего изобретения наблюдали значительную реакционную способность в отношении опухолеассоциированных макрофагов в тканях рака легких, колоректального рака и рака молочной железы. См. фигуры 14А (колоректальная аденокарцинома (степень 2, G2), 14В (аденокарцинома легких) и 14С (молочная железа, тройной негативный инфильтративно-протоковый рак молочной железы (G2, базально-подобный)).

[00305] Примечательно, что UMG1 не могло окрашивать злокачественные клетки напрямую, в отличие от других ранее описанных антител против CD43, таких как UN1 (см. окрашивание UN1 в De Laurentiis, A. *et al.*, *Molecular Cellular Proteomics*, 2011, фиг. 9).

[00306] Эти результаты свидетельствуют о том, что антитело UMG1 имеет иной профиль связывания с CD43, чем другие охарактеризованные антитела против CD43, в частности, UN1, которое, как показано ранее, связывается с CD43 в злокачественных клетках.

6.17.6. Пример 6: Специфичность связывания UMG1 - эпитоп UMG1 экспрессируется в опухолеассоциированных макрофагах, и экспрессия эпитопа UMG1 повышена, когда макрофаги сокультивируются и взаимодействуют со злокачественными клетками

[00307] В этом примере образцы из разных типов злокачественных новообразований анализировали на экспрессию эпитопа UMG1 посредством иммуногистохимии, и было обнаружено, что специфический эпитоп CD43, связываемый UMG1, высоко экспрессируется опухолеассоциированными макрофагами (ТАМ).

[00308] **Способы:** Различные типы злокачественных новообразований окрашивали, как описано в примерах в настоящем описании.

[00309] **Результаты:** При оценке образцов разных типов злокачественных новообразований посредством иммуногистохимии (таблица 3, фигура 4 и фиг. 14А-14С), наблюдали, что UMG1⁺ макрофаги являются распространенным инфильтрирующим компонентом большинства опухолей со специфической и конкретной, высокой степенью инфильтрации при раке поджелудочной железы и раке яичников, несмотря на отсутствие эпитопа UMG1 в клетках миелоидного происхождения среди РВМС здорового индивидуума.

Таблица 3: Инфильтрация UMG1⁺ TAM различных опухолей	
Тип злокачественного новообразования	Инфильтрация UMG1⁺ 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	++

[00310] Для лучшего понимания значения эпитопа UMG1 на макрофагах во втором эксперименте изменения экспрессии эпитопа UMG1 оценивали на модели дифференцировки макрофагов в присутствии или отсутствие сокультивируемых злокачественных клеток. С этой целью использовали клетки моноцитарного лейкоза ТНР-1; как показано в примере 3, эти клетки не экспрессируют эпитоп UMG1.

[00311] **Способы:** Для получения дифференцированных, неполяризованных макрофагов человека M0 (ТНР-1М), клетки культивировали в течение 48 ч. в подходящей полной среде в присутствии 50 нг/мл форбол-12-миристан-13-ацетата (РМА). Затем среду заменяли свежей средой без РМА. Затем добавляли клетки рака поджелудочной железы PANC1 в соотношении 1:1 в выбранные лунки и инкубировали в течение 48 ч.

[00312] Затем клетки подготавливали к иммунофлуоресцентному анализу. В кратком изложении, после фиксации клетки ТНР-1М окрашивали с помощью химерного антитела, полученного из UMG1, ch-UMG1, дополнительно описанного в примере 16, или контрольного IgG1 человека, и инкубировали при 4°C в течение ночи. Затем к клеткам добавляли FITC-конъюгированное вторичное mAb против человека на 2 часа. После промывки к клеткам добавляли заливочную среду против выцветания с DAPI (Vectashield®, Vectorlabs) и покрывные стекла, а затем анализировали.

[00313] **Результаты:** Как показано на фиг. 5А, полученные из ТНР-1 макрофаги, окрашенные контрольным IgG1, являлись полностью отрицательными, в то время как окрашенные ch-UMG1 являлись слабо положительными (неяркими). Примечательно, что в присутствии клеток PANC1 полученные из ТНР1 макрофаги демонстрировали сильную экспрессию UMG1 (яркие). Показано одно конкретное взаимодействие между

полученными из ТНР-1 макрофагами (белая стрелка) и клетками PANC1 (красная стрелка) (фиг. 5А, слева).

[00314] Эти результаты свидетельствуют о том, что UMG1-специфический эпитоп подвергнут значительной положительной регуляции (т.е. повышен), когда макрофаги сокультивируются и взаимодействуют со злокачественными клетками в реконструированном микроокружении опухоли. Эта повышенная экспрессия означает, что эпитоп UMG1 является подходящей мишенью для терапевтических подходов, сфокусированных на удалении опухолеассоциированных макрофагов. Помимо этого потенциала в качестве терапевтического инструмента, UMG1 также можно использовать для детекции, анализа прогностической роли и прогностических исследований.

6.17.7. Пример 7: Специфичность связывания UMG1 - анализы конкурентного связывания позволяют предполагать, что участок связывания UMG1 на CD43 является уникальным по сравнению с коммерчески доступными антителами против CD43

[00315] Для определения того, является ли участок связывания UMG1 тем же или отличается от коммерчески доступных антител против CD43, осуществляли анализы конкурентного связывания между (i) h-UMG1 (гуманизированной версией антитела UMG1, дополнительно описанной в примере 19 ниже) и фикоэритрин-конъюгированным h-UMG1 (h-UMG1-PE) и (ii) h-UMG1 и тремя коммерчески доступными антителами против CD43 на двух разных линиях клеток, СЕМ и НРВ-ALL.

[00316] **Способы:** Осуществляли анализ конкурентного связывания и анализ FACS с использованием следующих антител: неконъюгированного h-UMG1, h-UMG1-PE и коммерчески доступных антител против CD43: MEM-59-PE (Invitrogen), L-10-PE (Invitrogen) и 1G10-PE (Becton Dickinson). В кратком изложении, клетки СЕМ и НРВ-ALL инкубировали в течение 20 минут на льду в темноте с неконъюгированными h-UMG1 с увеличивающимися концентрациями (0,016 мкг/мл, 0,08 мкг/мл, 0,4 мкг/мл, 1 мкг/мл, 2 мкг/мл) в присутствии 1 мкг/мл одного из клонов антитела против CD43 или h-UMG1-PE (положительного контроля).

[00317] Для каждого теста собирали и окрашивали приблизительно 500000 клеток. Клетки анализировали и измеряли с помощью FACS Canto (Becton Dickinson) и анализировали с помощью программного обеспечения DIVA (программного обеспечения BD FACSDiva™). Для каждого измерения 10000 событий гейтировали с использованием программного обеспечения DIVA. Каждый эксперимент осуществляли в трех параллелях.

[00318] **Результаты:** Как и ожидали, неконъюгированное h-UMG1 конкурирует с h-UMG1-PE за связывание в обеих линиях клеток СЕМ и НРВ-ALL. Т.е. количество окрашенных клеток, помеченных h-UMG1-PE, снижается при повышении концентраций неокрашенного h-UMG1. См. фигуры 13А и 13В (линия с кругами).

[00319] В отличие от этого, неконъюгированное h-UMG1 не конкурирует за связывание с другими коммерчески доступными антителами против CD43 (MEM-59 (Invitrogen), L-10 (Invitrogen) и 1G10 (Becton Dickinson)). Фактически, количество

окрашенных клеток, помеченных антителом против CD43, не снижалось при повышении концентрации неконъюгированного антитела h-UMG1. См. фигуры 13A и 13B (линия с обращенными вверх треугольниками, линия с обращенными вниз треугольниками, линия с квадратами).

[00320] Эти результаты позволяют предполагать, что антитело h-UMG1 имеет иной участок связывания, чем три коммерчески доступных антитела против CD43.

6.17.8. Пример 8: Специфичность связывания UMG1 - проточно-цитометрические профили h-UMG1 в линиях клеток гемопозитического ростка по сравнению с опубликованными архивными данными о UN1

[00321] Как указано выше, в литературе описано, что UN1 напрямую связывается с различными линиями злокачественных новообразований, в то время как в экспериментах, описанных в примере 3 и примере 5 выше, UMG1 не связывался. Вместо этого, UMG1 связывается с инфильтратами опухолеассоциированных макрофагов в солидных опухолях.

[00322] Т.к. гибридома, секретирующая антитело UN1, никогда не была депонирована в биологическом хранилище, и не был создан главный банк клеток или рабочий банк клеток гибридомы UN1, что исключает параллельные экспериментальные сравнения между исходным антителом UN1 и UMG1, авторы настоящего изобретения дополнительно исследовали сходства и различия между связыванием UN1 и UMG1 посредством повторения экспериментов, впервые описанных в Tassone *et al.*, *Tissue Antigens* 44:73-82, 1994. В этой статье связывание UN1 с различными линиями клеток гемопозитического ростка, такие как линии JURKAT, MOLT-4, SEM и HPB-ALL, оценивали посредством проточной цитометрии.

[00323] **Способы:** Клетки из линий клеток человека собирали в количестве приблизительно 100000 клеток/пробирку. Затем клетки промывали посредством добавления 2 мл холодного буфера для окрашивания и центрифугирования клеток при 1200 об./мин. в течение 5 минут при комнатной температуре для осаждения и выбрасывали супернатант.

[00324] Первичное антитело h-UMG1 добавляли в концентрации 1 мкг/мл в конечный объем окрашивания 100 мкл клеток. Затем клетки смешивали с помощью центрифуги типа вортекс и инкубировали в течение 15 минут при 2-8°C, защищая от света. Затем избыток первичного антитела вымывали дважды посредством добавления 2 мл буфера для окрашивания и центрифугирования клеток при 1200 об./мин. в течение 5 минут при комнатной температуре для осаждения и выбрасывали супернатант. Добавляли вторичное, меченое флуорохромом антитело в рекомендованном разведении в конечный объем 100 мкл клеток и инкубировали в течение по меньшей мере 15 минут при 2-8 °C, защищая от света.

[00325] Затем избыточное вторичное антитело вымывали из клеток дважды посредством добавления 2 мл буфера для окрашивания и центрифугирования клеток при 1200 об./мин. в течение 5 минут при комнатной температуре для осаждения и выбрасывали

супернатант. Промытые осажденные клетки ресуспендировали в 500 мкл 1-кратного PBS и анализировали посредством проточной цитометрии.

[00326] **Результаты:** На фиг. 17А показаны архивные профили проточной цитометрии UN1, полученные в 1994 году в лаборатории Tassone (Tassone *et al.*, *Tissue Antigens* 44:73-82, 1994) на линиях клеток JURKAT, MOLT-4, СЕМ и HPB-ALL. На фиг. 17В показаны результаты проточной цитометрии антитела h-UMG1 на линиях клеток JURKAT, MOLT-4, СЕМ и HPB-ALL.

[00327] Сравнение показало, что UMG1 и UN1 не связываются с клетками JURKAT, но связываются с линиями клеток MOLT-4, СЕМ и HPB-ALL.

[00328] Примечательно, что профиль проточной цитометрии UMG1 на линии клеток СЕМ демонстрирует сдвиг кривой на приблизительно 1 log по сравнению с UN1. Различия кривых UN1 и UMG1 позволяют предполагать, что существуют различия аффинности связывания с клетками СЕМ.

6.17.9. Пример 9: Специфичность связывания UMG1 - связывание mAb h-UMG1 на активированных нейтрофилах

[00329] В этом примере экспрессию эпитопа UMG1 оценивали на инактивированных и активированных нейтрофилах, выделенных из периферической крови здоровых людей-доноров.

[00330] **Способы:** Цельную кровь человека от двух здоровых доноров собирали в вакутейнеры с антикоагулянтом гепарином, разводили 1:1 PBS и разделяли посредством центрифугирования в градиенте плотности Фиколл-Раге (относительное ускорение центрифуги 600, 15 мин, RT, без торможения). RBC (осадок эритроцитов) суспендировали в 1-кратном PBS, а затем добавляли 6% раствор декстрана. Осаждение декстраном осуществляли в течение 30 мин при RT в темноте. Супернатант нейтрофилов собирали и центрифугировали (5 мин, RT, относительное ускорение центрифуги 600). Для получения чистой популяции нейтрофилов осуществляли лизис RBC с использованием 10-кратного лизирующего буфера в течение 20 сек, лизис прекращали с помощью 1-кратного PBS. Образцы центрифугировали в течение 10 мин, относительное ускорение центрифуги 400, без торможения, выбрасывали супернатант, и осадок гранулоцитов ресуспендировали в среде для культивирования. В случае каждого образца гранулоцитов здорового донора одну половину культивировали только в средах для выращивания, в то время как другую половину стимулировали PMA (5 нг/мл) и иономицином (250 нг/мл) в течение 15 мин, 37°C, 5% CO₂. Образцы собирали, промывали в растворе для окрашивания и осуществляли блокирование Fc. Клетки инкубировали с CD11b Pe-Cy7 (пан-гранулоцитарный маркер), CD55 (маркер активации нейтрофилов) и UMG1-APC или APC-конъюгированным IgG1 человека изотипического контроля и анализировали посредством проточной цитометрии для оценки экспрессии h-UMG1 на инактивированных и активированных гранулоцитах.

[00331] **Результаты:** Связывание mAb h-UMG1 на популяциях инактивированных и активированных нейтрофилов было схожим с изотипическим контролем (IgG1). Лишь меньшинство нейтрофилов экспрессировало конкретные эпитопы CD43, на которые

нацелено mAb h-UMG1 (фиг. 33). CD43, как правило, экспрессируется на нейтрофилах, и этот результат подтверждает уникальность мишени mAb UMG1.

6.17.10. Пример 10: Специфичность связывания UMG1 - связывание mAb h-UMG1 на активированных Т-лимфоцитах

[00332] В этом примере экспрессию эпитопа UMG1 оценивали на активированных Т-лимфоцитах из периферической крови здоровых доноров.

[00333] **Способы:** Цельную периферическую кровь здоровых доноров (HD) собирали в вакутейнер с антикоагулянтом ЭДТА. Мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC) выделяли способом центрифугирования в градиенте плотности Фиколл-Раге. Лимфоциты от 3 HD активировали PMA (25 нг/мл) и иономицином (1 мкг/мл) в течение 24 часов при 37°C и 5% CO₂. После активации клетки собирали, промывали 1-кратным PBS и окрашивали на ранние и поздние маркеры активации Т-клеток, в частности, с помощью CD25-BV515, CD69-PE и h-UMG1-APC или IgG изотипического контроля-APC. Анализ проточной цитометрии осуществляли для оценки экспрессии h-UMG1 на CD25⁺ Т-клетках и CD69⁺ Т-клетках.

[00334] **Результаты:** Не наблюдали значимых различий связывания mAb h-UMG1 по сравнению с IgG изотипического контроля в активированных Т-лимфоцитах (фиг. 34A-34D). Таким образом, mAb h-UMG1 не нацелены на активированные Т-лимфоциты.

6.17.11. Пример 11: Специфичность связывания UMG1 - иммуногистохимический анализ связывания mUMG1 в здоровых и неопластических тканях

[00335] **Способы:** Тканевые матрицы (ТМА), используемые в иммуногистохимическом анализе, включают: нормальный орган самки собаки (DGF281); нормальный орган крысы (RAT901a); нормальный орган мыши (MO541c); нормальный орган макака-резуса (RhFDA1a); нормальный орган яванского макака (CyFDA1c); злокачественные и нормальные ткани множества органов (MC5003c); ткань злокачественной меланомы и кожи (ME2081); ткань, полученную при обследовании на лимфому (Ly2084); ткань рака молочной железы (BR1505d); пораженную ткань яичка (TE2081); ткань эмбриональной опухоли, полученную при тестировании (T001a); пищеварительную систему человека (GI1441); опухоль головного мозга человека (GL2082); злокачественную опухоль человека детского возраста (PC701), производимые US Biotech, Inc, и стандартную парафинизированную тканевую матрицу нормального органа человека, одобренную FDA (кат. № T8234701), производимую BioChain. Описание выбранных ТМА приведено ниже.

[00336] Стандартная тканевая матрица, одобренная FDA (ткани человека, T8234701-5): Нормальная матрица ткани человека, предоставляемая в пяти препаратах, включающих 30 разных типов нормальных тканей человека с 3 донорами на тип ткани.

[00337] Злокачественные и нормальные ткани множества органов (MC5003c): Матрица высокой плотности опухолей с нормальными тканями множества органов,

включающая 20 типов органов, каждый орган получали от 25 индивидуумов (20 случаев опухоли и 5 нормальных тканей), один биоптат на случай.

[00338] Злокачественная меланома (ME2081): Матрица ткани злокачественной меланомы и кожи, содержащая 88 случаев злокачественной меланомы, 16 образцов ткани кожи, два биоптата на случай.

[00339] Ткань, полученная при обследовании на лимфому (Ly2084): матрица ткани, полученной при обследовании на лимфому (препарат 4 из 520 случаев из набора препаратов обследования на лимфому), включающая 104 случаев злокачественной опухоли (64 случая В-клеточной лимфомы, 24 случая лимфома лимфоидной ткани слизистых оболочек, 6 случаев Т-клеточной лимфомы, 4 случая лимфомы Ходжкина, 4 случая анапластической крупноклеточной лимфомы, по 1 случаю лимфомы из клеток мантийной зоны и лимфомы Беркитта), два биоптата на случай.

[00340] Пораженная ткань яичка (TE2081): матрица ткани опухоли яичка, включающая 46 случаев семиномы, 8 случаев опухоли желточного мешка, 16 случаев эмбриональных карцином, 5 случаев тератом, 3 случая туберкулеза, 6 случаев атрофии, 15 образцов смежной нормальной ткани и 5 образцов нормальной ткани, два биоптата на случай.

[00341] Злокачественная опухоль человека детского возраста (PC701): матрица ткани злокачественной опухоли человека детского возраста с нормальной тканью, включающая 21 случай нефробластомы, 13 случаев нейробластомы, 7 случаев карциномы эндодермального синуса, 4 случая ретинобластомы, 3 случая гепатобластомы, 2 случая медуллобластомы, 4 случаев лимфомы, по 1 случаю папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, карциномы коры надпочечников, эмбриональной рабдомиосаркомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы, лейомиосаркомы, и 7 образцов нормальной ткани, один биоптат на случай.

[00342] Для иммуноокрашивания тканевые срезы депарафинировали и регидратировали. Демаскирование антигена осуществляли с использованием растворов для демаскирования эпитопов Novocastra, pH 9, буфера на основе ЭДТА в термостатической бане (FALC Instruments S.r.L, Treviglio (BG) Italy, модель WB-MD 5) при 98°C в течение 30 минут.

[00343] ТМА инкубировали в течение ночи с первичным mAb UMG1 (для этого использовали m-mAb UMG1, разведение 1:300) при 4°C. Иммуноокрашивание выявляли способом детекции с помощью полимера (Novolink Polymer Detection Systems, Novocastra Leica Biosystems Newcastle Ltd, кат. № RE7280-K) или субстрата-хромогена АЕС (3-амино-9-этилкарбазола, Dako, Ref K3464), готового к использованию. Препараты докрашивали гематоксилином Харриса (Novocastra, Leica Biosystems).

[00344] Все срезы анализировали с помощью оптического микроскопа Zeiss Axio Scope A1 (Zeiss, Germany) и получали микрофотографии с использованием цифровой

камеры Axioscam 503 Color с программным обеспечением для визуализации ZEN2 (Zeiss Germany).

[00345] Оценка экспрессии UMG1: Срезы сканировали с использованием Aperio CS2 Leica. Уровень экспрессии белка балльно оценивали вручную посредством определения интенсивности сигнала с использованием 4-ступенчатой шкалы: отрицательная (0), слабая (1), умеренная (2) и сильная (3). См. Mücke P, *et al.*, 2014, *Int J Cancer*, 135:2206-2214., включенную в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

[00346] **Результаты:** В нормальных тканях человека положительное связывание mAb UMG1 наблюдали на тимусе (фиг. 38А) и миндалине (фиг. 38В). Мембранное окрашивание являлось положительным с умеренной/сильной интенсивностью (баллы 2-3) на более чем 50% лимфоцитов и небольшой фракции элементов с морфологией моноцитов/макрофагов. Редкое связывание наблюдали на рассеянных иммунных клетках в других органах, но в этих клетках экспрессия больше согласовывалась с цитоплазматической экспрессией без мембранного усиления (см. фиг. 38С с примером из ткани легких).

[00347] В спектре лимфом часто наблюдали цитоплазматическое и мембранное окрашивание, и оно характеризовалось переменной интенсивностью (фиг. 39А-39В, таблица 6). Мембранная экспрессия эпитопа-мишени mAb UMG1 также являлась очевидной на злокачественных клетках во множестве наблюдаемых точек, хотя и с разной степенью интенсивности и распределением.

[00348] Что касается злокачественной меланомы, мишень mAb UMG1 экспрессировалась на мембране злокачественных клеток и на ТАМ (фиг. 40А, таблица 6). Кроме того, внутриопухольный лейкоцитарный инфильтрат окрашивался как положительный в некоторых образцах, как и ожидали в свете предварительных данных об экспрессии эпитопа на опухолеассоциированных макрофагах.

[00349] Среди неоплазий яичка, наибольшую позитивность в неопластическом клоне наблюдали в семиномах (фиг. 40В, таблица 6), за ними следовали эмбриональные карциномы и опухоли желточного мешка. При этом околоопухольная здоровая ткань и нормальное здоровое яичко являлись отрицательными.

Таблица 6					
Оценка связывания mAb UMG1 с лимфомами, меланомами и раком яичка					
Опухоль	Анализируемые образцы (N)¹	UMG1⁺ (N)²	Окрашивание >10% клеток (N)³	Интенсивность окрашивания 2+ или 3+ (N)⁴	UMG1⁺ иммунный инфильтрат (N)⁵
Лимфомы	167	94	73	45	N/A ⁶

Диффузная крупноклеточная В- клеточная лимфома	117	64	53	30	N/A
MALT-лимфома	29	21	14	9	N/A
Т-клеточная лимфома	12	5	4	2	N/A
Анапластическая крупноклеточная Лимфома	6	3	1	3	N/A
Другие	3	1	1	1	N/A
Меланома	203	15	N/A	2	98
Рак яичка	137	126	112	69	132
Семинома	83	78	73	32	78
Опухоль желточного мешка	16	16	12	8	16
Эмбриональная карцинома	32	26	23	23	32
Тератома (зрелая и незрелая)	6	6	4	6	6

¹Количество образцов, доступных для оценки (т.е. считающихся правильно окрашенными)

²Количество образцов, помеченных антителом UMG1 на мембране неопластических клеток

³Количество образцов с более чем 10% неопластических клеток, помеченных антителом UMG1

⁴Количество образцов с неопластическими клетками, помеченными антителом UMG1, с интенсивностью 2+ или 3+

⁵Количество образцов в более чем 10% иммунных клеток, инфильтрирующих микроокружение опухоли, помеченных антителом UMG1

⁶Не применимо или не оценено

Таблица 7

Оценка связывания mAb UMG1 со злокачественными новообразованиями детского возраста и эмбриональными злокачественными новообразованиями

Опухоль	Анализируемые образцы (N)¹	UMG1⁺ (N)²	Окрашиваемые >10% клеток (N)³	Интенсивность окрашивания 2+ или 3+ (N)⁴	UMG1⁺ иммунный инфильтрат (N)⁵
Карцинома коры надпочечников	1	0	0	0	0
Альвеолярная рабдомиосаркома	1	1	1	1	1
Лимфома Беркитта	1	1	1	1	N/A
Папиллома хориоидного сплетения	1	0	0	0	1
Диффузная В-клеточная Лимфома	2	1	1	0	N/A
Эмбриональная рабдомиосаркома	0	0	0	0	0
Карцинома эндодермального синуса	5	2	0	0	3
Эпендимома	1	1	0	1	1
Глиобластома	1	1	1	1	1
Гепатобластома	2	2	2	0	2
Лимфома Ходжкина	1	0	0	0	N/A
Незрелая тератома	1	0	0	0	1
Лейомиосаркома	1	1	1	0	1
Медуллобластома	2	1	0	0	1
Нефробластома	21	7	4	3	5
Нейробластома	13	10	6	6	7
Примитивная нейроэктодермальная опухоль	1	1	1	1	0

Ретинобластома	4	3	3	2	3
-----------------------	---	---	---	---	---

¹Количество образцов, доступных для оценки (т.е. считающихся правильно окрашенными)

²Количество образцов, помеченных антителом UMG1 на мембране неопластических клеток

³Количество образцов с более чем 10% неопластических клеток, помеченных антителом UMG1

⁴Количество образцов с неопластическими клетками, помеченными антителом UMG1, с интенсивностью 2+ или 3+

⁵Количество образцов в более чем 10% иммунных клеток, инфильтрирующих микроокружение опухоли, помеченных антителом UMG1

⁶Не применимо или не оценено

[00350] Другой группой злокачественных новообразований, демонстрирующих экспрессию эпитопа mAb UMG1 на неопластических клетках и иммунных инфильтратах, являются опухоли детского возраста различного происхождения (см. таблицу 7).

[00351] Кроме того, экспрессию эпитопа UMG1 на злокачественных клетках или инфильтратах иммунных клеток (опухолеассоциированных макрофагах (TAM) и других инфильтратах иммунных клеток) наблюдали в некоторых точках, представляющих множественные солидные опухоли разного происхождения (тканевая матрица MC5003с). Связывание mAb UMG1 в этих образцах характеризовалось разным уровнем распределения и интенсивности (данные не представлены).

6.17.12. Пример 12: Специфичность связывания UMG1 - участок связывания эпитопа на CD43

[00352] Различные варианты белка CD43 тестировали на связывание антитела h-UMG1 посредством вестерн-блоттинга и анализа FACS для определения участка связывания h-UMG1 на CD43 в клетках HEK293T дикого типа, не экспрессирующих CD43.

[00353] **Варианты белка CD43:** Последовательности тестируемых клонов белка CD43 приведены на фигуре 15А, в таблице 4 и списке последовательностей как SEQ ID NO: 17-24. CD43 дикого типа, указанный как "CD43 #1", получали с использованием полной области из 400 аминокислот. Для конструирования вариантов белка CD43 N-концевой домен последовательно укорачивали. Первый укороченный вариант CD43, "CD43 #2", получали с использованием аминокислот 31-400 полноразмерного CD43. Второй вариант CD43, указанный как "CD43 #3", получали с использованием аминокислот 41-400 полноразмерного CD43. Третий вариант CD43, указанный как "CD43 #4", получали с использованием аминокислот 61-400 полноразмерного CD43. Четвертый вариант CD43, указанный как "CD43 #5", состоит из аминокислот 91-400 полноразмерного CD43. Пятый вариант CD43, указанный как "CD43 #6", имеет делецию аминокислот 64-78.

[00354] Кроме того, также тестировали варианты с делециями отдельных аминокислот. Шестой вариант CD43, указанный как "CD43 #7", имеет делецию отдельной аминокислоты в положении 69, считающемся участком GalNac. Седьмой вариант CD43,

указанный как "CD43 #8", имеет замену отдельной аминокислоты в положении 69, T на N, или "T69N".

Таблица 4		
Варианты белка CD43, тестируемые на связывание антитела UMG1		
Вариант	Используемые области последовательности (ссылка на CD43 дикого типа)	SEQ ID NO:
CD43 #1 (wt)	Аминокислоты 1-400	17
CD43 #2	Аминокислоты 31-400	18
CD43 #3	Аминокислоты 41-400	19
CD43 #4	Аминокислоты 61-400	20
CD43 #5	Аминокислоты 91-400	21
CD43 #6	Аминокислоты 1-63 79-400	22
CD43 #7	Аминокислоты 1-68 70-400	23
CD43 #8	Аминокислоты 1-400 (T69N)	24

[00355] **Конструкции:** Конструкции белка CD43 экспрессировали с использованием экспрессирующих векторов pLenti-CMV-(insert)-His-tag-GFP-2A-Puro от Applied Biological Materials (ABM) Inc. (Vancouver, Canada). Детекцию гистидиновой метки и/или GFP использовали в качестве положительного контроля для успешной трансфекции и/или экспрессии белка.

[00356] **Трансфекция:** Каждый вектор транзитивно экспрессировали в клетках HEK293T с использованием липофектамина LTX (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) по инструкциям производителя. Клетки HEK293T поддерживали при 37°C и 5% CO₂ в DMEM, дополненной 10% FBS и 1% пенициллина/стрептомицина (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Через 72 ч. после трансфекции клетки подвергали вестерн-блоттингу или проточной цитометрии (FACS).

[00357] **Вестерн-блоттинг:** Вестерн-блоттинг с использованием антитела UMG1 осуществляли для определения того, может ли антитело UMG1 связываться и помогать определять CD43 дикого типа и варианты белка CD43 с ожидаемым размером в кДа. Антитело с гистидиновой меткой использовали в качестве положительного контроля.

[00358] В кратком изложении, белковые экстракты целых клеток получали с использованием лизирующего буфера NP40, дополненного смесью ингибиторов протеазы и фосфатазы Halt™ (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Для оценки концентрации белка использовали Анализ Брэдфорда (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA). Лизаты клеток нагружали в концентрации 60 мкг на дорожку и разделяли с использованием 3-8% Трис-ацетатных гелей для разделения белков NuPAGE™ (Invitrogen, Thermo Scientific, MA, USA). Белки подвергали электропереносу в течение 30 минут с помощью системы переноса Trans-Blot® Turbo™ (Bio-Rad Laboratories, Berkeley, CA, USA) и иммуноблоттингу с использованием антитела против актина, приобретенного в Cell Signaling (данные не

представлены), антитела против гистидинового метки (#G020) от abm (Vancouver, Canada) и первичного антитела h-UMG1 (оба в разведении 1:500). HRP-конъюгированные антитела козы против мыши и кролика против человека (Invitrogen) использовали в качестве вторичных антител (разведение 1:3000). Иммунореактивные полосы выявляли способом детекции усиленной хемилюминесценции с использованием хемилюминесцентного субстрата SuperSignal™ West Pico PLUS (Thermo Scientific, MA, USA).

[00359] **Проточная цитометрия (FACS):** FACS осуществляли для определения того, можно ли с помощью антитела определять CD43 дикого типа и варианты CD43, экспрессируемые в линии клеток HEK293T.

[00360] Анализ FACS осуществляли, следуя стандартным способам, с использованием 1 мкг/мл PE-конъюгированного антитела h-UMG1 для определения процента h-UMG1-положительных клеток среди GFP-положительных клеток. Образцы анализировали посредством проточной цитометрии (LSRFortessa™ X-20, BD) и программного обеспечения DIVA (программного обеспечения BD FACSDiva™). Для каждого измерения гейтировали по меньшей мере 20000 событий.

[00361] **Результаты:** Результаты вестерн-блоттинга позволяют предполагать, что участок связывания эпитопа UMG1 локализован между аминокислотами 61-91 (по нумерации CD43 дикого типа). См. последовательность в рамке на фигуре 15A, где показан предполагаемый участок связывания для антитела h-UMG1. Кроме того, эти исследования показали, что антитело UMG1 специфически связывается с UMG1, а не с белками CD43 с гистидинового меткой, в которых отсутствуют специфические внеклеточные области, распознаваемые UMG1. См. фигуры 15C и 15E.

[00362] Результаты FACS подтверждают результаты, наблюдаемые при вестерн-блоттинге, состоящие в том, что UMG1 в участке связывания эпитопа находится между аминокислотами 61-91 CD43 дикого типа, т.к. его нельзя определить в GFP-экспрессирующих клетках с вариантами белков CD43 #5 и CD43 #6. См., фигуры 15D и 15F. Кроме того, исследования посредством вестерн-блоттинга и FACS, показанные на фигурах 15E и 15F, позволяют предполагать, что область аминокислот 61-91 CD43 распознается антителом h-UMG1 в клетках HEK293T с трансгенной экспрессией CD43, также если треонин 69 делетирован (CD43 #7) или заменен аминокислотой, не являющейся O-гликозилированной (CD43 #8). Это приводит к связыванию эпитопа, который не должен содержать какую-либо сахарную группу. Как и ожидали, клетки HEK293T дикого типа, не трансформированные с использованием CD43, не демонстрировали какой-либо реактивности в отношении антитела UMG1.

6.17.13. Пример 13: Специфичность связывания UMG1 - линейное эпитопное картирование mAb h-UMG1 - эпитопы CD43

[00363] **Способы:** Содержимое матрицы: последовательность CD43 человека (SEQ ID NO: 17) подвергали элонгации с использованием нейтральных линкеров GSGSGSG (SEQ ID NO: 46) на С- и N-конце во избежание укорочения пептидов. Удлиненную последовательность антигена транслировали в линейные пептиды из 15 аминокислот с

перекрыванием между пептидами на 14 аминокислот. Получаемая пептидная матрица CD43 содержала 400 разных пептидов, нанесенных в двух параллелях (800 пептидных точек) и окруженных дополнительными контрольными пептидами HA (YPYDVDPDYAG (SEQ ID NO: 47), 82 точки). Синтез и анализ матрицы осуществляли в PEPperPRINT GmbH, Heidelberg.

[00364] Предварительное окрашивание копии пептидной матрицы CD43 осуществляли с использованием вторичного антитела (антитела козы против IgG человека (H+L) DyLight680 (0,2 мкг/мл)) и контрольного антитела (моноклональное антитело мыши против HA (12CA5) DyLight800 (0,5 мкг/мл)). Через 15 мин предварительного набухания в промывочном буфере (PBS, pH 7,4, с 0,05% Tween 20) и 30 мин инкубации в блокирующем буфере (блокирующем буфере Rockland MB-070) пептидную матрицу CD43 исходно инкубировали с вторичным и контрольным антителами в инкубационном буфере (промывочный буфер с 10% блокирующего буфера) при комнатной температуре (RT) в течение 45 мин для исследования фоновых взаимодействий с линейными пептидами CD43, которые могут мешать основным анализам.

[00365] После последующей инкубации (16 ч. при 4°C и 140 об./мин.) других копий пептидной матрицы CD43 с гуманизированным моноклональным антителом против CD43 (mAb h-UMG1) в концентрациях 10 мкг/мл и 100 мкг/мл в инкубационном буфере осуществляли окрашивание с использованием вторичного и контрольных антител. Считывание осуществляли с помощью системы визуализации LI-COR Odyssey Imaging System при интенсивности сканирования 7/7 (красный=700 нм/зеленый=800 нм), позиции сканирования 0,65 мм и разрешении 21 мкм. Дополнительные контрольные пептиды HA, окружающие пептидные матрицы, одновременно окрашивали контрольным антителом в качестве внутреннего контроля качества для подтверждения качества анализа и целостности пептидной матрицы.

[00366] При интенсивности сканирования 7/7 (красный/зеленый) авторы настоящего изобретения не наблюдали какого-либо фонового взаимодействия вторичного и контрольного антител с линейными пептидами CD43 даже после значимого повышения яркости и контраста. Таким образом, опускали количественный анализ данных с помощью анализатора PepSlide®. Окрашивание с использованием контрольного антитела приводило к ожидаемому, хорошо выраженному контрольному профилю точек HA, окружающих пептидную матрицу (зеленый), что позволяет валидировать общую целостность матрицы и качество анализа.

[00367] Количественный анализ интенсивности точек и аннотирование пептидов были основаны на 16-битных файлах tiff в шкале серого, где наблюдали более высокий динамический диапазон, чем в 24-битных цветных файлах tiff. Анализ изображений матриц осуществляли с помощью анализатора PepSlide®. Алгоритм программного обеспечения разбивает интенсивности флуоресценции каждой точки на необработанный, приоритетный и фоновый сигнал и вычисляет усредненные медианные приоритетные интенсивности и отклонения между точками для дубликатов точек. Основываясь на усредненных медианных

приоритетных интенсивностях, получали карты интенсивности и выделяли взаимодействия на пептидной карте с помощью цветового кода интенсивности, при этом красный цвет означает высокую интенсивность в точке, а белый - низкую. Авторы настоящего изобретения принимали максимальное отклонение между точками 40%, в ином случае соответствующее значение интенсивности обнуляли.

[00368] Авторы настоящего изобретения дополнительно строили график усредненных интенсивностей точек в анализах с использованием гуманизированного моноклонального антитела против последовательности антигена от N- до C-конца CD43 для визуализации общих интенсивностей точек и соотношения сигнала и шума. Графики интенсивности коррелировали с пептидными картами и картами интенсивности, а также с визуальным осмотром сканированных изображений матриц для идентификации эпитопа гуманизированного моноклонального антитела против CD43. В случае если не ясно, вносит ли вклад конкретная аминокислота в связывание антитела, соответствующие буквы написаны серым цветом. Для лучшего рассмотрения данных выравнивали базовые линии графиков интенсивности.

[00369] **Результаты:** Авторы настоящего изобретения наблюдали слабый ответ антитела против эпитоп-подобного профиля точек, образованного смежными пептидами с консенсусным мотивом INEGSPLW (SEQ ID NO: 48; аминокислоты 71-78 CD43 человека); кроме того, авторы настоящего изобретения наблюдали два даже более сильных взаимодействия с пептидами с высоко основной консенсусной последовательностью RRRQKR (SEQ ID NO: 49) и RRPTLTFFGRRK (SEQ ID NO: 50), наиболее вероятно, из-за неспецифического ионного связывания антитела (фиг. 35). Умеренные соотношения сигнала и шума были хорошо определимы при одновременном окрашивании контрольных пептидов HA.

6.17.14. Пример 14: Специфичность связывания UMG1 - линейное эпитопное картирование mAb h-UMG1 - сканирование замен в эпитопе

[00370] **Способы:** Содержимое матрицы: Сканирование замен в эпитопе пептида PPSTSINEGSPLWTS дикого типа (SEQ ID NO: 51) основано на замене всех положений аминокислот 20 главными аминокислотами. Полученная пептидная матрица содержала 300 разных пептидных вариантов пептида дикого типа, напечатанных в трех параллелях (900 точек пептидов), 9 точек специального контрольного пептида PPSTSVNEGSPLGTS (SEQ ID NO: 52) и рамку из дополнительных контрольных пептидов HA (YPYDVPDYAG, 82 точки (SEQ ID NO: 47)). Синтез и анализ матриц осуществляли в PEPperPRINT GmbH, Heidelberg.

[00371] Предварительное окрашивание копии пептидной матрицы осуществляли с использованием вторичного и контрольного антител. Через 15 мин предварительного набухания в промывочном буфере и 30 мин инкубации в блокирующем буфере копию пептидной матрицы исходно инкубировали с вторичным и контрольным антителами в течение 45 мин при комнатной температуре для анализа фоновых взаимодействий с вариантами пептида дикого типа, которые могут мешать основным анализам.

[00372] После последующей инкубации других копий пептидной матрицы с гуманизированным моноклональным антителом против CD43 в концентрациях 1 мкг/мл, 10 мкг/мл, 100 мкг/мл (данные не представлены) и 250 мкг/мл в инкубационном буфере осуществляли окрашивание с использованием вторичного и контрольных антител. После промывки осуществляли считывание при интенсивности сканирования 7/7 (красный/зеленый). Дополнительные контрольные пептиды HA, окружающие пептидные матрицы, одновременно окрашивали в качестве внутреннего контроля качества для подтверждения качества анализа и целостности пептидной матрицы.

[00373] При интенсивности сканирования 7/7 (красный/зеленый) авторы настоящего изобретения не наблюдали какого-либо фоновое взаимодействие вторичного и контрольного антител с 300 вариантами пептида дикого типа или дополнительных специальных пептидов даже после значительного повышения яркости и контраста (см. скорректированное сканирование). Опускали количественный анализ данных с помощью анализатора PepSlide[®]. Окрашивание с использованием контрольного антитела приводило к ожидаемому, хорошо определенному контрольному профилю точек HA, окружающих пептидную матрицу, что позволяет валидировать общую целостность матрицы и качество анализа.

[00374] Количественный анализ интенсивности точек и аннотирование пептидов было основано на 16-битных файлах tiff в шкале серого, где наблюдали более высокий динамический диапазон, чем в 24-битных цветных файлах tiff. Анализ изображений матриц осуществляли с помощью анализатора PepSlide[®]. Алгоритм программного обеспечения разбивает интенсивности флуоресценции каждой точки на необработанный, приоритетный и фоновый сигнал и вычисляет усредненные медианные приоритетные. Основываясь на усредненных медианных приоритетных интенсивностях, получали карты интенсивности и выделяли взаимодействия на пептидной карте с помощью цветового кода интенсивности, при этом красный цвет означает высокую интенсивность в точке, а белый - низкую. Очень слабые сигналы с размытой морфологией точек обнуляли.

[00375] Авторы настоящего изобретения дополнительно строили график усредненных интенсивностей точек в анализах с использованием гуманизированного моноклонального антитела от левой верхней части чипа к нижней правой части по рядам для визуализации общих интенсивностей точек и соотношений сигнала и шума. График интенсивности коррелировал с пептидными картами и картами интенсивности, а также с визуальным осмотром сканов матриц для идентификации вариантов пептида дикого типа, взаимодействовавших с гуманизированным моноклональным антителом против CD43.

[00376] Для получения более глубокого понимания сканирования замен в эпитопе в пептиде дикого типа, авторы настоящего изобретения дополнительно получали тепловую карту сканированного изображения матрицы, а также матрицу замен и график аминокислот, отражающие преобладание аминокислот в указанном положении. Для идентификации консервативных и переменных положений аминокислот в пептиде дикого типа анализировали наборы данных.

[00377] В матрице замен преобладание указанной аминокислоты выделено цветовым кодом (красный для предпочтительных аминокислот, синий для менее предпочтительных аминокислот), и его вычисляли, разделяя интенсивность точки указанного пептида на усредненные интенсивности точек всех 20 пептидов, замененных в том же положении. График аминокислот получали, разделяя интенсивность точки указанного пептида на интенсивность точки пептида дикого типа. Таким образом, положение аминокислоты отражало соотношение интенсивности по сравнению с аминокислотой нативного пептида дикого типа.

[00378] **Результаты:** Сканирование замен в пептиде дикого типа PPSTSINEGSPLWTS (SEQ ID NO: 51) демонстрировало слабый, но типичный профиль замен в эпитопе с консервативными (несколько точек или отдельные точки в ряду) и переменными (непрерывные ряды точек) положениями аминокислот (см. фиг. 36). Наблюдали низкие соотношения сигнала и шума, и они были четко выражены при одновременном контрольном окрашивании рамки контрольных пептидов НА.

[00379] С помощью тепловой карты, матрицы замен и графика аминокислот гуманизованного моноклонального антитела против CD43, анализируемых относительно сканирования замен пептида дикого типа PPSTSINEGSPLWTS (SEQ ID NO: 51, аминокислоты 66-80 CD43 человека), выявили консервативный коровий мотив EGSPLW (SEQ ID NO: 53, аминокислоты 73-78 CD43 человека), окруженный N- и C-концевыми переменными фрагментами PPSTSIN (SEQ ID NO: 54, аминокислоты 66-72 CD43 человека) и TS (SEQ ID NO: 55, аминокислоты 79-80 CD43 человека) (см. фиг. 37A-37C). Этот результат соответствовал предполагаемому эпитопу INEGSPLW, полученному при предыдущем эпитопном картировании относительно полноразмерного белка CD43 человека.

[00380] Положения аминокислот 76 (P) и 77 (L) CD43 человека были необходимы для связывания антител, и совершенно не переносили какие-либо замены аминокислот. Положения аминокислот 73 (E) и 78 (W) являлись высоко консервативными и переносили только консервативную замену на D и F соответственно. Замена W на F в положении 78 даже приводила к кажущемуся повышению связывания антитела. Положение аминокислоты 74 (G) демонстрировало более низкую степень консервативности последовательности и являлось восприимчивым к замене на M, кислые аминокислоты D и E, а также ароматические аминокислоты W, F и Y.

[00381] Все другие положения аминокислот, включая положение аминокислоты 75 (S), демонстрировали переменчивые свойства. В переменных положениях аминокислот авторы настоящего изобретения наблюдали общее преобладание кислых и ароматических аминокислот, подобных E, D, F и W. Кроме того, в переменных положениях аминокислот наблюдали препятствие замене основными аминокислотами K и H, но, неожиданно, не R.

6.17.15. Пример 15а: Специфичность связывания UMG1 - связывание с агликозилированной внеклеточной частью CD43 по сравнению с другими антителами против CD43

[00382] В этом примере показано измерение аффинности связывания между гуманизированным UMG1 (h-UMG1) (H3-L4) и внеклеточной частью CD43 (аминокислоты 20-253). Результат выражали как константу диссоциации K_D .

[00383] **Способы:** Антитела, растворенные в воде, вручную наносили на чистый, покрытый золотом (толщина 47 нм) сенсорный чип PlexArray Nanocapture Sensor Chip (Plexera Bioscience, Seattle, WA, US) при влажности 40%. Различные концентрации аналитов (CD43) тестировали на аффинность. Каждую концентрацию наносили в двух параллелях, и каждая точка содержала 0,2 мкл раствора образца. Чип инкубировали при 80% влажности и 4°C в течение ночи и промывали 10-кратным PBST в течение 10 мин, 1-кратным PBST в течение 10 мин и деионизированной водой дважды в течение 10 мин. Затем чип блокировали 5% (масс./об.) обезжиренным молоком в воде в течение ночи и промывали 10-кратным PBST в течение 10 мин, 1-кратным PBST в течение 10 мин и деионизированной водой дважды в течение 10 мин перед сушкой под потоком азота перед использованием. Измерения SPRi осуществляли с использованием PlexArray HT (Plexera Bioscience, Seattle, WA, US). Коллимированный свет (660 нм) проходит через соединительную призму, отражается от SPR-активной золотой поверхности и принимается ПЗС-камерой. В экспериментах использовали различные концентрации аналита (внеклеточной части рекомбинантного CD43 человека (из аминокислот 20-253), получаемой с помощью вектора *E. coli* CD43; SEQ ID NO: 42) (различные концентрации аналита показаны разными цветными линиями на фигуре 19). Буферы и образцы с помощью непультсирующего поршневого насоса впрыскивали в проточную кювету 30 мкл, установленную на соединительную призму. Каждый цикл измерения включал четыре стадии: промывка промывочным буфером PBST с постоянной скоростью 2 мкл/сек для получения стабильного базового уровня, впрыскивание образца со скоростью 5 мкл/сек для связывания, промывка поверхности PBST со скоростью 2 мкл/сек в течение 300 сек и регенерация с помощью 0,5% (об./об.) H_3PO_4 со скоростью 2 мкл/сек в течение 300 сек. Все измерения осуществляли при 25°C. Изменения сигнала после связывания и промывки (в AU) регистрировали в качестве результата анализа.

[00384] Анализировали выбранные области с пересаженными белками на изображениях SPR, и строили график средних вариаций коэффициента отражения выбранных областей как функции времени. Сигналы связывания в реальном времени регистрировали и анализировали с помощью Data Analysis Module (DAM, Plexera Bioscience, Seattle, WA, US). Кинетический анализ осуществляли с использованием программного обеспечения VIAevaluation 4.1 (Biacore, Inc.).

[00385] **Результаты:** Результаты анализа связывания SPR показали значение K_D 99,4 нМ между внеклеточной частью CD43 и h-UMG1 (фигура 19). Результат свидетельствует о сильной аффинности связывания с мишенью.

[00385] Кроме того, связывание агликозилированной внеклеточной части CD43 (продуцируемой в *E. coli*, без гликозилирования млекопитающего) позволяет дифференцировать UMG1 и другие антитела против CD43, связывающиеся только с

гликозилированным или нейраминидаза-чувствительным эпитопом, такие как UN1 и MEM-59, соответственно (de Laurentiis A, *et al.*, Mol Cell Proteomics. 2011 May; 10(5)).

6.17.16. Пример 15b: Специфичность связывания UMG1 - сравнение характеристик связывания UMG1 с архивными данными для UN1

[00387] Как показано в примерах выше, UMG1 и его химерные и гуманизированные производные, ch-UMG1 и h-UMG1, соответственно, имеют несколько разных связывающих свойств по сравнению с другими антителами против CD43, включая архивные данные для UN1. В таблице 5 приведено сравнение свойств UMG1 с архивными данными для UN1.

Таблица 5		
Свойства UMG1 по сравнению с известными антителами против CD43		
Свойство	UN1	UMG1
Гибридома	Нет депонирования в хранилище, нет замороженного главного банка клеток, нет замороженного рабочего банка клеток	Депонировано под регистрационным номером ICLC PD n° 16001
Последовательность CDR	Никогда не была секвенирована	Известная SEQ ID NO: 1, 43, 3-6
Связывание с гликозилированным CD43	Да	Да
Связывание с негликозилированным CD43	Нет (de Laurentiis <i>et al.</i> , <i>Molecular & Cellular Proteomics</i> 10:1-12, 2011; фиг. 8.)	Да Данные вестерн-блоттинга и FACS формы CD43 с делецией по остатку T69 или мутантной формы CD43 (пример 12). Пример 15а, фигура 19, данные SPR выше Линейное эпитопное картирование (пример 13, фигура 35) и сканирование замен аминокислот (пример 14, фигура 36 и 37А-С)

Связывание с РВМС	Положительное для субпопуляции лимфоцитов; отрицательное для моноцитов и гранулоцитов (Tassone <i>et al.</i> , <i>Tissue Antigens</i> 44:73-82, 1994)	Положительное для субпопуляции лимфоцитов; отрицательное для клеток миелоидного происхождения. Минимальное связывание, наблюдаемое в случае инактивированных и активированных нейтрофилов. Не наблюдали связывания активированных Т-лимфоцитов См. пример 1, пример 2, пример 9, пример 10, таблицу 1, фиг. 2A-2D, фиг. 33 и фиг. 34A-34D
Связывание с клетками Т-клеточной лимфомы и T-ALL	Да, наблюдали только в отношении линий клеток (Tassone <i>et al.</i> , <i>Tissue Antigens</i> 44:73-82, 1994)	Да, наблюдали в отношении линий клеток и тканевых матриц См. пример 3, пример 11, таблицу 2, фиг. 39
Связывание с клетками макроглобулинемии Вальденстрема	Неизвестно	Да См. пример 3, таблицу 2, фиг. 3A-3B
Связывание со злокачественными тканями	Да (Cecco <i>et al.</i> , <i>Tissue Antigens</i> 51:528-535, 1998; Tassone <i>et al.</i> , <i>Int. J. Oncology</i> 20:707-711, 2002; Tuccillo <i>et al.</i> , <i>Mol. Cancer Ther.</i> 13(3))	Да, наблюдали мембранную экспрессию на некоторых неопластических клетках в различных тканях (сниженная интенсивность и распределение по сравнению с UN1) См. пример 4, таблицу 3, фигуру 4, пример 5, пример

		11, фигуры 14А-14С, фигура 39А-В, фигура 40А-В
Связывание с опухолеассоциированными макрофагами (ТАМ) и лимфоциты	Нет <i>de Laurentiis et al., Molecular & Cellular Proteomics</i> 10:1-12, 2011); фиг. 9.	Да См. пример 4, пример 11, таблицу 3, фигуры 4 и 5А-5В; пример 5, фигуры 14А-С
Связывание с фетальными тканями	Да (Tassone <i>et al., Tissue Antigens</i> 44:73-82; Tassone <i>et al., Int. J. Oncology</i> 20:707-711, 2002)	Не описано
Антителозависимая клеточная цитотоксичность (ADCC) в отношении линии клеток НРВ-ALL	Да (Tuccillo <i>et al., Mol. Cancer Ther.</i> 13(3), 2014).	Да Пример 17
Профили проточной цитометрии в линиях клеток гемопоэтического ростка	Связывается с MOLT-4, СЕМ и НРВ-ALL, но не Jurkat (Tassone <i>et al., Tissue Antigens</i> 44:73-82, 1994)	Связывается с MOLT-4, СЕМ и НРВ-ALL, но не Jurkat, но аффинность к клеткам СЕМ отличалась Пример 8

6.17.17. Пример 16: ch-UMG1 - конструирование химерного антитела, имеющего специфичность связывания UMG1

[00388] Химерное антитело со специфичностью связывания UMG1 (ch-UMG1) конструировали стандартными способами посредством слияния VH UMG1 мыши (SEQ ID NO: 34) с константной областью VH человека и VL UMG1 мыши (SEQ ID NO: 35) с константной областью легкой цепи человека.

6.17.18. Пример 17: ch-UMG1 - ch-UMG1 индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза/лимфобластной лимфомы

[00389] Для определения потенциальной активности mAb ch-UMG1 в качестве иммунотерапевтического инструмента тестировали его способность индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении двух линий клеток, которые, как показано в примере 3, экспрессируют эпитоп UMG1.

[00390] РВМС здоровых доноров (эффektorные клетки) сокультивировали с линией клеток Т-ALL НРВ-ALL или линией клеток Т-клеточной лимфомы Н9 (клетками-мишенями) в присутствии разных концентраций ch-UMG1 следующим образом.

[00391] **Способы:** 4×10^4 клеток-мишеней высевали в 96-луночный круглодонный планшет и культивировали в течение 30 минут при 37°C и 5% CO_2 в присутствии разных концентраций mAb ch-UMG1 (0, 10, 50, 100, 200 мкг/мл) или химерного IgG1 отрицательного или положительного контроля (NC и PC, соответственно, по 200 мкг/мл каждого) в наиболее высокой дозе (200 мкг/мл). Затем $0,4 \times 10^6$ РВМС (фиксированное соотношение E:T=10:1) от того же донора добавляли в каждую лунку вместе с 20 мкл/мл PE-конъюгированного mAb против CD107a (Becton Dickinson), а затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 3 ч. Через 1 ч. в каждую лунку добавляли 6 мкг/мл монензина (GolgiStop, BD). В конце периода инкубации клетки окрашивали с помощью APC-конъюгированного антитела против CD56 и PerCp-конъюгированного антитела против CD3 и анализировали посредством FACS с использованием проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific).

[00392] **Результаты:** Обнаруживали, что $\text{CD3}^+/\text{CD56}^+/\text{CD107a}^+$ клетки значительно повышались в соответствии с концентрацией антитела ch-UMG1, что подтверждает потенциал антитела ch-UMG1 в качестве индуктора ADCC (фиг. 6A-6B).

[00393] Химерное mAb ch-UMG1 является активным иммунотерапевтическим инструментом в случае острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза/лимфобластной лимфомы. Эти данные позволяют создавать подходы иммунного таргетинга, представляющие собой неотложную и неудовлетворенную клиническую потребность в случае острого Т-клеточного лимфобластного лейкоза/лимфобластной лимфомы.

6.17.19. Пример 18: ch-UMG1 - ch-UMG1 индуцирует антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток макроглобулинемии Вальденстрема

[00394] Для дальнейшего исследования иммунотерапевтического потенциала антитела ch-UMG1 оценивали его способность индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в отношении клеток макроглобулинемии Вальденстрема.

[00395] **Способы:** Авторы настоящего изобретения осуществляли анализ дегрануляции посредством сокультивирования очищенных НК-клеток здоровых доноров (эффektorных клеток) и линии клеток BCWM.1 (клеток-мишеней) в присутствии разных концентраций антитела ch-UMG1 или отрицательных/положительных контролей. Авторы настоящего изобретения выбирали mAb цетуксимаб в качестве отрицательного контроля и mAb ритуксимаб в качестве положительного контроля.

[00396] В частности, 10^5 клеток-мишеней высевали в 96-луночный круглодонный планшет и культивировали в течение 30 минут при 37°C и 5% CO_2 в присутствии разных концентраций антитела ch-UMG1 (0, 10, 50, 100, 200 мкг/мл), 200 мкг/мл цетуксимаба или 200 мкг/мл ритуксимаба. Затем в каждую лунку добавляли 10^5 НК-клеток (фиксированное соотношение E:T=1:1) от того же донора вместе с 20 мкл/мл PE-конъюгированного mAb против CD107a (BD), а затем клетки инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение 2 ч. Через 1 ч. в каждую лунку добавляли 6 мкг/мл монензина (GolgiStop, BD). В конце периода

инкубации клетки окрашивали с помощью APC-конъюгированного антитела против CD56 и PerCp-конъюгированного антитела против CD3 и анализировали с помощью проточного цитометра ATTUNE NxT (THERMO Scientific).

[00397] **Результаты:** Обнаруживали, что CD3⁺/CD56⁺/CD107a⁺ клетки значительно повышались в соответствии с концентрациями антитела ch-UMG1, достигая точно того же эффекта, которого достигали с использованием ритуксимаба. Эти результаты подтверждали потенциал антитела ch-UMG1 в качестве индуктора ADCC (фигура 7). Химерное mAb ch-UMG1 является активным иммунотерапевтическим инструментом в случае макроглобулинемии Вальденстрема.

6.17.20. Пример 19: h-UMG1 - конструирование гуманизированных моноклональных антител UMG1

[00398] Гуманизированные антитела UMG1 конструировали с использованием комбинации тяжелой цепи человека SEQ ID NO: 8 с SEQ ID NO: 11 и легкой цепи человека SEQ ID NO: 13 с SEQ ID NO: 16, приведенными в настоящем описании.

[00399] Экспрессию и очистку антител осуществляли следующим образом: соответствующую кДНК антител клонировали в векторную систему общепринятыми способами клонирования (не на основе ПЦР). Синтезировали векторные плазмиды. Плазмидную ДНК получали в условиях с низким содержанием эндотоксина на основе анионообменной хроматографии. Концентрацию ДНК определяли посредством измерения поглощения при длине волны 260 нм. Правильность последовательностей проверяли посредством секвенирования по Сэнгеру (с использованием до двух реакций секвенирования на плазмиду в зависимости от размера кДНК).

[00400] Для продуцирования использовали адаптированные к суспензионной культуре клетки CHO K1 (исходно полученные из ATCC и адаптированные к бессывороточному росту в суспензионной культуре). В случае афукозилированного антитела (a-h-UMG1) использовали технологию GlymaxX (ProBioGen), и транзитивно экспрессировали его в клетках CHO (Evetria). Посевной материал выращивали в бессывороточной среде с определенным химическим составом без компонентов животного происхождения. Клетки трансфицировали с использованием сделанного на заказ, запатентованного реагента для трансфекции и выращивали клетки после трансфекции в бессывороточной среде без компонентов животного происхождения.

[00401] Супернатант собирали посредством центрифугирования и последующей фильтрации (фильтр 0,2 мкм). Антитело очищали с использованием MabSelect™ SuRe™. Чистоту определяли посредством аналитической эксклюзионной хроматографии с использованием колонки Agilent AdvanceBio SEC (300 Å, 2,7 мкм, 7,8×300 мм) и DPBS в качестве подвижного буфера при 0,8 мл/мин.

[00402] Содержание эндотоксина измеряли с помощью системы Charles River Endosafe PTS. Титры измеряли с помощью биосенсоров ForteBio с протеином А (кинетический анализ) и вычисляли на основе стандартов IgG1 человека.

[00403] Предполагаемые антитела h-UMG1 (сконструированные, как описано в примере 19) тестировали на их аффинность к линиям клеток HPB-ALL и H9, которые, как известно, положительны на эпитоп UMG1.

[00404] **Способы:** Получали четыре гуманизированных варианта тяжелой цепи (H 1-4) и четыре гуманизированных варианта легкой цепи (L 1-4), идентифицируя определяющие комплементарность области (CDR) мыши и пересаживая CDR на каркас антитела человека, заменяя выбранные остатки в ближайшей последовательности каркасных областей человека зародышевой линии, с целью сохранения потенциально структурно важных остатков в соответствующих последовательностях мыши. Конструировали 16 гуманизированных антител, комбинируя каждую из четырех гуманизированных тяжелых цепей (SEQ ID NO: 8-11) с каждой из четырех гуманизированных легких цепей (SEQ ID NO: 13-16). Изотип IgG1 использовали для всех вариантов тяжелой цепи.

[00405] Кроме того, получали 8 гибридных вариантов CHL(1-4) и H(1-4)CL. 8 гибридных вариантов включают 4 с тяжелой цепью мыши и легкой цепью человека, выбранной из L1-4 (SEQ NO: 13-16), и 4 с легкой цепью мыши и тяжелой цепью человека, выбранной из H1-4 (SEQ NO: 8-11).

[00406] Рекомбинантные гены помещали в векторную плазмиду Evitria и с помощью нее трансфицировали (с использованием eviFect, Evitria) клетки CHO K1. После трансфекции клетки выращивали в бессывороточной среде без компонентов животного происхождения (eviMake2, Evitria). Супернатант собирали посредством центрифугирования, а затем стерилизовали посредством фильтрации (фильтр 0,2 мкм).

6.17.21. Пример 20: h-UMG1 - скрининг антител h-UMG1 на связывание с линиями клеток HPB-ALL и H9

[00407] **Селекция:** Каждое из гуманизированных антител подвергали скринингу на аффинность к мишени (оцениваемую по средней интенсивности флуоресценции, MFI) на 2 разных линиях клеток (HPB-ALL и H9) и сравнивали со связыванием химерных (ch-UMG1) и гибридных mAb посредством проточной цитометрии (Attune NxT, Thermo Scientific). Каждый скрининг осуществляли дважды, всего в 4 параллелях. Все тесты осуществляли в тех же условиях: все mAb использовали в конечной концентрации 1 мкг/мл; ритуксимаб (Roche) использовали в качестве IgG1 отрицательного контроля; FITC-конъюгированное антитело мыши против IgG человека (BD Biosciences) использовали в качестве вторичного mAb.

[00408] **Результаты:** Все оцениваемые антитела могли связываться с мишенью по меньшей мере с той же аффинностью, что и химерное mAb (ch-UMG1). См. фигуру 16. Одно гуманизированное антитело (H3-L4) достигало наибольшей MFI при скрининге, и его выбирали для дальнейшей разработки под названием UMG1. См. фигуру 16.

6.17.22. Пример 21: h-UMG1 - уменьшение опухолей HPB-ALL в модели на мышях NSG под действием гуманизированного UMG1 (h-UMG1) и афукозилированного h-UMG1 (a-h-UMG1)

[00409] В этом примере описаны кривые объема опухоли в эксперименте *in vivo*, где сравнивали контрольный IgG1 с гуманизированной версией UMG1-mAb (h-UMG1) и афукозилированной версией UMG1-mAb (a-h-UMG1).

[00410] **Способы:** В этом эксперименте 15 мышам NOD-SCID-g-chain-null (NSG) подкожно пересаживали 5×10^6 клеток НРВ-ALL. Затем мышей рандомизировали для еженедельного интраперитонеального введения 15 мг/кг контрольного IgG1, h-UMG1 или a-h-UMG1, начиная со дня 1 до гибели, достижения объема опухоли $>2000 \text{ мм}^3$ или неприемлемой токсичности. Объем опухоли оценивали через день, и средний объем опухоли для каждой исследуемой группы в каждый момент времени приведен и обобщен на фигуре 11.

[00411] **Результаты:** Начиная со дня 29, когорты, которым вводили антитело h-UMG1 (линия с квадратами) и антитело a-h-UMG1 (линия с треугольниками) демонстрировали значительно сниженную опухолевую нагрузку по сравнению с когортой, которой вводили контрольный IgG1 (линия с кругами). См. фигуру 11. Эти результаты позволяют предполагать, что оба антитела имеют сильную противоопухолевую активность.

6.17.23. Пример 22: CAR-UMG1 - Т-клетки с UMG1-нацеленным химерным антигенным рецептором (CAR-UMG1) индуцируют активацию Т-клеток в присутствии клеток Н9

[00412] Для дальнейшего улучшения потенциала антитела UMG1 в качестве иммунотерапевтического инструмента разрабатывали CAR третьего поколения.

[00413] **Способы:** CAR третьего поколения конструировали посредством соединения внеклеточного домена, состоящего из scFv, полученного из последовательности антитела UMG1 (SEQ ID NO: 7 для тяжелой цепи и SEQ ID NO: 12 для легкой цепи), с внутриклеточной областью, состоящей из цепи CD3 ζ (сигнальной областью TCR), и двумя костимуляторными доменами, CD28 и 4-1BB, таким образом, имитируя физиологическую активацию Т-клеток. Карта конструкции CAR приведена на фигуре 20 (кольцевая карта) и полная последовательность конструкции CAR приведена в SEQ ID NO: 41.

[00414] Конструкцию клонировали как кассету CAR в лентивирусный вектор (Qin DY et al., *Anticancer Drugs*. 2016 Sep;27(8):711-22). Затем вирусные частицы использовали для трансдукции CD3⁺ лимфоцитов здоровых доноров при множественности заражения (MOI) 5 и оценивали эффективность трансдукции посредством проточной цитометрии (приблизительно 38%). Эти CAR-Т-клетки оценивали на их способность высвобождать ИФН γ и ИЛ-2 в присутствии клеток-мишеней и их способность к селективной цитотоксичности.

[00415] **Результаты:** Как показано на фигуре 8 и фигуре 9, CAR-UMG1 могли высвобождать значимо более высокие количества интерферона гамма (ИФН γ) и интерлейкина 2 (ИЛ-2) только в присутствии клеток Т-клеточной лимфомы Н9. Кроме того, только CAR-UMG1 могли индуцировать селективное уничтожение клеток Н9 (см. фигуру

10). Эти результаты свидетельствуют о способности CAR-UMG1 распознавать клетки H9 и индуцировать активацию Т-клеток.

[00416] Химерный антигенный рецептор CAR-UMG1 индуцирует значительную цитотоксичность в отношении клеток, экспрессирующих эпитоп UMG1.

6.17.24. Пример 23: Биспецифическое антитело UMG1-CD3

[00417] Для тестирования специфичности биспецифического антитела UMG1-CD3 и его способности перенаправлять цитотоксичность Т-клеток на UMG1-положительные клетки осуществляли анализы с использованием линии клеток KE37, экспрессирующей эпитоп UMG1 CD43, но отрицательной по CD3 (UMG1⁺, CD3⁻), и линии клеток ALL-SIL, отрицательной по антигенам UMG1 и CD3 (UMG1⁻, CD3⁻).

[00418] **Способы:** Конструкцию UMG1-CD3, содержащую SEQ ID NO: 40, использовали для получения биспецифического антитела UMG1-CD3. Перенаправленную цитотоксичность Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии с использованием PBMC (мононуклеарных клеток периферической крови) человека, линии клеток KE37 (UMG1⁺, CD3⁻) и линии клеток ALL-SIL (UMG1⁻, CD3⁻).

[00419] Увеличивающиеся концентрации биспецифического антитела UMG1-CD3 инкубировали с CFSE (Invitrogen)-мечеными клетками-мишенями, а также эффекторными клетками в соотношении PBMC E:Т-клеток 10:1 или 20:1. Лизис клеток оценивали после 72-часовой обработки посредством проточной цитометрии как утрату целостности мембраны клеток-мишеней, которую отражает ядерный захват 7AAD.

[00420] Типичные изображения FACS из экспериментов с использованием 1 мкг/мл биспецифического антитела UMG1-CD3 и соотношений E:Т-клеток 20:1 показаны на фиг. 18А-18В.

[00421] **Результаты:** Повышенное уничтожение наблюдали в обеих линиях клеток, KE37 (см. фиг. 18А) и ALL-SIL (см. фиг. 18В), обработанных биспецифическим антителом UMG1-CD3, по сравнению с необработанными клетками (указанными как NT).

[00422] Кроме того, линия клеток KE37, экспрессирующая антиген UMG1, демонстрировала более высокую гибель клеток, ~86% анализируемой популяции клеток, в то время как линия клеток ALL-SIL, неэкспрессирующая антиген UMG1, имела более низкий % гибели клеток, ~22% анализируемой популяции клеток. Эти результаты свидетельствуют о том, что уничтожение Т-клеток можно направлять на UMG1⁺ клетки с использованием биспецифического антитела UMG1-CD3. См. фиг. 18А-18В.

6.17.25. Пример 24: Связывающая активность биспецифического антитела UMG1-CD3

[00423] В этом примере тестируют связывание биспецифического антитела UMG1-CD3 с использованием линии клеток KE37 (UMG1⁺, CD3⁻), клеток CCRF-CEM (UMG1⁻, CD3⁺) и линии клеток Jurkat (UMG1⁻, CD3⁺).

[00424] **Способы:** Связывающую активность анализировали посредством проточной цитометрии с использованием линии клеток KE37 (UMG1⁺, CD3⁻), клеток CCRF-CEM (UMG1⁻, CD3⁺) и линии клеток Jurkat (UMG1⁻, CD3⁺).

[00425] Линии клеток T-ALL инкубировали с увеличивающимися концентрациями биспецифического антитела UMG1-CD3 в течение 20 минут. После двух промывок 1-кратным PBS, pH 7,4 (Gibco, 10010-015) (5 мин, RT, 1300 об./мин.), использовали AF647-конъюгированное антитело против IgG человека (PE) для окрашивания клеток T-ALL в течение 20 минут. После двух промывок 1-кратным PBS, pH 7,4 (Gibco, 10010-015) (5 мин, RT, 1300 об./мин.), оценивали связывающую активность посредством проточной цитометрии как процент PE-положительных клеток среди обработанных клеток по сравнению с отрицательным контролем.

[00426] **Результаты:** Как показано на фиг. 32, связывание биспецифического антитела UMG1-CD3 достигало максимального уровня в случае KE37 в концентрации 0,001 мкг/мл, в то время как в случае клеток CCRF-CEM наблюдали более ступенчатое связывание, где 90% связывания достигали при концентрации 10 мкг/мл. В отличие от этого, в экспериментальных условиях в случае клеток Jurkat во всех тестируемых концентрациях наблюдали очень низкое связывание биспецифического антитела UMG1-CD3. Результаты свидетельствуют о том, что биспецифическое антитело UMG1-CD3 может связываться с UMG1⁺ или CD3⁺ клетками. Результаты также позволяют предполагать более высокую аффинность биспецифического антитела UMG1-CD3 к UMG1, чем к CD3.

6.17.26. Пример 25: Биспецифическое антитело UMG1-CD3 опосредовало цитотоксичность Т-клеток в отношении клеток Т-ALL

[00427] В этом примере тестируют эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линий клеток T-ALL и полученных от пациента, первичных клеток T-ALL.

[00428] **Способы:** Конструкцию UMG1-CD3, содержащую SEQ ID NO: 40, использовали для получения биспецифического антитела UMG1-CD3. Перенаправленную цитотоксичность Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии с использованием PBMC (мононуклеарных клеток периферической крови) человека и панели линий клеток T-ALL и первичных бластов T-ALL.

[00429] Увеличивающиеся концентрации биспецифического антитела UMG1-CD3 инкубировали с Far-Red (Invitrogen)-мечеными клетками-мишенями, а также эффекторными клетками при разных соотношениях PBMC E:Т-клеток 1:1, 5:1, 10:1 или 20:1. После 48-часовой инкубации смесь клеток анализировали посредством проточной цитометрии на утрату целостности мембран клеток-мишеней, которую отражает ядерный захват 7AAD (BD Pharmingen).

[00430] **Результаты:** Повышенное уничтожение наблюдали, в основном, в UMG1-положительных клетках после обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 по сравнению с необработанными клетками (фиг. 21А-21В; фиг. 22А-22С). Кроме того, клетки CCRF-CEM (см. фиг. 21А и фиг. 22А), линия клеток KE37 (см. фиг. 22В) и бласты T-ALL EGILIII (см. фиг. 21В), экспрессирующие антиген UMG1, демонстрировали более высокую гибель клеток (от 80 до 95%) в анализируемой популяции клеток, в то время как линия

клеток ALL-SIL, неэкспрессирующая антиген UMG1, демонстрировала более низкую гибель клеток (10%) в анализируемой популяции клеток (см. фиг. 22С).

6.17.27. Пример 26: Биспецифическое антитело UMG1-CD3 - подтверждение опосредованной биспецифическим антителом UMG1-CD3 цитотоксичности Т-клеток в отношении клеток Т-ALL

[00431] Линии клеток Т-ALL сокультивировали с тотальными РВМС человека или РВМС, истощенными в отношении CD8⁺ Т-клеток или CD4⁺ Т-клеток с помощью иммуномагнитных частиц.

[00432] **Способы:** Перенаправленную цитотоксичность Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии с использованием тотальных РВМС человека или РВМС, истощенными в отношении CD8⁺ Т-клеток или CD4⁺ Т-клеток с помощью иммуномагнитных частиц (магнитных частиц Miltenyi), и линии клеток CCRF-CEM.

[00433] Биспецифическое антитело UMG1-CD3 (1 мкг/мл) инкубировали с Far-Red (Invitrogen)-мечеными клетками-мишенями, а также эффекторными клетками при соотношении РВМС Е:Т-клеток 10:1. После 48-часовой инкубации смесь клеток анализировали посредством проточной цитометрии на утрату целостности мембраны клеток-мишеней, которую отражает ядерный захват 7AAD (BD Pharmingen).

[00434] **Результаты:** Наблюдали сниженную цитотоксичность клеток-мишеней в истощенном образце по сравнению с тотальными РВМС, что, таким образом, подтверждает опосредованную Т-клетками активность цитотоксичности биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении клеток Т-ALL (см. фиг. 24).

6.17.28. Пример 27: Биспецифическое антитело UMG1-CD3 индуцировало апоптоз в линии клеток Т-ALL

[00435] В этом примере показана способность биспецифического антитела UMG1-CD3 индуцировать апоптоз в линии клеток Т-ALL.

[00436] **Способы:** Апоптоз оценивали посредством проточной цитометрии с использованием РВМС (мононуклеарных клеток периферической крови) человека и клеток CCRF-CEM.

[00437] Увеличивающиеся концентрации биспецифического антитела UMG1-CD3 инкубировали с Far-Red (Invitrogen)-мечеными клетками-мишенями, а также эффекторными клетками при соотношении РВМС Е:Т-клеток 10:1. Апоптоз оценивали после 24-часовой обработки посредством проточной цитометрии как процент аннексин-положительных клеток среди клеток-мишеней.

[00438] **Результаты:** Повышенный показатель апоптоза наблюдали после обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 дозозависимым образом (см. фиг. 23).

6.17.29. Пример 28: Биспецифическое антитело UMG1-CD3 индуцировало активацию РВМС

[00439] В этом примере тестировали способность биспецифического антитела UMG1-CD3 индуцировать активацию РВМС посредством вовлечения CD3-положительных Т-клеток.

[00440] **Способы:** Перенаправленную цитотоксичность Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии с использованием РВМС (мононуклеарных клеток периферической крови) человека от разных здоровых доноров.

[00441] Увеличивающиеся концентрации биспецифического антитела UMG1-CD3 инкубировали с CFSE (Invitrogen)-мечеными РВМС. Пролиферацию клеток оценивали после 96-часовой обработки Cell-Titer Glo (Promega) и проточной цитометрии. Активацию РВМС оценивали посредством проточной цитометрии CD69- и CD25-положительных клеток среди CD4⁺ и CD8⁺ клеток после 24-часовой обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 или отрицательным контролем. Экспрессию белка фосфо-NFκB-p65 (A-8, Santa Cruz) также оценивали посредством вестерн-блоттинга через 96 часов после обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 РВМС в отдельности или CCRF-CEM в отдельности. Высвобождение цитокинов оценивали после 4 часов инкубации РВМС с брэфелдином А (Santa Cruz) как положительный результат на внутриклеточный ИФНγ и ФНОα (BD Pharmingen) в CD4⁺ и CD8⁺ клетках через 24 ч. после обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3.

[00442] **Результаты:** Обработка биспецифическим антителом UMG1-CD3 повышала пролиферацию РВМС (фиг. 25 и фиг. 26А-26В). Наблюдали положительную регуляцию раннего и позднего маркеров активации Т-клеток CD25 и CD69 на Т-клетках в присутствии биспецифического антитела UMG1-CD3 по сравнению с отрицательным контролем (NC) (фиг. 27А-27В). Активация, индуцированная биспецифическим антителом UMG1-CD3, приводила к повышению высвобождения ИФНγ и ФНОα и пролиферации Т-клеток (фиг. 28А-28D). Путь NFκB активировался обработкой биспецифическим антителом UMG1-CD3 только в РВМС, но не в линии клеток CCRF-CEM (фиг. 29). Известно, что путь NFκB конститутивно активирован в линии клеток CCRF-CEM.

6.17.30. Пример 29: Биспецифическое антитело UMG1-CD3 - эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линий клеток множественной миеломы

[00443] Эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 оценивали с помощью трех разных линий клеток миеломы.

[00444] **Способы:** Перенаправленную цитотоксичность Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии с использованием РВМС (мононуклеарных клеток периферической крови) человека и линий клеток множественной миеломы (ММ). Тестировали две UMG1-положительные линии клеток ММ (H929, Kms26) и одну отрицательную по эпитопу-мишени UMG1 линию клеток (Delta 47).

[00445] Биспецифическое антитело UMG1-CD3 (1 мкг/мл) инкубировали с Far-Red (Invitrogen)-мечеными клетками-мишенями, а также эффекторными клетками при соотношении РВМС Е:Т-клеток 10:1. После 48-часовой обработки смесь клеток анализировали посредством проточной цитометрии на утрату целостности мембран клеток-мишеней, которую отражает ядерный захват 7AAD (BD Pharmingen).

[00446] **Результаты:** Повышенное уничтожение наблюдали, в основном, в UMG1-положительных клетках после обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 по сравнению с необработанными клетками (указанными как NC, отрицательный контроль). Кроме того, UMG1-положительные клетки H929 и Kms26 демонстрировали от 80 до 95% гибели клеток (фиг. 30A-30D), в то время как линия клеток delta47, неэкспрессирующая антиген UMG1, демонстрировала 10% гибели клеток (фиг. 30E-30F).

6.17.31. Пример 30: Биспецифическое антитело UMG1-CD3 - эффективность *in vitro* биспецифического антитела UMG1-CD3 в отношении линии клеток рака яичка (семиномы)

[00447] Эффективность биспецифического антитела UMG1-CD3 оценивали в отношении линии клеток рака яичка (семиномы).

[00448] **Способы:** Перенаправленную цитотоксичность Т-клеток анализировали посредством проточной цитометрии с использованием РВМС (моноклеарных клеток периферической крови) человека и линии клеток семиномы. В частности, тестировали положительную по эпитопу UMG1 линию клеток семиномы TCAM2.

[00449] Биспецифическое антитело UMG1-CD3 (1 мкг/мл) инкубировали с Far-Red (Invitrogen)-мечеными клетками-мишенями, а также эффекторными клетками при соотношении РВМС Е:Т-клеток 10:1. После 48-часовой обработки смесь клеток анализировали посредством проточной цитометрии на утрату целостности мембран клеток-мишеней, которую отражает ядерный захват 7AAD (BD Pharmingen). Второй эксперимент осуществляли с использованием схожих условий, но добавляя группу, обработанную а-mAb h-UMG1 (15 мг/кг) и анализируя смесь клеток после 24-часовой обработки посредством проточной цитометрии на утрату целостности мембран клеток-мишеней, которую отражает ядерный захват 7AAD (BD Pharmingen).

[00450] **Результаты:** Наблюдали значительное уничтожение клеток TCAM2 после 48-часовой обработки биспецифическим антителом UMG1-CD3 по сравнению с необработанными клетками (фиг. 31A-31B). Биспецифическое антитело UMG1-CD3 демонстрировало повышенное уничтожение клеток после 24-часовой обработки по сравнению с а-mAb h-UMG1 (фиг. 31C).

6.18. ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

CDR1 тяжелой цепи UMG1 [SEQ ID NO:1]:

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His

CDR2 тяжелой цепи UMG1 [SEQ ID NO:2]:

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Gly Asn Phe Tyr Tyr Val Asp Thr Val Lys

CDR3 тяжелой цепи UMG1 [SEQ ID NO:3]:

Ser Thr Tyr Tyr His Gly Ser Arg Gly Ala Met Asp Tyr

CDR1 легкой цепи UMG1 [SEQ ID NO:4]:

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Met Tyr Trp Tyr

CDR2 легкой цепи UMG1 [SEQ ID NO:5]:

Asp Thr Ser Lys Met Ala Ser

CDR3 легкой цепи UMG1 [SEQ ID NO:6]:

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ile Thr

VH UMG1 (мышь) (клон IGHV5-17*02) [SEQ ID NO: 7]:

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSVCASSGFTFSSFGMHWVVRQAPEKGLEWVAYISSG
SGNFYYVDIVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARSTYYHGSRGAMDYWGQ
 GTSVTVSS

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации зародышевой линии выделены полужирным шрифтом

V является A в зародышевой линии

Гуманизированный VH1 (клон IGHV3-48*01) [SEQ ID NO: 8]:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASSGFTFSSFGMHWVVRQAPGKGLEWVSYISSG
SGNFYYVDIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWG
 QGTLVTVSS

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

Гуманизированный VH2 (клон IGHV3-48*01 с обратной мутацией в зародышевой линии) [SEQ ID NO: 9]:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASSGFTFSSFGMHWVVRQAPGKGLEWVSYISSG
SGNFYYVDIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWG
 QGTLVTVSS

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

Гуманизированный VH3 (клон IGHV1-48*01 с обратной мутацией в зародышевой линии и консервативными остатками, фланкирующими CDR) [SEQ ID NO: 10]:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASSGFTFSSFGMHWVVRQAPGKGLEWVAYISSG
SGNFYYVDIVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWG
 QGTLVTVSS

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

Гуманизированный VH4 (клон IGHV3-30*02 с обратной мутацией в зародышевой линии) [SEQ ID NO: 11]:

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCVASSGFTFSSFGMHWVVRQAPGKGLEWVAYISSG
GSGNFYYVDIVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYWG
 GQGTLVTVSS

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

VL UMG1 (мыши, каппа) (клон IG IGKV4-55*01) [SEQ ID NO: 12]:

QIALTQSPA~~IM~~SASPGEKVTMTCSSASSSVSSMYWYQLKPGSSPRLLIYDTSKMASGV
PIRFSGSGSGTDFSLTVSRVEAEDAATYYCQOWSSYPPIIFGAGSKLELK

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации зародышевой линии выделены полужирным шрифтом

A является V в зародышевой линии

L является Q в зародышевой линии

I является V в зародышевой линии

F является Y в зародышевой линии

V является I в зародышевой линии

V является M в зародышевой линии

Гуманизированный VL1 (клон IGKV3D-20*01) [SEQ ID NO: 13]:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSMYWYQKPGGLAPRLLIYDTSKMASGI
PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQOWSSYPPIIFGQGTRLEIK

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

Гуманизированный VL2 (IGKV3D-20*01 с обратной мутацией в зародышевой линии) [SEQ ID NO: 14]:

EIALTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSSMYWYQLKPGGLAPRLLIYDTSKMASGI
PIRFSGSGSGTDFTLTVSRVEPEDFAVYYCQOWSSYPPIIFGQGTRLEIK

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

Гуманизированный VL3 (клон IGKV6D-41*01) [SEQ ID NO: 15]:

QVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSSASSSVSSMYWYQKPDQAPKLLIYDTSKMAS
GVPSRFSGSGSGTDFTFITISSLEAEDAATYYCQOWSSYPPIIFGGGGTKVEIK

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

Гуманизированный VL4 (клон IGKV6D-41*01 с частичной обратной мутацией зародышевой линии) [SEQ ID NO: 16]:

QVVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCSSASSSVSSMYWYQLKPDQAPKLLIYDTSKMAS
GVPIRFSGSGSGTDFTFVSSVEAEDAATYYCQOWSSYPPIIFGGGGTKVEIK

CDR подчеркнуты и выделены курсивом

Мутации относительно исходной последовательности мыши выделены полужирным шрифтом

клон #1 CD43 (CD43 дикого типа из 400 аминокислот) [SEQ ID NO: 17]:

MATLLLLLGVLVVSPDALGTTAVQTPTS~~GE~~PLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKAD
STGDQTSALPPSTSINEGSPLWTSIGASTGSPLPEPTTYQEVSIKMSSVPQETPHATSHPAV

PITANSLGSHTVTGGTITTNPETSSRTSGAPVTTAASSLETSRGTS GPPLTMATVSLETSK
 GTS GPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTNA
 STVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVLVALLLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNG
 VVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKGSGFPDGE GSSRRPTLTTFGRRKSRQGS
 AMEELKSGSGPSLKGEEEEPLVASEDGAVDAPAPDEPEGGDGAAP

Клон #2 CD43 (укороченный CD43) (аминокислоты 31-400) [SEQ ID NO: 18]:

EPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKADSTGDQTSALPPSTSINEGSPLWTSIGASTGSP
 LPEPTYQEVS IKMSSVPQETPHATSHPAVPITANSLGSHTVTGGTITTNPETSSRTSGAP
 VTTAASSLETSRGTS GPPLTMATVSLETSKGTSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGS
 LEPSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTNASTVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVL
 VALLLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNGVVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDK
 GSGFPDGE GSSRRPTLTTFGRRKSRQGS LAMEELKSGSGPSLKGEEEEPLVASEDGAVDA
 PAPDEPEGGDGAAP

Клон #3 CD43, укороченный CD43 (аминокислоты 41-400) [SEQ ID NO: 19]:

QTSALPPSTSINEGSPLWTSIGASTGSPLPEPTYQEVS IKMSSVPQETPHATSHPA
 VPITANSLGSHTVTGGTITTNPETSSRTSGAPVTTAASSLETSRGTS GPPLTMATVSLETS
 KGTSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTN
 ASTVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVLVALLLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNG
 VVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKGSGFPDGE GSSRRPTLTTFGRRKSRQGS
 LAMEELKSGSGPSLKGEEEEPLVASEDGAVDAPAPDEPEGGDGAAP

Клон #4 CD43, укороченный CD43 (аминокислоты 61-400) [SEQ ID NO: 20]:

QTSALPPSTSINEGSPLWTSIGASTGSPLPEPTYQEVS IKMSSVPQETPHATSHPA
 VPITANSLGSHTVTGGTITTNPETSSRTSGAPVTTAASSLETSRGTS GPPLTMATVSLETS
 KGTSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTN
 ASTVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVLVALLLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNG
 VVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKGSGFPDGE GSSRRPTLTTFGRRKSRQGS
 LAMEELKSGSGPSLKGEEEEPLVASEDGAVDAPAPDEPEGGDGAAP

Клон #5 CD43, укороченный CD43 (аминокислоты 91-400) [SEQ ID NO: 21]:

EPTYQEVS IKMSSVPQETPHATSHPAVPITANSLGSHTVTGGTITTNPETSSRTS
 GAPVTTAASSLETSRGTS GPPLTMATVSLETSKGTSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTM
 TTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTNASTVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLA
 VIVLVALLLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNGVVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSG
 GDKGSGFPDGE GSSRRPTLTTFGRRKSRQGS LAMEELKSGSGPSLKGEEEEPLVASEDGA
 VDAVDAPAPDEPEGGDGAAP

Клон #6 CD43, делеция аминокислот 64-78 [SEQ ID NO: 22]:

MATLLLLLVVSPDALGSTTAVQTPTS GEPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKAD
 STGDQTSIGASTGSPLPEPTYQEVS IKMSSVPQETPHATSHPAVPITANSLGSHTVTG
 GTITTNPETSSRTSGAPVTTAASSLETSRGTS GPPLTMATVSLETSKGTSGPPVTMATDS
 LETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTNASTVPFRNPDENSR
 GMLPVAVLVALLAVIVLVALLLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNGVVDAWAGPAQV

PEEGAVTVTVGGSGGDKGSGFPDGE GSSRRPTLTFFGRRKSRQGS LAMEELKSGSGPS
LKGEEELVASEDGA VDAPAPDEPEGGDGAAP

Клон #7 CD43, делеция аминокислоты 69 (O-участок гликозилирования для GalNac)

[SEQ ID NO: 23]:

MATLLLLLGVLVVSPDALGTTAVQTPTS GEPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKAD
STGDQTSALPPSSINEGSPLWTSIGASTGSPLPEPTYQE VSIKMSSVPQETPHATSHPAVP
ITANSLGSHVTVTGGTITTNPETSSRTSGAPVTTAASSLETSRGTSGPPLTMATVSLET SKG
TSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTNAS
TVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVLVALLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNGV
VDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKGSGFPDGE GSSRRPTLTFFGRRKSRQGS L
MEELKSGSGPSLKGEEELVASEDGA VDAPAPDEPEGGDGAAP

Клон #8 CD43, замена аминокислоты T69N **[SEQ ID NO: 24]:**

MATLLLLLGVLVVSPDALGTTAVQTPTS GEPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKAD
STGDQTSALPPSNSINEGSPLWTSIGASTGSPLPEPTYQE VSIKMSSVPQETPHATSHPAV
PITANSLGSHVTVTGGTITTNPETSSRTSGAPVTTAASSLETSRGTSGPPLTMATVSLET SK
GTSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPTTSTNA
STVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVLVALLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRNG
VDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKGSGFPDGE GSSRRPTLTFFGRRKSRQGS L
AMEELKSGSGPSLKGEEELVASEDGA VDAPAPDEPEGGDGAAP

Нуклеотидная последовательность полноразмерного CD43 человека **[SEQ ID NO: 25]:**

ATGGCCACGC TTCTCCTTCT CCTTGGGGTG CTGGTGGTAA
GCCCAGACGC TCTGGGGAGC ACAACAGCAG TGCAGACACC
CACCTCCGGA GAGCCTTTGG TCTCTACTAG CGAGCCCCTG
AGCTCAAAGA TGTACACCAC TTCAATAACA AGTGACCCTA
AGGCCGACAG CACTGGGGAC CAGACCTCAG CCCTACCTCC
CTCAACTTCC ATCAATGAGG GATCCCCTCT TTGGACTTCC
ATTGGTGCCA GCACTGGTTC CCCTTTACCT GAGCCAACAA
CCTACCAGGA AGTTTCCATC AAGATGTCAT CAGTGCCCCA
GGAAACCCCT CATGCAACCA GTCATCCTGC TGTGCCATA
ACAGCAAAC TCTAGGATC CCACACCGTG ACAGGTGGAA
CCATAACAAC GAACTCTCCA GAAACCTCCA GTAGGACCAG
TGGAGCCCCT GTTACCACGG CAGCTAGCTC TCTGGAGACC
TCCAGAGGCA CCTCTGGACC CCCTCTTACC ATGGCAACTG
TCTCTCTGGA GACTTCCAAA GGCACCTCTG GACCCCCTGT
TACCATGGCA ACTGACTCTC TGGAGACCTC CACTGGGACC
ACTGGACCCC CTGTTACCAT GACAACCTGGC TCTCTGGAGC
CCTCCAGCGG GGCCAGTGGA CCCAGGTCT CTAGCGTAAA
ACTATCTACA ATGATGTCTC CAACGACCTC CACCAACGCA
AGCACTGTGC CCTTCCGGAA CCCAGATGAG AACTCACGAG

GCATGCTGCC AGTGGCTGTG CTTGTGGCCC TGCTGGCGGT
 CATAGTCCTC GTGGCTCTGC TCCTGCTGTG GCGCCGGCGG
 CAGAAGCGGC GGAAGTGGGGC CCTCGTGCTG AGCAGAGGCG
 GCAAGCGTAA CGGGGTGGTG GACGCCTGGG CTGGGCCAGC
 CCAGGTCCCT GAGGAGGGGG CCGTGACAGT GACCGTGGGA
 GGGTCCGGGG GCGACAAGGG CTCTGGGTTC CCCGATGGGG
 AGGGGTCTAG CCGTCGGCCC ACGCTACCA CTTTCTTTGG
 CAGACGGAAG TCTCGCCAGG GCTCCCTGGC GATGGAGGAG
 CTGAAGTCTG GGTCAGGCC CAGCCTCAA GGGGAGGAGG
 AGCCACTGGT GGCCAGTGAG GATGGGGCTG TGGACGCCCC
 AGCTCCTGAT GAGCCCGAAG GGGGAGACGG GGCTGCCCCT
 TAA

Полноразмерный белок CD43 человека [SEQ ID NO: 26]:

MATLLLLLVVSPDALGSTTAVQTPTSGEPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKAD
 STGDQTSALPPSTSINEGSPLWTSIGASTGSPLPEPTYQEVSIMSSVPQETPHATSHPAV
 PITANSLGSHVTGGTITNSPETSRTSGAPVTTAASSLETSGPPLTMATVSLETSK
 GTSGPPVTMATDSLETSTGTTGPPVTMTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPPTSTNA
 STVPFRNPDENSRGMLPVAVLVALLAVIVLVALLLWRRRQKRRTGALVLSRGGKRN
 VVDAWAGPAQVPEEGAVTVTVGGSGGDKSGSPDGEGSSRRPTLTFFGRRKSQGS
 AMEELKSGSGPSLKGEEELVASEDGAVDAPAPDEPEGGDGAAP

Химерная тяжелая цепь UMG1, нуклеиновая кислота (клон NUC 7200_evi-5
 UMG.1.CH-h1.HC) [SEQ ID NO: 27]:

GCGGCCGCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTGACGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCCG
 GTGGCAGCCGAAAGCTGTCTTGCCTCGCTAGTGGTTTACCTTTTCCAGCTTCGGCA
 TGCACTGGGTGAGGCAGGCACCTGAGAAAGGACTGGAATGGGTGCTCCTACATCTCT
 AGTGAAGCGGGAACCTTCTACTATGTGGACACTGTCAAGGGGAGGTTTACCATTTCT
 CGGGATAACCCAAAAAATACTGTTTCTGCAAATGACTTCACTGAGATCCGAAGA
 CACCGCCATGTACTATTGTGCTAGATCAACATACTACCACGGCTCCAGGGGCGCTAT
 GGACTATTGGGGTCAGGGCACCTCTGTGACAGTCTCGAGCGCTAGCACAAAGGGCC
 CTAGTGTGTTTCTCTGGCTCCCTCTTCAAATCCACTTCTGGTGGCACTGCTGCTCT
 GGGATGCCTGGTGAAGGATTACTTTCTGAACCTGTGACTGTCTCATGGAACCTCTGG
 TGCTCTGACTTCTGGTGTCCACACTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGACTGTAC
 TCTCTGTCATCTGTGGTCACTGTGCCCTTTCATCTCTGGGAACCCAGACCTACATTT
 GTAATGTGAACCACAAACCATCCAACACTAAAGTGGACAAAAAAGTGAACCCAAA
 TCCTGTGACAAAACCCACACCTGCCACCTTGTCTGCCCCTGAACTGCTGGGAGGA
 CCTTCTGTGTTTCTGTTCCCCCACAACCAAAGGATACCCTGATGATCTCTAGAACC
 CTGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAGGACCCTGAGGTCAAATTCA
 ACTGGTACGTGGATGGAGTGAAGTCCACAATGCCAAAACCAAGCCTAGAGAGGAA
 CAGTACAATTCAACCTACAGAGTGGTCAGTGTGCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGG

CTGAATGGCAAGGAATACAAGTGTAAGTCTCAAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAAT
 TGAGAAAACAATCTCAAAGGCCAAGGGACAGCCTAGGGAACCCCAGGTCTACACCC
 TGCCACCTTCAAGAGAGGAAATGACCAAAAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTACCCTTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAGTCAAATGGACAGCCTGAG
 AACAACTACAAAACAACCCCCCTGTGCTGGATTCTGATGGCTCTTTCTTTCTGTACT
 CCAAAGTACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAATGTCTTTTCTTGCTCTG
 TCATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACTCAGAAATCCCTGTCTCTGTCTCCCG
 GGAAATGATAGTAAAAGCTT

Химерная легкая цепь UMG1, нуклеиновая кислота (клон NUC 7201_evi-5
 UMG.1.CH-hk.LC) [**SEQ ID NO: 28**]

GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTGAGATCGCCCTGACCCAGAGTCCTGCAATTATGTCAGCCTCCCC
 GGGCGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCTGTCAGTTCAATGTACTG
 GTATCAGCTGAAGCCCGGCTCCTCCCCCAGGCTGCTGATCTACGACACAAGCAAAAT
 GGCATCTGGCGTGCCATTCGGTTCAGCGGCTCTGGAAGTGGGACTTCATTTTCCCT
 GACCGTGTCCAGAGTCGAGGCTGAAGATGCCGCTACATACTATTGTCAGCAGTGGTC
 TAGTTATCCCCCTATCACTTTCGGTGCAGGCAGCAAGCTCGAGCTGAAACGTACGGT
 CGCGGCGCCTTCTGTGTTCAATTTTCCCCCATCTGATGAACAGCTGAAATCTGGCACT
 GCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAACCTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTGG
 AAAGTGGACAATGCTCTGCAGAGTGGGAATTTCCAGGAATCTGTCACTGAGCAGGA
 CTCTAAGGATAGCACATACTCCCTGTCTCTACTCTGACACTGAGCAAGGCTGATTA
 CGAGAAACACAAAGTGTACGCCTGTGAAGTCACACATCAGGGGCTGTCTAGTCCTG
 TGACCAAATCCTTCAATAGGGGAGAGTGCTGATAGTAAAAGCTT

Гуманизированная тяжелая цепь (VH3), нуклеиновая кислота (клон NUC 7683_evi-5
 UMG.HUM3-h1.HC), нуклеиновая кислота [**SEQ ID NO: 29**]

GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCCG
 GTGGCAGCCTGAGACTGTCTTTCGTCGCCAGTGGATTCACCTTTTCCAGCTTCGGGA
 TCACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCTACATCTCT
 AGTGGTTCGGCAACTTCTACTATGTGGACACTGTCAAGGGCAGGTTTACCATTAGC
 CGGGATAACGCTAAAAATTCTCTGTATCTGCAAATGAATAGTCTGAGAGCCGAAGA
 CACAGCCGTGTAATTTGTGCTAGATCAACTTACTATCATGGTTCCCGCGGCGCAAT
 GGATTACTGGGGACAGGGGACCCTGGTGACAGTCTCGAGCGCTAGCACAAAGGGCC
 CTAGTGTGTTTCTCTGGCTCCCTCTTCAAATCCACTTCTGGTGGCACTGCTGCTCT
 GGGATGCCTGGTGAAGGATTACTTTCTGAACCTGTGACTGTCTCATGGAACCTCTGG
 TGCTCTGACTTCTGGTGTCCACACTTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGACTGTAC
 TCTCTGTCATCTGTGGTCACTGTGCCCTTTCATCTCTGGGAACCCAGACCTACATTT
 GTAATGTGAACCACAAACCATCCAACACTAAAGTGGACAAAAAAGTGGAAACCCAAA
 TCCTGTGACAAAACCCACACCTGCCACCTTGTCTGCCCCTGAACTGCTGGGAGGA
 CCTTCTGTGTTTCTGTTCCCCCCCCAAACCAAAGGATACCCTGATGATCTCTAGAACCC

CTGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAGGACCCTGAGGTCAAATTCA
 ACTGGTACGTGGATGGAGTGGAAGTCCACAATGCCAAAACCAAGCCTAGAGAGGAA
 CAGTACAATTCAACCTACAGAGTGGTCAGTGTGCTGACTGTGCTGCATCAGGATTGG
 CTGAATGGCAAGGAATACAAGTGTAAGTCTCAAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAAT
 TGAGAAAACAATCTCAAAGGCCAAGGGACAGCCTAGGGAACCCAGGTCTACACCC
 TGCCACCTTCAAGAGAGGAAATGACCAAAAACCAGGTGTCCCTGACATGCCTGGTC
 AAAGGCTTCTACCCTTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAGTCAAATGGACAGCCTGAG
 AACAАCTACAAAACAACCCCCCTGTGCTGGATTCTGATGGCTCTTTCTTTCTGTACT
 CCAAАCTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAATGTCTTTTCTTGCTCTG
 TCATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACTCAGAAATCCCTGTCTCTGTCTCCCG
 GGAAATGATAGTAAAAGCTT

Гуманизированная легкая цепь (VL4), нуклеиновая кислота (клон NUC 7700_evi-5
 UMG.HUM4-hk.LC) [SEQ ID NO: 30]

GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTGAGGTGGTCATGACCCAGTCTCCTGCTTTCTGTCCGTGACACC
 GGGCGAGAAGGTCACCATCACATGCTCCGCATCCAGCTCTGTCAGTTCAATGTAАCTG
 GTATCAGCTGAAGCCAGACCAGGCACCCAAACTGCTGATCTACGATACATCTAAAA
 TGGCCAGTGGCGTCCCCATTAGGTTCTCGGGATCGGGGAGCGGAACTGACTTCACTT
 TTACCGTGTGCGAGCGTCGAGGGCCGAAGATGCCGCTACCTACTATTGTCAGCAGTGGT
 CTAGTTATCCCCCTATCACATTTGGCGGAGGGACTAAGGTGGAGATTAAGCGTACGG
 TCGCGGCGCCTTCTGTGTTCAATTTCCCCCATCTGATGAACAGCTGAAATCTGGCAC
 TGCTTCTGTGGTCTGTCTGCTGAACAАCTTCTACCCTAGAGAGGCCAAAGTCCAGTG
 GAAAGTGGACAATGCTCTGCAGAGTGGGAATTTCCAGGAATCTGTCACTGAGCAGG
 ACTCTAAGGATAGCACATACTCCCTGTCTCTACTCTGACACTGAGCAAGGCTGATT
 ACGAGAAACACAAAGTGTACGCCTGTGAAGTACACATCAGGGGCTGTCTAGTCCT
 GTGACCAAATCCTTCAATAGGGGAGAGTGCTGATAGTAAAAGCTT

Тяжелая цепь мышцы, нуклеиновая кислота (клон NUC 29709_evi-5 UMG.VH-m1.HC)
 [SEQ ID NO: 31]

GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTGACGTGCAGCTGGTCGAGAGTGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCCG
 GTGGCAGCCGAAAGCTGTCTTGCCTCGCTAGTGGTTTACCTTTTCCAGCTTCGGCA
 TGCACTGGGTGAGGCAGGCACCTGAGAAAGGACTGGAATGGGTGCTCCTACATCTCT
 AGTGGAAAGCGGGAАCTTCTACTATGTGGACACTGTCAAGGGGAGGTTTACCATTTCT
 CGGGATAACCCAAAAAATACACTGTTTCTGCAAATGACTTCACTGAGATCCGAAGA
 CACCGCCATGTAАCTATTGTGCTAGATCAACATACTACCACGGCTCCAGGGGCGCTAT
 GGACTATTGGGGTCAGGGCACCTCTGTGACAGTCTCGAGCGCAAAAACAACCCCTC
 CAAGCGTCTACCCCTGGCGCCTGGGAGCGCGGCGCAGACGAACTCGATGGTCAAG
 TTGGGGTGCCTCGTCAAGGGATATTTCCCGGAGCCAGTCACGGTCACTGGAАCTCG
 GGGAGCCTGTGAGCGGGCTCCACACGTTCCCGGAGTCTGCAAAGCGACCTGTA
 CACGCTGAGCTCGTCAGTCACGGTCCCAGCTCGACGTGGCCGTGCGAGACGGTCA

CGTGCAACGTGGCGCACCCGGCGAGCTCGACGAAAGTGGACAAGAAGATCGTGCCG
 CGGGACTGCGGGTGAAGCCATGCATATGCACGGTCCCGGAAGTGTCGAGCGTGTT
 CATCTTCCC GCCGAAGCCGAAGGACGTGCTGACGATCACGCTGACGCCGAAAGTCA
 CGTGCGTCGTCGTAGACATCTCGAAGGACGACCCGGAAGTCCAGTTCTCGTGGTTTCG
 TCGACGACGTGGAAGTCCACACGGCGCAGACGCAGCCGCGGGAGGAGCAGTTCAAC
 TCGACGTTCAGGAGCGTGTCGGAGCTGCCGATCATGCACCAGGACTGGCTGAACGG
 GAAGGAGTTCAAGTGCCGCGTCAACTCGGCGGCGTTCCAGCGCCAATTGAGAAGA
 CGATCTCGAAGACGAAGGGGCGGCCGAAAGCGCCGCAAGTCTACACGATCCCGCCG
 CCGAAGGAGCAGATGGCGAAGGACAAAGTCTCGCTGACGTGCATGATCACGGACTT
 CTTCCCGGAGGACATCACGGTTCGAGTGGCAGTGGAAACGGGCAGCCTGCAGAGAACT
 ACAAGAACACGCAGCCGATCATGGACACGGACGGGAGCTACTTCGTGTACTCGAAG
 CTGAACGTGCAGAAGTCGAACTGGGAGGCGGGGAACACGTTACGTGCTCAGTCCT
 GCACGAGGGGCTGCACAACCACCACACGGAGAAGAGCCTGTCGCACTCGCCCGGGA
 AATGATAAGCTT

Легкая цепь мыши, нуклеиновая кислота (клон NUC 29710_evi-5 UMG.VL-mk.LC)

[SEQ ID NO: 32]

GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTCAGATCGCCCTGACCCAGAGTCCTGCAATTATGTCAGCCTCCCC
 GGGCGAGAAGGTGACCATGACATGCTCCGCTTCCAGCTCTGTCAGTTCAATGTACTG
 GTATCAGCTGAAGCCCGGCTCCTCCCCAGGCTGCTGATCTACGACACAAGCAAAAT
 GGCATCTGGCGTGCCATTCGGTTCAGCGGCTCTGGAAGTGGGACTTCATTTTCCCT
 GACCGTGTCCAGAGTCGAGGCTGAAGATGCCGCTACATACTATTGTCAGCAGTGGTC
 TAGTTATCCCCCTATCACTTTCGGTGCAGGCAGCAAGCTCGAGCTGAAACGGGCTGA
 CGCGGCGCCTACAGTCTCCATTTTTCCACCTAGTAGCGAACAGCTGACATCCGGGGG
 GGCTTCCGTCGTCTGCTTTCTGAACAACCTTTTACCCCAAGGACATCAACGTGAAGTG
 GAAAATTGATGGCTCCGAGAGGCAGAACGGAGTCCTGAATTCTTGGACCGACCAGG
 ATTCTAAGGACAGTACATATTCAATGTCCAGCACCTGACACTGACTAAAGATGAGT
 ACGAACGGCACAATAGCTATACCTGCGAGGCAACCCATAAAACAAGCACAAGCCCA
 ATCGTCAAATCCTTCAACCGTAATGAGTGTTGATAAGCTT

Биспецифическая тяжелая цепь человека, нуклеиновая кислота (NUC 32827_evi-5
 UMG.VH3-h1.HC-CD3.scFv) **[SEQ ID NO: 33]**

GCGGCCGCCATGAATTTTGGACTGAGGCTGATTTTCCTGGTGCTGACCCTGAA
 AGGCGTCCAGTGTCAGGTGCAGCTGGTGGAAATCTGGCGGAGGGCTGGTGCAGCCCG
 GTGGCAGCCTGAGACTGTCTTTCGTCGCCAGTGGATTCACCTTTTCCAGCTTCGGGA
 TCGACTGGGTGAGGCAGGCACCTGGAAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCCTACATCTCT
 AGTGGTTCCGGCAACTTCTACTATGTGGACACTGTCAAGGGCAGGTTTACCATTAGC
 CGGGATAACGCTAAAAATTCTCTGTATCTGCAAATGAATAGTCTGAGAGCCGAAGA
 CACAGCCGTGTAATAATTGTGCTAGATCAACTTACTATCATGGTTCCCGCGGCGCAAT
 GGATTACTGGGGACAGGGGACCCTGGTGACAGTCTCGAGCGCTAGCACAAAGGGCC
 CTAGTGTGTTTCTCTGGCTCCCTCTTCAAATCCACTTCTGGTGGCACTGCTGCTCT

GGGATGCCTGGTGAAGGATTACTTTCCCTGAACCTGTGACTGTCTCATGGAACCTCTGG
 TGCTCTGACTTCTGGTGTCCACACTTTCCCTGCTGTGCTGCAGTCTAGTGGACTGTAC
 TCTCTGTCATCTGTGGTCACTGTGCCCTTTCATCTCTGGGAACCCAGACCTACATTT
 GTAATGTGAACCACAAACCATCCAACACTAAAGTGGACAAAAAAGTGGAACCCAAA
 TCCTGTGACAAAACCCACACCTGCCACCTTGTCTGCCCCTGAACTGCTGGGAGGA
 CCTTCTGTGTTTCTGTTCCACCAAAAACCAAAAGATACCCTGATGATCTCTAGAACC
 CCTGAGGTGACATGTGTGGTGGTGGATGTGTCTCATGAGGACCCTGAGGTCAAATTC
 AACTGGTACGTGGATGGAGTGGAAAGTCCACAATGCCAAAACCAAGCCTAGAGAGGA
 ACAGTACAATTCAACCTACAGAGTGGTCAGTGTGCTGACTGTGCTGCATCAGGATTG
 GCTGAATGGCAAGGAATACAAGTGTAAAGTCTCAAACAAGGCCCTGCCTGCTCCAA
 TTGAGAAAACAATCTCAAAGGCCAAGGGACAGCCTAGGGAACCCCAGGTCTACACC
 CTGCCACCTTCAAGAGAGGAAATGACCAAAAACCAAGGTGTCCCTGACATGCCTGGT
 CAAAGGCTTCTACCCTTCTGACATTGCTGTGGAGTGGGAGTCAAATGGACAGCCTGA
 GAACAACCTACAAAACAACCCCCCTGTGCTGGATTCTGATGGCTCTTTCTTTCTGTA
 CTCCAAACTGACTGTGGACAAGTCTAGATGGCAGCAGGGGAATGTCTTTTCTTGCTC
 TGTCATGCATGAGGCTCTGCATAACCACTACACTCAGAAATCCCTGTCTCTGTCTCCT
 GGCAAAGGCGGCGGAGGATCCGGGGGTGGGGGAAGCGGCGGAGGAGGTAGCGACA
 TCAAACCTGCAGCAGAGTGGAGCCGAACTGGCTAGACCTGGTGCTTCTGTGAAAATG
 TCCTGTAAAACCTCCGTTACACCTTTACCCGGTACACAATGCATTGGGTGAAACAG
 AGGCCTGGACAGGGGCTGGAATGGATCGGATACATCAACCCTAGTCGGGGATACAC
 AAACCTACAACCAGAAATTCAAAGACAAGGCCACCCTGACAACCGACAAATCTTCTT
 CTAAGCCTACATGCAGCTGTCATCTCTGACTTCCGAGGATAGTGCCGTCTACTACT
 GTGCTCGGTACTACGATGATCATTACTGTCTGGACTACTGGGGCCAGGGAACAACAC
 TTACCGTTTCTAGCGTCGAGGGCGGATCTGGCGGTAGCGGTGGATCTGGAGGCTCTG
 GAGGAGTGGATGATATCCAGCTGACCCAGTCTCCTGCTATCATGTCCGCTTACCTG
 GCGAAAAAGTGACCATGACCTGCCGTGCTTCATCTTCCGTGTCATACATGAATTGGT
 ACCAGCAGAAATCTGGCACATCTCCCAAACGATGGATCTACGACACCTCAAAGTC
 GCTAGTGGCGTGCCTTACCGTTTCTCCGTTCCGGATCTGGAACATCATACTCCCTG
 ACCATCTTCTATGGAGGCTGAGGATGCTGCCACATACTACTGTCAGCAGTGGAGT
 AGCAATCCTCTGACCTTTGGTGCTGGGACAAAACCTGGAGCTGAAATGATAAGCTTTG
 A

Химерная тяжелая цепь (клон PRO 7200_evi-5 UMG.1.CH-h1.HC) [SEQ ID NO: 34]

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISS
 GSGNFYYVDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARSTYYHGSRGAMDY
 WGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Химерная легкая цепь (клон PRO 7201_evi-5 UMG.1.CH-hk.LC) [SEQ ID NO: 35]

QIALTQSPAIMASAPGEEKVTMTCSASSSVSSMYWYQLKPGSSPRLLIYDTSKMAS
 GVPIRFSGSGSGTFSFLTVSRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGAGSKLELKRVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYS
 LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь человека (VH3) (клон PRO 7683_evi-5 UMG.HUM3-h1.HC) [SEQ ID NO: 36]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSG
 SGNFYVVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDY
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
 GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Легкая цепь человека (VL4) (клон PRO 7700_evi-5 UMG.VL4-hk.LC) [SEQ ID NO:37]

QVVMTQSPAFLSVTPGEEKVTITCSASSSVSSMYWYQLKPDQAPKLLIYDTSKMA
 SGVPIRFSGSGSGTDFTFVSSVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGGGTKVEIKRTVAAPS
 VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY
 SLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

Тяжелая цепь мыши (клон PRO 29709_evi-5 UMG.VH-m1.HC) [SEQ ID NO: 38]

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISS
 GSGNFYVVDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARSTYYHGSRGAMDY
 WGQGTSTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS
 GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCI
 CTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQP
 REEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIP
 PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKL
 NVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKLSLHSPGK

Легкая цепь мыши (клон PRO 29710_evi-5 UMG.VL-mk.LC) [SEQ ID NO: 39]

QIALTQSPAIMASAPGEEKVTMTCSASSSVSSMYWYQLKPGSSPRLLIYDTSKMAS
 GVPIRFSGSGSGTFSFLTVSRVEAEDAATYYCQQWSSYPPITFGAGSKLELKRADAAPT
 VIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNRFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS
 MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNREK

Биспецифическая тяжелая цепь человека-CD3 (клон PRO 32827_evi-5 UMG.VH3-h1.HC-CD3.scFv) [SEQ ID NO: 40]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYISSG
 SGNFYVVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDY
 WGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS

GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTH
 TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
 VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG
 QPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS
 DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSG
 GGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPS
 RGYTNYNQFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQ
 GTTLTVSSVEGGSGGSGGSGGSGGVDDIQLTQSPAISASPGEKVTMTCRASSSVSYMN
 WYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVYPYRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSS
 NPLTFGAGTKLELK

Последовательность плазмиды для CAR-T, нуклеиновая кислота [SEQ ID NO: 41]:

ACGCGTGTAGTCTTATGCAATACTCTTGTAGTCTTGCAACATGGTAACGATGA
 GTTAGCAACATGCCTTACAAGGAGAGAAAAAGCACCGTGCATGCCGATTGGTGGAA
 GTAAGGTGGTACGATCGTGCCTTATTAGGAAGGCAACAGACGGGTCTGACATGGAT
 TGGACGAACCACTGAATTGCCGCATTGCAGAGATATTGTATTTAAGTGCCTAGCTCG
 ATACAATAAACGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGCCTGGGAGCTCTCTGGCT
 AACTAGGGAACCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCCTTGAGTGCTTCAAGTAG
 TGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATCCCTCAGACCCTTTTAGTC
 AGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTGGCGCCCGAACAGGGACCTGAAAGCGAAAGGGA
 AACCAGAGCTCTCTCGACGCAGGACTCGGCTTGCTGAAGCGCGCACGGCAAGAGGC
 GAGGGGCGGCGACTGGTGAGTACGCCAAAAATTTTGACTAGCGGAGGCTAGAAGGA
 GAGAGATGGGTGCGAGAGCGTCAGTATTAAGCGGGGGAGAATTAGATCGCGATGG
 GAAAAAATTCGGTTAAGGCCAGGGGGAAAGAAAAAATATAAATTAACAATATAG
 TATGGGCAAGCAGGGAGCTAGAACGATTCGCAGTTAATCCTGGCCTGTTAGAAACA
 TCAGAAGGCTGTAGACAAATACTGGGACAGCTACAACCATCCCTTCAGACAGGATC
 AGAAGA ACTTAGATCATTATATAATACAGTAGCAACCCTCTATTGTGTGCATCAAAG
 GATAGAGATAAAAGACACCAAGGAAGCTTTAGACAAGATAGAGGAAGAGCAAAAC
 AAAAGTAAGACCACCGCACAGCAAGCGGCCACTGATCTTCAGACCTGGAGGAGGAG
 ATATGAGGGACAATTGGAGAAGTGAATTATATAAATATAAAGTAGTAAAAATTGAA
 CCATTAGGAGTAGCACCCACCAAGGCAAAGAGAAGAGTGGTGCAGAGAGAAAAAA
 GAGCAGTGGGAATAGGAGCTTTGTTCTTGGGTTCTTGGGAGCAGCAGGAAGCACT
 ATGGGCGCAGCCTCAATGACGCTGACGGTACAGGCCAGACAATTATTGTCTGGTAT
 AGTGCAGCAGCAGAACAATTTGCTGAGGGGCTATTGAGGCGCAACAGCATCTGTTGC
 AACTCACAGTCTGGGGCATCAAGCAGCTCCAGGCAAGAATCCTGGCTGTGGAAAGA
 TACCTAAAGGATCAACAGCTCCTGGGGATTTGGGGTTGCTCTGGAAA ACTCATTTGC
 ACCACTGCTGTGCCTTGAATGCTAGTTGGAGTAATAAATCTCTGGAACAGATTGGA
 ATCACACGACCTGGATGGAGTGGGACAGAGAAATTAACAATTACACAAGCTTAATA
 CACTCCTTAATTGAAGAATCGCAAAACCAGCAAGAAAAGAATGAACAAGAATTATT
 GGAATTAGATAAATGGGCAAGTTTGTGGAATTGGTTTAAACATAACAAATTGGCTGTG
 GTATATAAAATTATTCATAATGATAGTAGGAGGCTTGGTAGGTTTAAAGAATAGTTTT

TGCTGTACTTTCTATAGTGAATAGAGTTAGGCAGGGATATTCACCATTATCGTTTCA
GACCCACCTCCCAACCCCGAGGGGACCCGACAGGCCCGAAGGAATAGAAGAAGAA
GGTGGAGAGAGAGACAGAGACAGATCCATTCGATTAGTGAACGGATCTCGACGGTA
TCGGTAACTTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGA
ATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTAC
AAAATTCAAATTTTATCGATACTAGTATTATGCCCAGTACATGACCTTATGGGACT
TTCCTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTT
TTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGACTCACGGGGATTTCOAAGTCT
CCACCCCATGACGTCAATGGGAGTTTGTGTTTGGCACCAAAATCAACGGGACTTTCC
AAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGT
GGGAGGTTTATATAAGCAGAGCTCGTTTAGTGAACCGTCAGATCGCCTGGAGACGC
CATCCACGCTGTTTTGACCTCCATAGAAGATTCTAGAGCCGCCACCATGGCCCTCCC
AGTAACCGCCCTCCTGCTCCCCCTTGCTTTGCTGCTGCACGCCGCACGGCCCGCTAG
CGAAGTTCAGCTTGTCAATCTGGGGGAGGGTTGGTTCAGCCGGGAGGGAGTCTGC
GCCTTTCTTGCGTGGCTTCAGGCTTTACCTTTTCCAGTTTTGGGATGCATTGGGTACG
ACAAGCACCTGGGAAAGGACTGGAGTGGGTGGCATATATATCAAGCGGCAGCGGA
AACTTCTACTACGTTGACACTGTAAAAGGGAGATTCACCATCTCCCGAGACAACGCT
AAAACTCACTCTATCTTCAAATGAATAGCCTGCGAGCTGAGGATACGGCGGTTTAC
TACTGCGCGCGATCAACATATTACCACGGGTCCAGAGGCGCGATGGACTACTGGGG
GCAAGGGACTTTGGTTACTGTGGGTGGCGGAGGCAGCGGCGGTGGTGGTTCCGGAG
GCGGCGGTTCTCAAGTCGTTATGACCCAAAGCCCCGCATTTCTTTCTGTGACTCCAG
GCGAGAAGGTGACGATAACCTGTTTCAGCCAGTTCCAGTGTCTCCAGTATGTATTGGT
ATCAACTGAAACCAGATCAGGCACCGAAGCTTTTGATATATGACACATCTAAAATG
GCATCAGGGGTACCCATAAGGTTTAGCGGGTCCGGCTCAGGGACCGATTTTACGTTT
ACTGTCTCATCCGTCGAGGCGGAAGATGCAGCGACCTATTACTGCCAGCAGTGGAG
TAGTTATCCCCCATCACGTTTGGCGGCGGTACGAAAGTGGAGATAAAGGACTACA
AAGACGATGACGACAAGCTCGAGACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACC
GGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAG
CGGCGGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTTTTGGGTG
CTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT
ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTACTACATGAA
CATGACTCCCCGCCGCCCGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACC
ACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAAACGGGGCAGAAAGAACTCCTGTATATATT
CAAACAACCATTTATGAGACCAGTACAACTACTCAAGAGGAAGATGGCTGTAGCT
GCCGATTTCCAGAAGAAGAAGAAGGAGGATGTGAACTGAGAGTGAAGTTCAGCAG
GAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCA
ATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCT
GAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAAC
TGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCG
CCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGG

ACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCCCCTCGCTAATAGGAATTCGTCG
ACAATCAACCTCTGGATTACAAAATTTGTGAAAGATTGACTGGTATTCTTAACTATG
TTGCTCCTTTTACGCTATGTGGATACGCTGCTTTAATGCCTTTGTATCATGCTATTGC
TTCCCGTATGGCTTTCATTTTCTCCTCCTTGTATAAATCCTGGTTGCTGTCTCTTTATG
AGGAGTTGTGGCCCGTTGTCAGGCAACGTGGCGTGGTGTGCACTGTGTTTGTGCTGACG
CAACCCCCACTGGTTGGGGCATTGCCACCACCTGTCAGCTCCTTTCCGGGACTTTCG
CTTTCCCCCTCCCTATTGCCACGGCGGAACTCATCGCCGCCTGCCTTGCCCGCTGCTG
GACAGGGGCTCGGCTGTTGGGCACTGACAATTCCGTGGTGTGTCGGGGAAATCATC
GTCCTTTCCTTGGCTGCTCGCCTGTGTTGCCACCTGGATTCTGCGCGGGACGTCCTTC
TGCTACGTCCCTTCGGCCCTCAATCCAGCGGACCTTCCTTCCCGCGGCCTGCTGCCG
GCTCTGCGGCCTCTTCCGCGTCTTCGCCTTCGCCCTCAGACGAGTCGGATCTCCCTTT
GGGCCGCCTCCCCGCCTGGTACCTTTAAGACCAATGACTTACAAGGCAGCTGTAGAT
CTTAGCCACTTTTTAAAAGAAAAGGGGGGACTGGAAGGGCTAATTCCTCCAACG
AAAATAAGATCTGCTTTTTGCTTGTACTGGGTCTCTCTGGTTAGACCAGATCTGAGC
CTGGGAGCTCTCTGGCTAACTAGGGAACCCACTGCTTAAGCCTCAATAAAGCTTGCC
TTGAGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCCCGTCTGTTGTGTGACTCTGGTAACTAGAGATC
CCTCAGACCCTTTTAGTCAGTGTGGAAAATCTCTAGCAGTAGTAGTTCATGTCATCTT
ATTATTCAGTATTTATAACTTGCAAAGAAATGAATATCAGAGAGTGAGAGGAACTT
GTTTATTGCAGCTTATAATGGTTACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTACAAA
TAAAGCATTTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCT
TATCATGTCTGGCTCTAGCTATCCCGCCCCTAACTCCGCCAGTTCCGCCATTCTCC
GCCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTTATTTATGCAGAGGCCGAGGCCGCCTCGGCCTCT
GAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGAGGCTTTTTTGGAGGCCTAGACTTTTGCAGAGAC
GGCCCAAATTCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCA
CAATTCCACACAACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAGCCTGGGGTGCCTAA
TGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCACTGCCCGCTTTCAGTCGGGA
AACCTGTCGTGCCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTT
GCGTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGTTCCGG
CTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATC
AGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAAC
CGTAAAAAGGCCGCGTTGCTGGCGTTTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCAT
CACAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATA
CCAGGCGTTTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCCTCTCCTGTTCCGACCCTGCCGCTT
ACCGGATACCTGTCCGCCTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCAC
GCTGTAGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTCGTTTCGCTCCAAGCTGGGCTGTGTGCACG
AACCCCCCGTTCAGCCCGACCGCTGCGCCTTATCCGGTAACTATCGTCTTGAGTCCA
ACCCGGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGC
AGAGCGAGGTATGTAGGCGGTGCTACAGAGTTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGG
CTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTTCGG
AAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAAACCACCGCTGGTAGCGGTGGTT

TTTTTGTGGCAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTT
 TGATCTTTTCTACGGGGTCTGACGCTCAGTGGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTT
 TGGTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTCACCTAGATCCTTTTAAATTAATAAATGAA
 GTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCT
 TAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTTCATCCATAGTTGCCTG
 ACTCCCCGTCGTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGC
 TGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACC
 AGCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCCTGCAACTTTATCCGCCTCCATC
 CAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAGCTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTG
 CGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCGTTTGGTATG
 GCTTCATTCAGCTCCGGTTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCCATGTTG
 TGCAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTTGGCC
 GCAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCTCTTACTGTCATGCCAT
 CCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGAGTACTCAACCAAGTCATTCTGAGAATAGT
 GTATGCGGCGACCGAGTTGCTCTTGCCCGGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCAC
 ATAGCAGAACTTTAAAAGTGCTCATCATTGGAAAACGTTCTTCGGGGCGAAAACCTCT
 CAAGGATCTTACCGCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAAC
 GATCTTCAGCATCTTTTACTTTACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGC
 AAAATGCCGCAAAAAGGGAATAAGGGCGACACGGAAATGTTGAATACTCATACTC
 TTCCTTTTTCAATATTATTGAAGCATTTATCAGGGTTATTGTCTCATGAGCGGATACA
 TATTTGAATGTATTTAGAAAAATAAACAAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCCGAA
 AAGTGCCACCTGACGTCTAAGAAACCATTATTATCATGACATTAACCTATAAAAATA
 GGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTCGCGCGTTTCGGTGATGACGGTGAACCTCT
 GACACATGCAGCTCCCGGAGACGGTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGC
 AGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTGCGGGCTGGCTTAA
 CTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTAAGTGCACCATATGCGGTGTGAAATAC
 CGCACAGATGCGTAAGGAGAAAATAACGCATCAGGCGCCATTCGCCATTCAGGCTG
 CGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCG
 AAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTC
 ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTG

Рекомбинантный белок CD43 человека (аминокислоты 20-253) [SEQ ID NO: 42]:

STTAVQTPTSGEPLVSTSEPLSSKMYTTSITSDPKADSTGDQTSALPPSTSINEGSPL
 WTSIGASTGSPLPEPTYQEVSIMSSVPQETPHATSHPAVPITANSLGSHVTGGTITNS
 PETSSRTSGAPVTTAASSLETSSRGTSPPPLTMATVSLETSSKGTSGPPVTMATDSLETSTGT
 TGPPVTMTTGSLEPSSGASGPQVSSVKLSTMMSPPTSTNASTVPFRNPDENSR

CDR2 тяжелой цепи UMG1 - длинная [SEQ ID NO: 43]

YISSGSGNFYYVDTVKG

VH UMG1 (мышь) - альтернативная последовательность [SEQ ID NO: 44]

DVQVESGGGLVQPGGSRKLSCVASGFTFSSFGMHWVRQAPEKGLEWVAYISSGS
GNFYVVDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDAMYYCARSTYYHGSRGAMDYW
GQGTSVTVSS

Гуманизированный VH1 - альтернативная последовательность [SEQ ID NO: 45]

EVQVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVSYISSGS
GNFYVVDTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSTYYHGSRGAMDYW
GQGTLVTVSS

Нейтральный пептидный линкер [SEQ ID NO: 46]

GSGSGSG

Синтетический пептид из эпитопа гемагглютинаина вируса гриппа (HA) [SEQ ID NO: 47]

YPYDVPDYAG

Линейный эпитоп CD43 человека - аминокислоты 71-78 [SEQ ID NO: 48]

INEGSPLW

Линейный эпитоп CD43 человека - высоко основная последовательность 1 [SEQ ID NO: 49]

RRRQKR

Линейный эпитоп CD43 человека - высоко основная последовательность 2 [SEQ ID NO: 50]

RRPTLTTFGRK

Линейный эпитоп CD43 человека, используемый в сканировании замен [SEQ ID NO: 51]

PPSTSINEGSPLWTS

Линейный эпитоп не принадлежащего человеку CD43 [SEQ ID NO: 52]

PPSTSVNEGSPLGTS

Линейный эпитоп CD43 человека - аминокислоты 73-78 [SEQ ID NO: 53]

EGSPLW

Линейная пептидная последовательность CD43 человека - аминокислоты 66-72 [SEQ ID NO: 54]

PPSTSIN

Линейная пептидная последовательность CD43 человека - аминокислоты 79-80 [SEQ ID NO: 55]

TS

Таблица 8: Последовательности CDR UMG1						
		Kabat	Chothia	AbM	Система Contact	IMGT
CDR VH	<i>CDR1 VH</i>	SFGMH (SEQ ID NO: 56)	GFTFSSF (SEQ ID NO: 62)	GFTFSSFGMH (SEQ ID NO: 68)	SSFGMH (SEQ ID NO: 74)	GFTFSSFG (SEQ ID NO: 80)
	<i>CDR2 VH</i>	YISSGSGNFYYVD TVKG (SEQ ID NO: 57)	SSGSGN (SEQ ID NO: 63)	YISSGSGNFY (SEQ ID NO: 69)	WVAYISSGSGNFY (SEQ ID NO: 75)	ISSGSGNF (SEQ ID NO: 81)
	<i>CDR3 VH</i>	STYYHGSRGAMD Y (SEQ ID NO: 58)	STYYHGSRGAMD Y (SEQ ID NO: 64)	STYYHGSRGAMD Y (SEQ ID NO: 70)	ARSTYYHGSRGA MD (SEQ ID NO: 76)	ARSTYYHGSRGA MDY (SEQ ID NO: 82)
CDR VL	<i>CDR1 VL</i>	SASSSVSSMY (SEQ ID NO: 59)	SASSSVSSMY (SEQ ID NO: 65)	SASSSVSSMY (SEQ ID NO: 71)	SSMYWY (SEQ ID NO: 77)	SSVSS (SEQ ID NO: 83)
	<i>CDR2 VL</i>	DTSKMAS (SEQ ID NO: 60)	DTSKMAS (SEQ ID NO: 66)	DTSKMAS (SEQ ID NO: 72)	LLIYDTSKMA (SEQ ID NO: 78)	DT (SEQ ID NO: 84)
	<i>CDR3 VL</i>	QQWSSYPPIT (SEQ ID NO: 61)	QQWSSYPPIT (SEQ ID NO: 67)	QQWSSYPPIT (SEQ ID NO: 73)	QQWSSYPPI (SEQ ID NO: 79)	QQWSSYPPIT (SEQ ID NO: 85)

7. ВКЛЮЧЕНИЕ В КАЧЕСТВЕ ССЫЛКИ

[00451] Все публикации, патенты, патентные заявки и другие документы, процитированные в настоящей заявке, включены в нее, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме для всех целей в той степени, как если бы каждая отдельная публикация, патент, патентная заявка или другой документ были отдельно указаны как включенные в качестве ссылки для всех целей.

8. ЭКВИВАЛЕНТЫ

[00452] Хотя проиллюстрированы и описаны различные конкретные варианты осуществления, приведенное выше описание не является ограничивающим. Следует понимать, что можно осуществлять различные изменения без отклонения от сущности и объема изобретения. Многие изменения будут очевидны специалистам в этой области из настоящего описания.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способе лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем:

введение терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование,

где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 61-91 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

2. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.1, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 71-78 CD43 дикого типа.

3. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.1, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 73-78 CD43 дикого типа.

4. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

последовательность CDR1 VH SEQ ID NO: 1;

последовательность CDR2 VH SEQ ID NO: 43; и

последовательность CDR3 VH SEQ ID NO: 3;

и где домен VL содержит:

последовательность CDR1 VL SEQ ID NO: 4;

последовательность CDR2 VL SEQ ID NO: 5; и

последовательность CDR3 VL SEQ ID NO: 6.

5. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.4, где последовательность VH представляет собой SEQ ID NO: 7, и последовательность VL представляет собой SEQ ID NO: 12.

6. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.4 или 5, где антитело против CD43 является антителом мыши, продуцируемым гибридной линией клеток, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD №

16001 (UMG1).

7. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.4 или 5, где антитело против CD43 является химерным антителом, дополнительно содержащим домены константной области человека.

8. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.7, где домены константной области человека являются доменами IgG.

9. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.8, где последовательность тяжелой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 35.

10. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.4, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области вариабельного домена человека.

11. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.10, где домен VH имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; и домен VL имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

12. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело против CD43 является моноклональным антителом.

13. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент является F(ab), F(ab)'₂, scFv, диателом, однодоменным антителом, tandemным антителом или флексителом.

14. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток.

15. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может приводить к истощению опухолеассоциированных макрофагов (TAM).

16. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют с токсическим лекарственным средством.

17. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из предшествующих пунктов, где пациент имеет диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, MALT-лимфому, лимфому Беркитта, анапластическую крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому из клеток мантийной зоны.

18. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения

по любому из пп.1-16, где пациент имеет множественную миелому.

19. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.1-16, где пациент имеет меланому.

20. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.1-16, где пациент имеет рак яичка.

21. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по п.20, где рак яичка выбран из группы, состоящей из: семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли желточного мешка и тератомы.

22. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения по любому из пп.1-16, где пациент имеет нефробластому, нейробластому, карциному эндодермального синуса, ретинобластому, гепатобластому, медуллобластому, папиллому хориоидного сплетения, глиобластому, эпендимому, примитивную нейроэктодермальную опухоль, альвеолярную рабдомиосаркому, незрелую тератому или лейомиосаркому.

23. Биспецифическое антитело для применения в способе лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем:

введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование,

где биспецифическое антитело имеет первую специфичность связывания с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

24. Биспецифическое антитело для применения по п.23, где биспецифическое антитело имеет вторую специфичность связывания с CD3.

25. CAR-T-клетка для применения в способе лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем:

введение терапевтически эффективного количества CAR-T-клеток пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование,

где CAR-T-клетка связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса,

ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

26. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способе идентификации CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем:

детектируемое приведение образца, содержащего CD43-положительную злокачественную клетку, в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом,

где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

27. Антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент для применения в способе диагностики и лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающем:

детектируемое приведение образца от пациента в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом,

постановку диагноза пациенту с CD43-положительным злокачественным новообразованием, если определяют связывание с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом,

и введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента,

где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

28. Способ лечения CD43-положительного злокачественного новообразования,

включающий:

введение терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или его антигенсвязывающего фрагмента пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование,

где антитело против CD43 или антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 61-91 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

29. Способ по п.28, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 71-78 CD43 дикого типа.

30. Способ по п.28, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с аминокислотами 73-78 CD43 дикого типа.

31. Способ по любому из пп.28-30, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменный домен тяжелой цепи (VH) и переменный домен легкой цепи (VL),

где домен VH содержит:

последовательность CDR1 VH SEQ ID NO: 1;

последовательность CDR2 VH SEQ ID NO: 43; и

последовательность CDR3 VH SEQ ID NO: 3;

и где домен VL содержит:

последовательность CDR1 VL SEQ ID NO: 4;

последовательность CDR2 VL SEQ ID NO: 5; и

последовательность CDR3 VL SEQ ID NO: 6.

32. Способ по п.31, где последовательность VH представляет собой SEQ ID NO: 7, и последовательность VL представляет собой SEQ ID NO: 12.

33. Способ по п.31 или 32, где антитело против CD43 является антителом мыши, продуцируемым гибридной линией клеток, депонируемой под регистрационным номером ICLC PD № 16001 (UMG1).

34. Способ по п.31 или 32, где антитело против CD43 является химерным антителом, дополнительно содержащим домены константной области человека.

35. Способ по п.34, где домены константной области человека являются доменами IgG.

36. Способ по п.35, где последовательность тяжелой цепи антитела представляет собой SEQ ID NO: 34, и последовательность легкой цепи антитела представляет собой SEQ

ID NO: 35.

37. Способ по п.31, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасные области варибельного домена человека.

38. Способ по п.37, где домен VH имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 11; и домен VL имеет последовательность, выбранную из: SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15 и SEQ ID NO: 16.

39. Способ по любому из пп.28-38, где антитело против CD43 является моноклональным антителом.

40. Способ по любому из пп.28-39, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент является F(ab), F(ab)'₂, scFv, диателом, однодоменным антителом, тандемным антителом или флексителом.

41. Способ по любому из пп.28-40, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может индуцировать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) в присутствии эффекторных клеток.

42. Способ по любому из пп.28-41, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент может приводить к истощению опухолеассоциированных макрофагов (TAM).

43. Способ по любому из пп.28-42, где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент конъюгируют с токсическим лекарственным средством.

44. Способ по любому из пп.28-43, где пациент имеет диффузную крупноклеточную В-клеточную лимфому, MALT-лимфому, лимфому Беркитта, анапластическую крупноклеточную лимфому, фолликулярную лимфому или лимфому из клеток мантийной зоны.

45. Способ по любому из пп.28-43, где пациент имеет множественную миелому.

46. Способ по любому из пп.28-43, где пациент имеет меланому.

47. Способ по любому из пп.28-43, где пациент имеет рак яичка.

48. Способ по п.47, где рак яичка выбран из группы, состоящей из семиномы, эмбриональной карциномы, опухоли желточного мешка и тератомы.

49. Способ по любому из пп.28-43, где пациент имеет нефробластому, нейробластому, карциному эндодермального синуса, ретинобластому, гепатобластому, медуллобластому, папиллому хориоидного сплетения, глиобластому, эпендимому, примитивную нейроэктодермальную опухоль, альвеолярную рабдомиосаркому, незрелую тератому или лейомиосаркому.

50. Способ лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающий:

введение терапевтически эффективного количества биспецифического антитела пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование,

где биспецифическое антитело имеет первую специфичность связывания с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

51. Способ по п.50, где биспецифическое антитело имеет вторую специфичность связывания с CD3.

52. Способ лечения CD43-положительного злокачественного новообразования, включающий:

введение терапевтически эффективного количества CAR-T-клеток пациенту, имеющему CD43-положительное злокачественное новообразование,

где CAR-T-клетка связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

53. Способ идентификации CD43-положительного злокачественного новообразования, включающий:

детектируемое приведение образца, содержащего CD43-положительную злокачественную клетку, в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом,

где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

54. Способ диагностики и лечения CD43-положительного злокачественного

новообразования, включающий:

детектируемое приведение образца от пациента в контакт с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом,

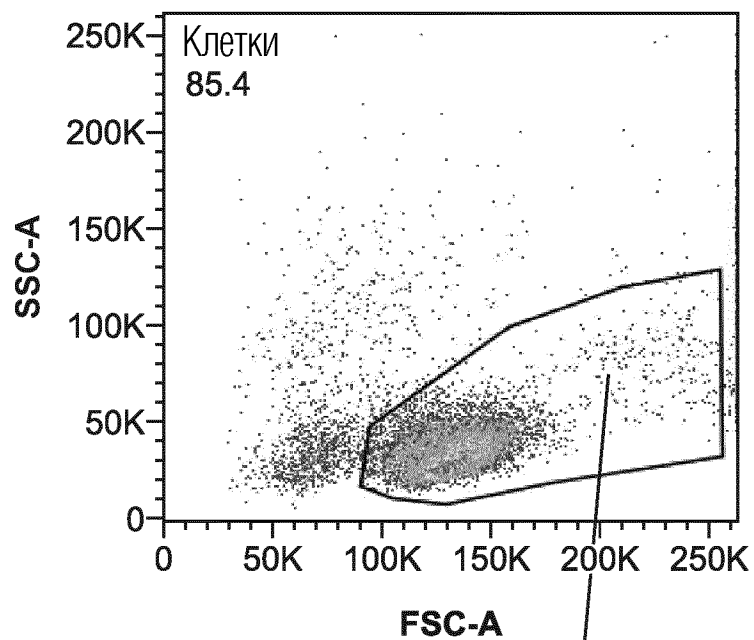
постановку диагноза пациенту с CD43-положительным злокачественным новообразованием, если определяют связывание с антителом против CD43 или его антигенсвязывающим фрагментом,

и введение пациенту терапевтически эффективного количества антитела против CD43 или антигенсвязывающего фрагмента,

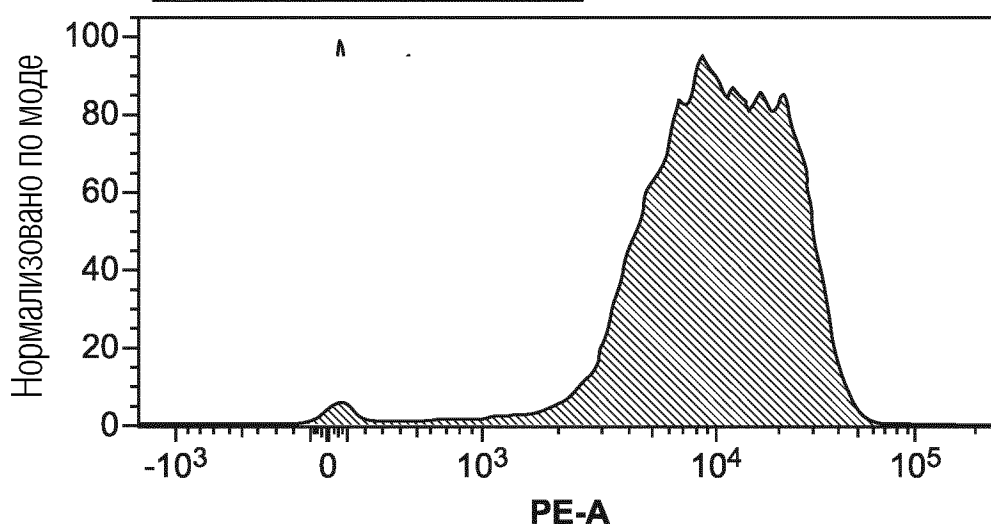
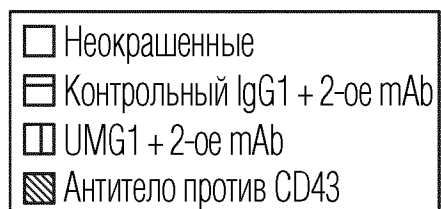
где антитело против CD43 или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с эпитопом в пределах аминокислот 71-78 CD43 дикого типа,

и где CD43-положительное злокачественное новообразование выбрано из группы, состоящей из: диффузной крупноклеточной В-клеточной лимфомы, MALT-лимфомы, лимфомы Беркитта, анапластической крупноклеточной лимфомы, фолликулярной лимфомы, лимфомы из клеток мантийной зоны, множественной миеломы, меланомы, рака яичка, нефробластомы, нейробластомы, карциномы эндодермального синуса, ретинобластомы, гепатобластомы, медуллобластомы, папилломы хориоидного сплетения, глиобластомы, эпендимомы, примитивной нейроэктодермальной опухоли, альвеолярной рабдомиосаркомы, незрелой тератомы и лейомиосаркомы.

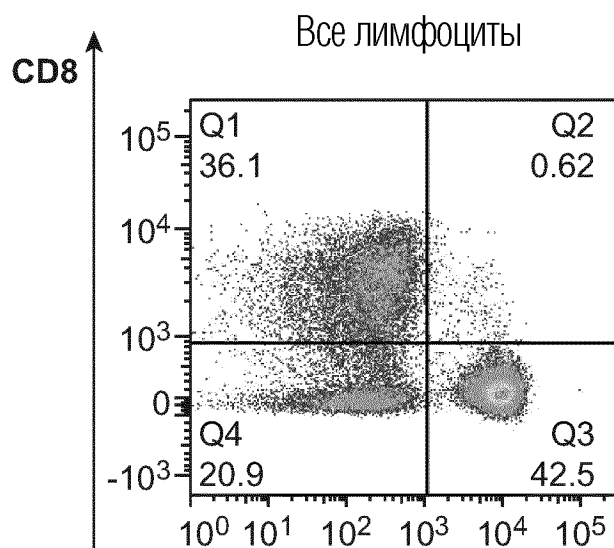
По доверенности



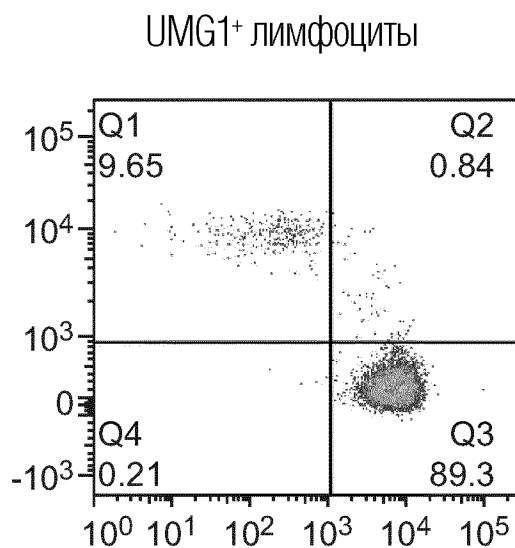
ФИГ. 1А



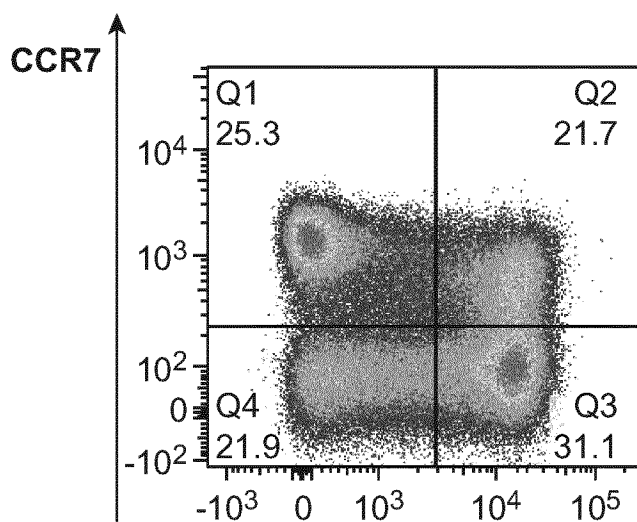
ФИГ. 1В



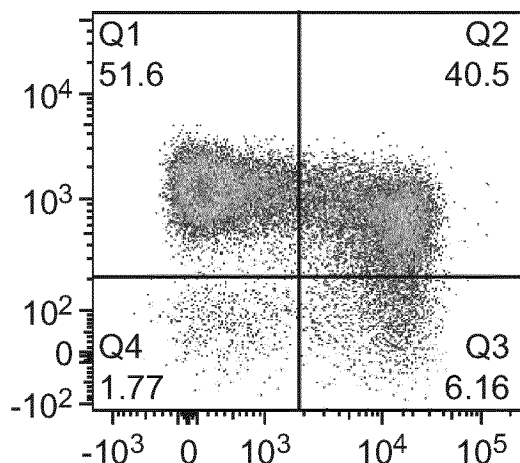
ФИГ. 2А



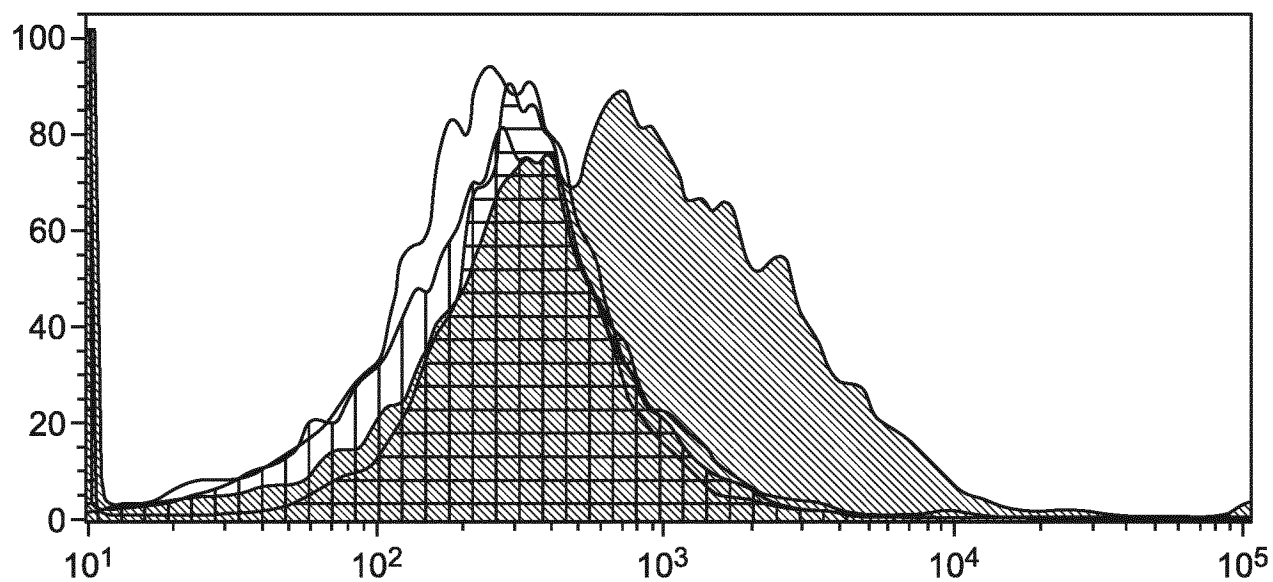
ФИГ. 2В



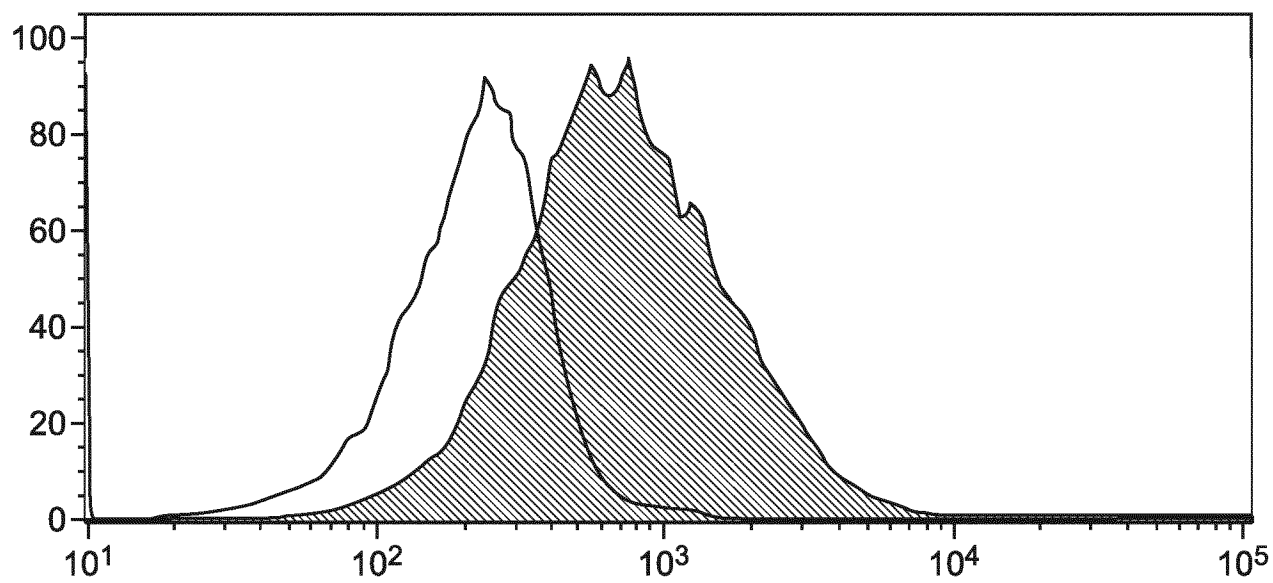
ФИГ. 2С



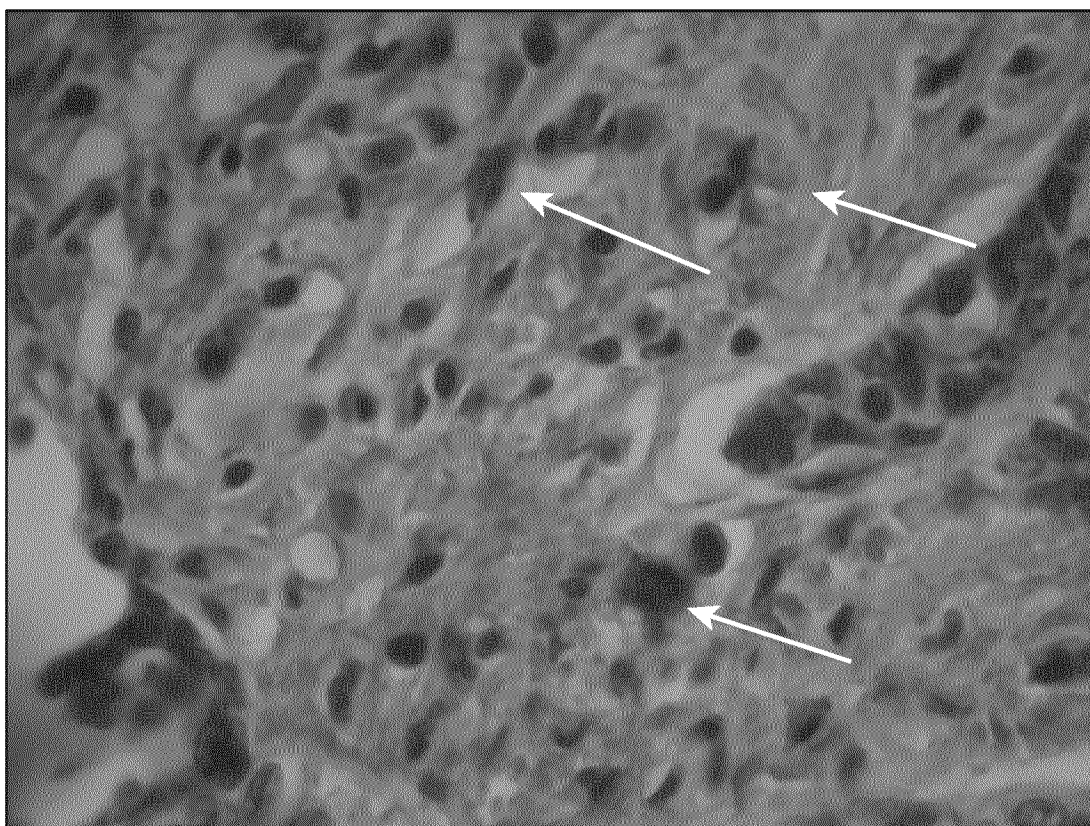
ФИГ. 2D



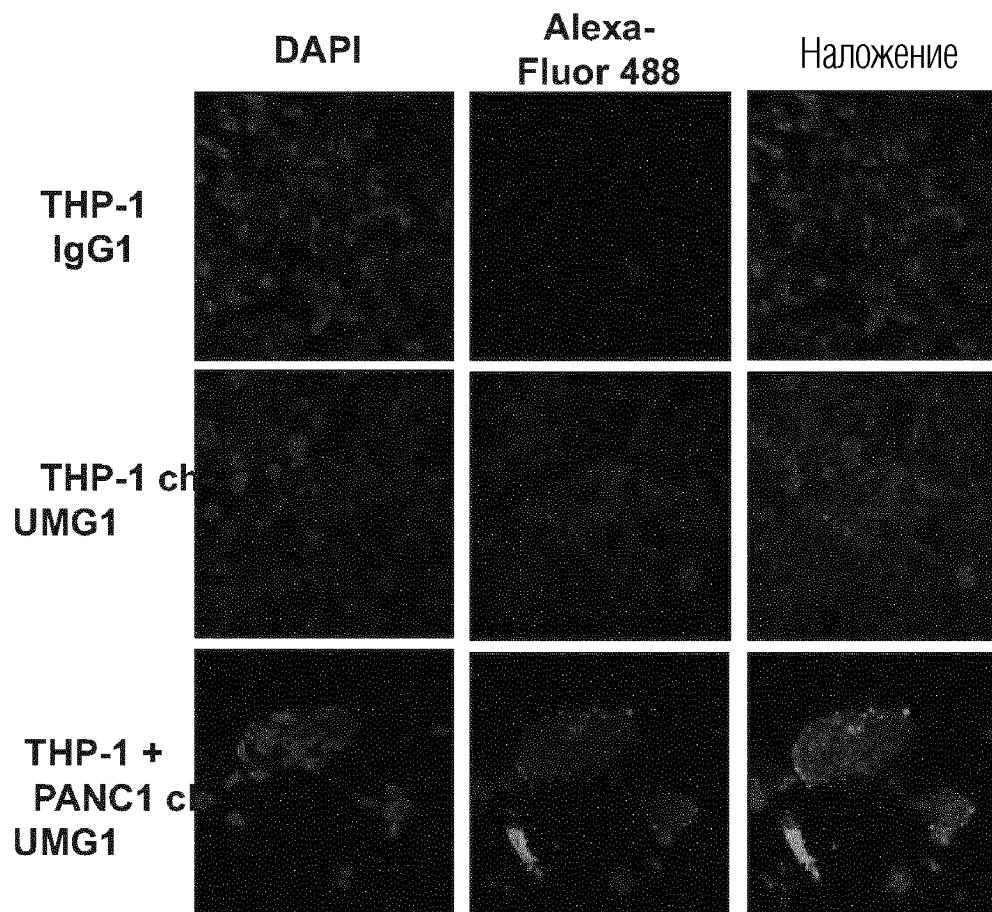
ФИГ. 3А



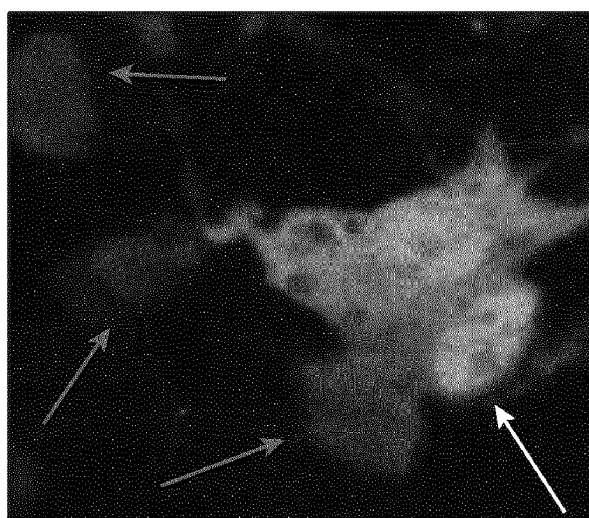
ФИГ. 3В



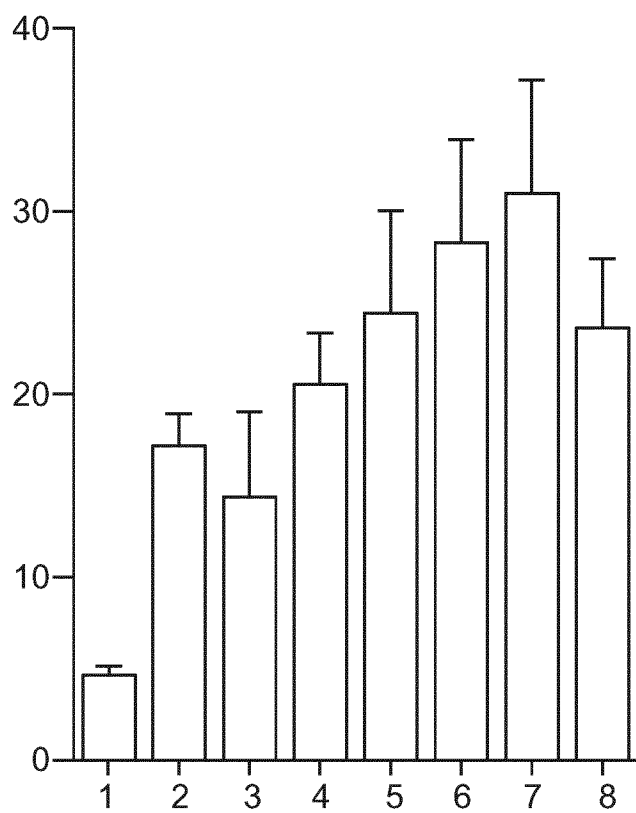
ФИГ. 4



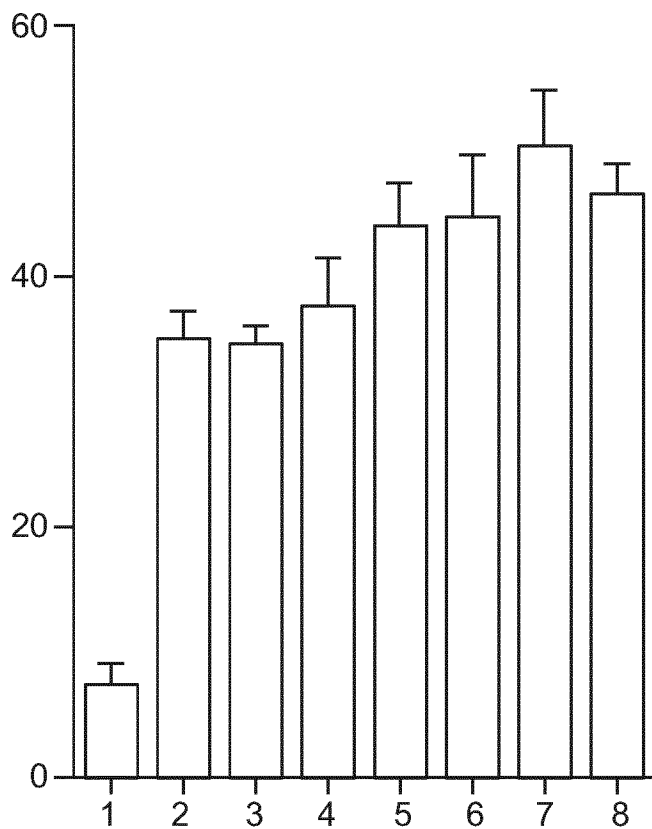
ФИГ. 5А



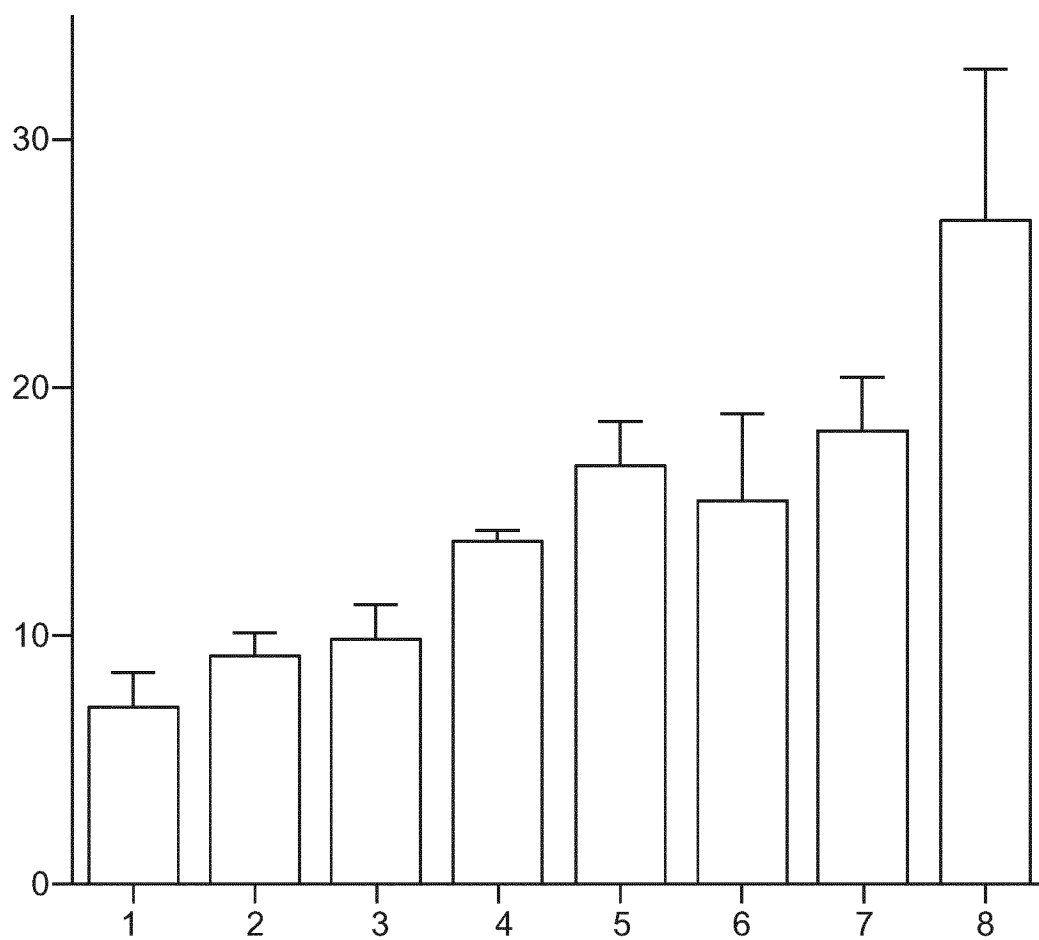
ФИГ. 5В



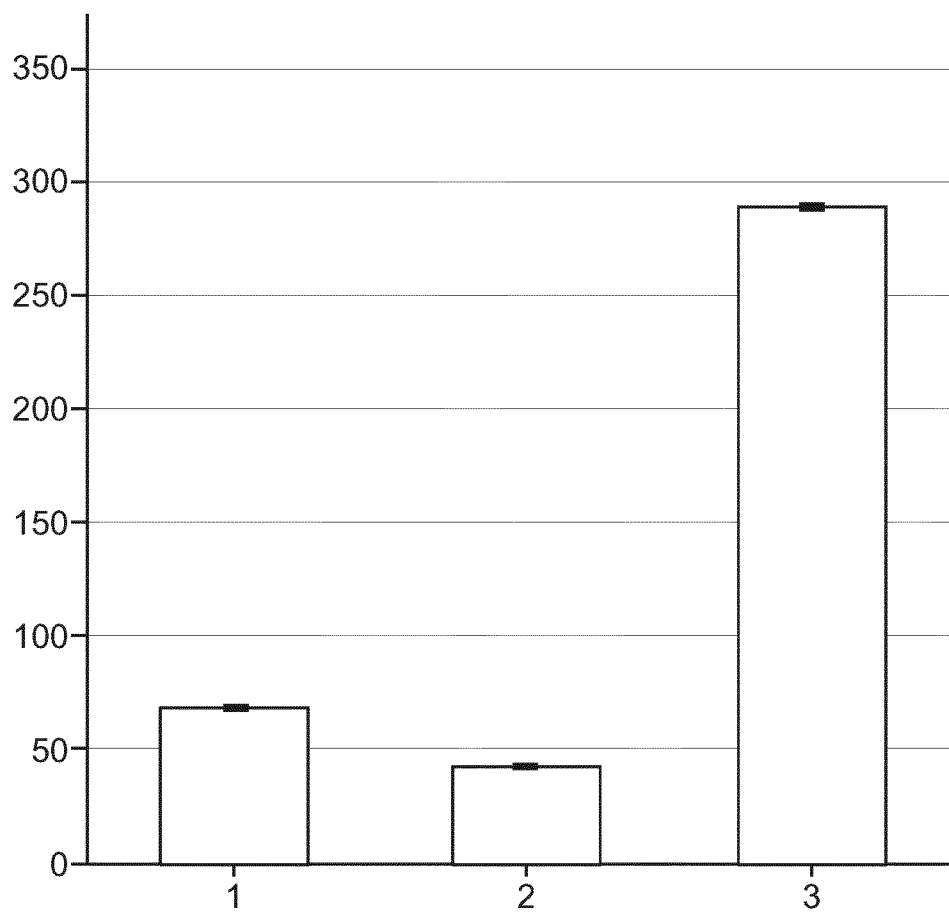
ФИГ. 6А



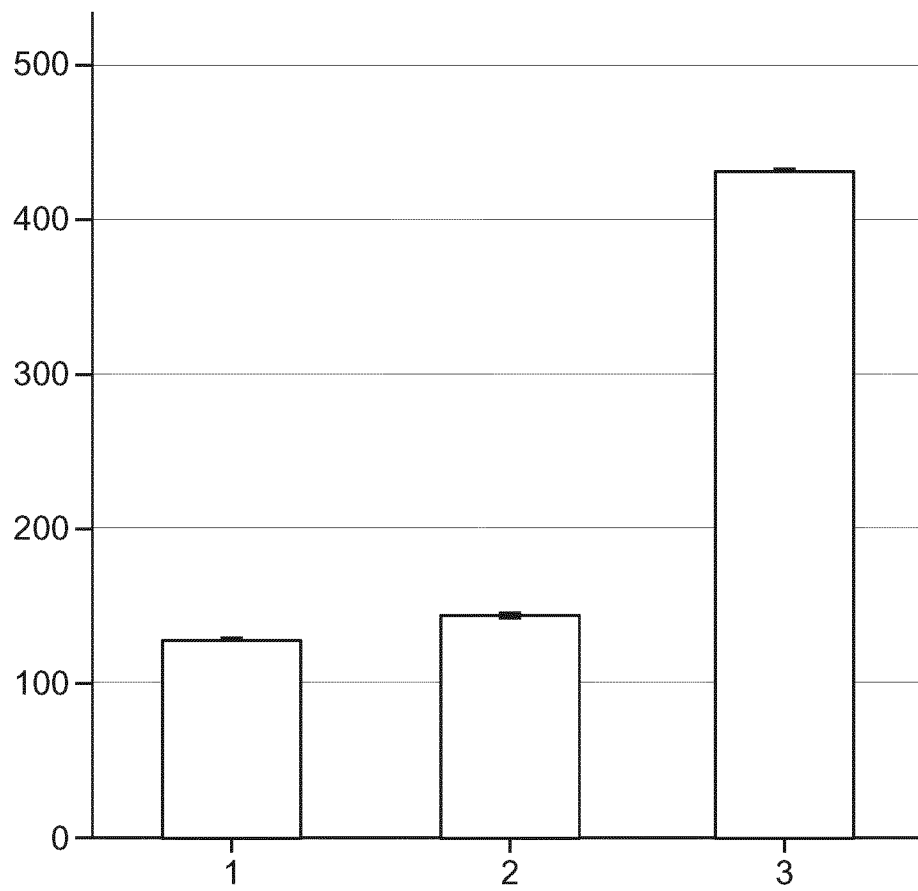
ФИГ. 6В



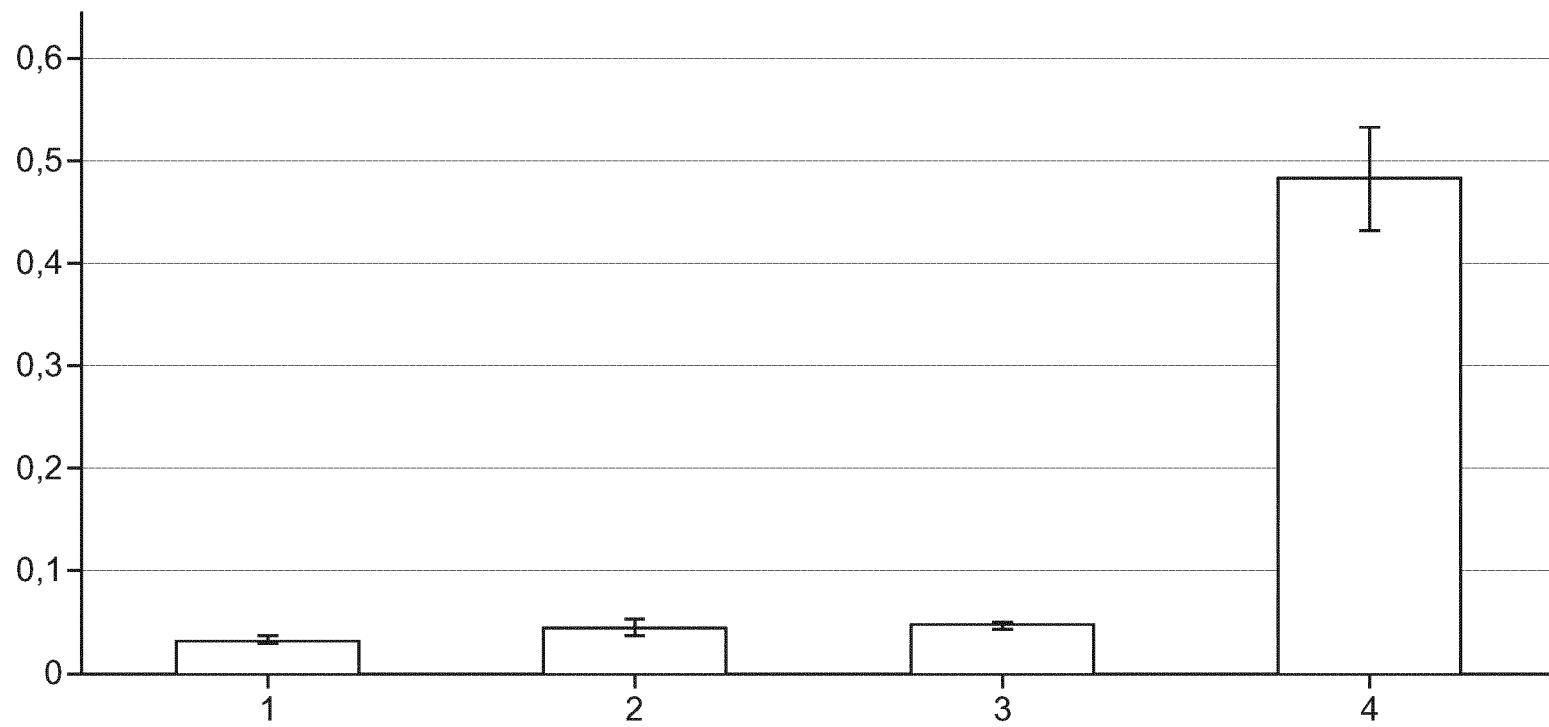
ФИГ. 7



ФИГ. 8

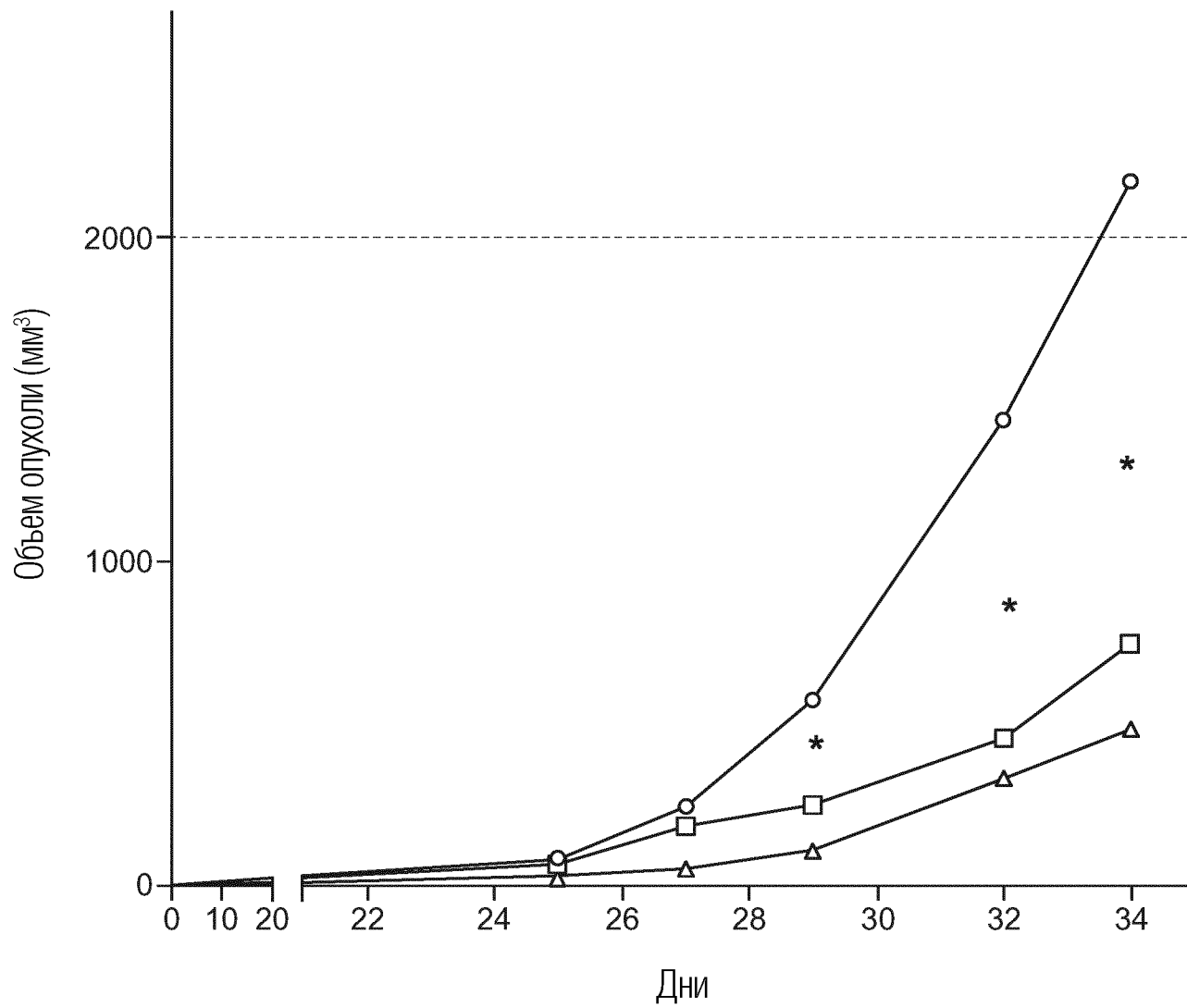


ФИГ. 9

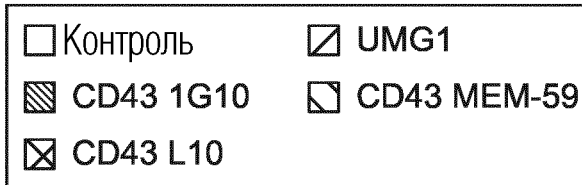


10/47

ФИГ. 10

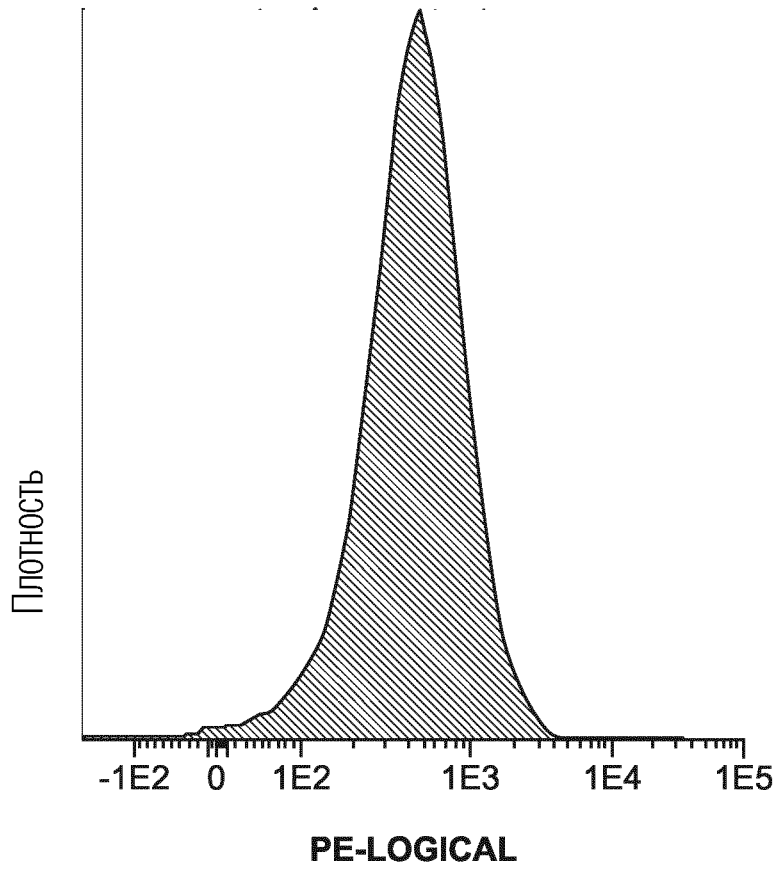


ФИГ. 11

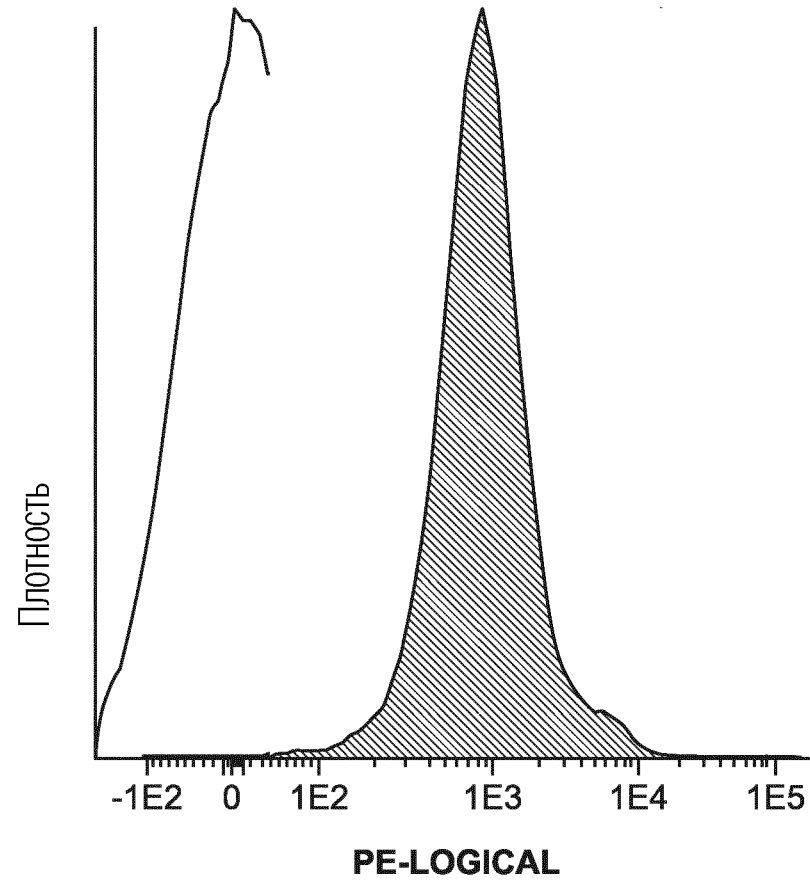


ALL-SIL

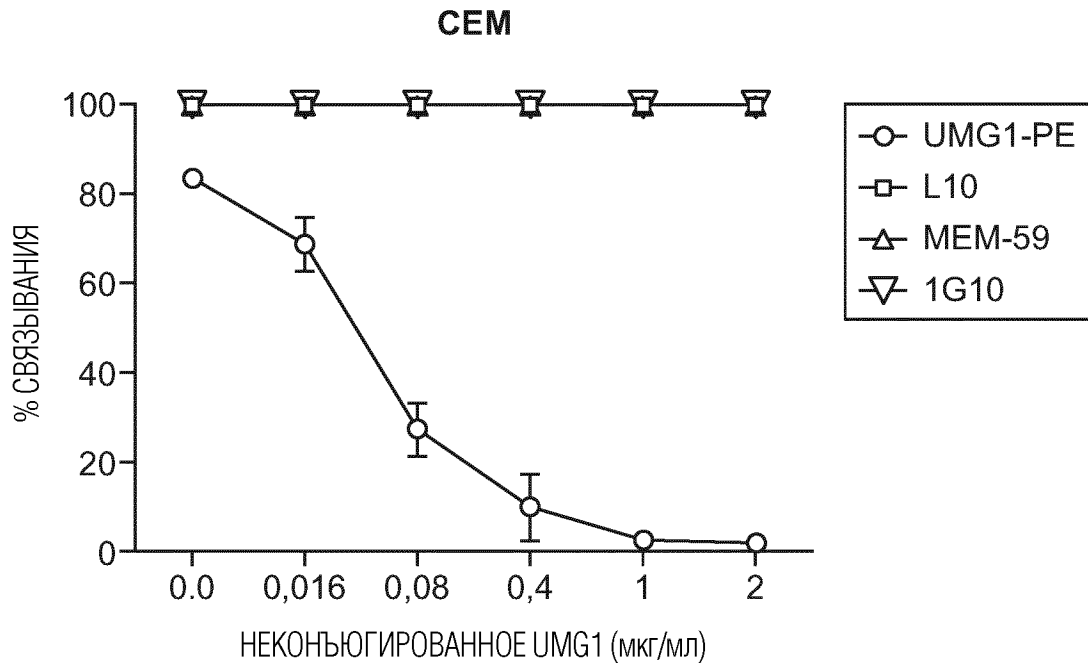
KE-37



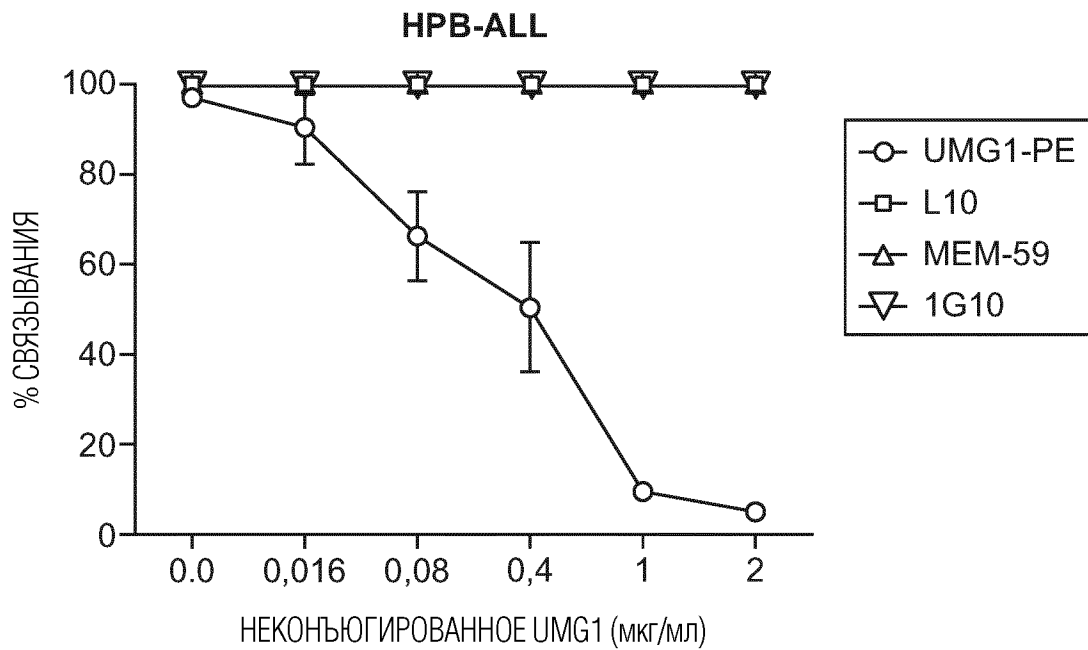
ФИГ. 12А



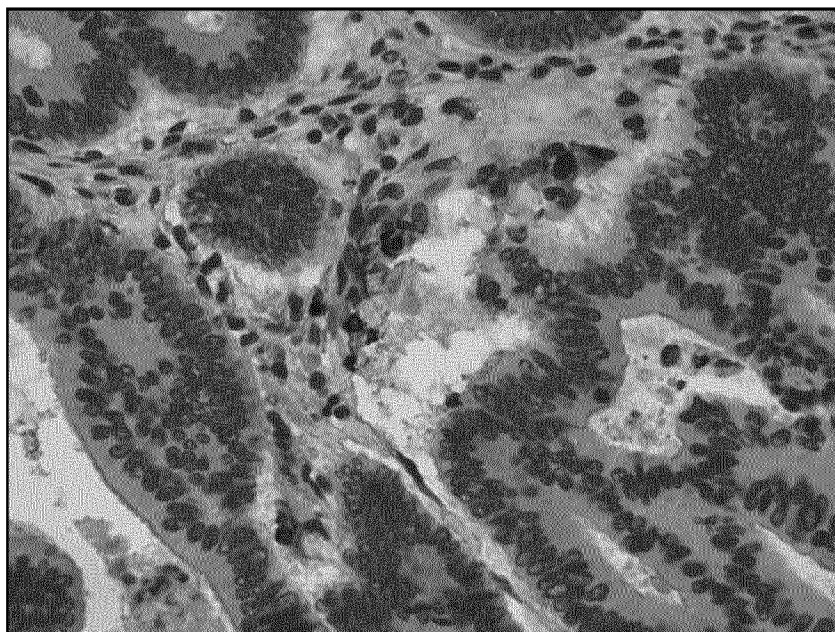
ФИГ. 12В



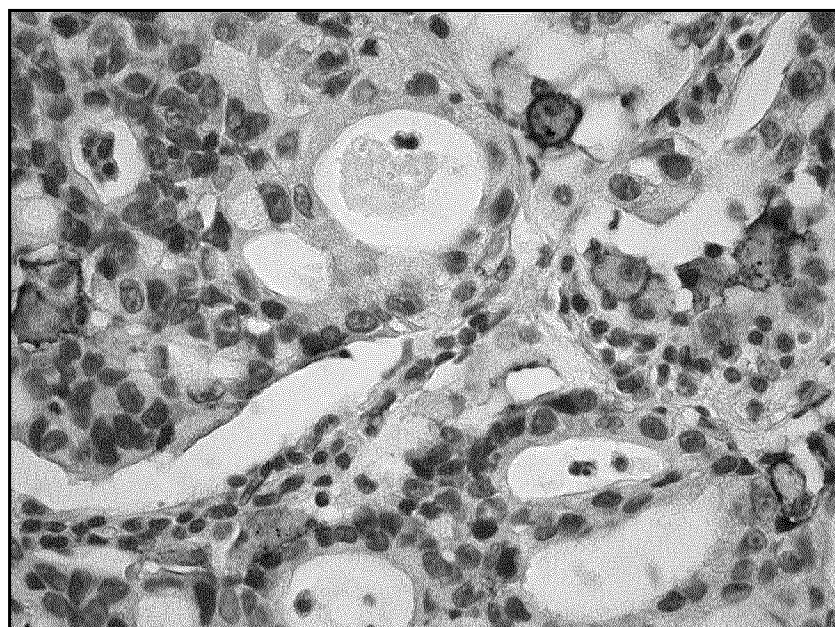
ФИГ. 13А



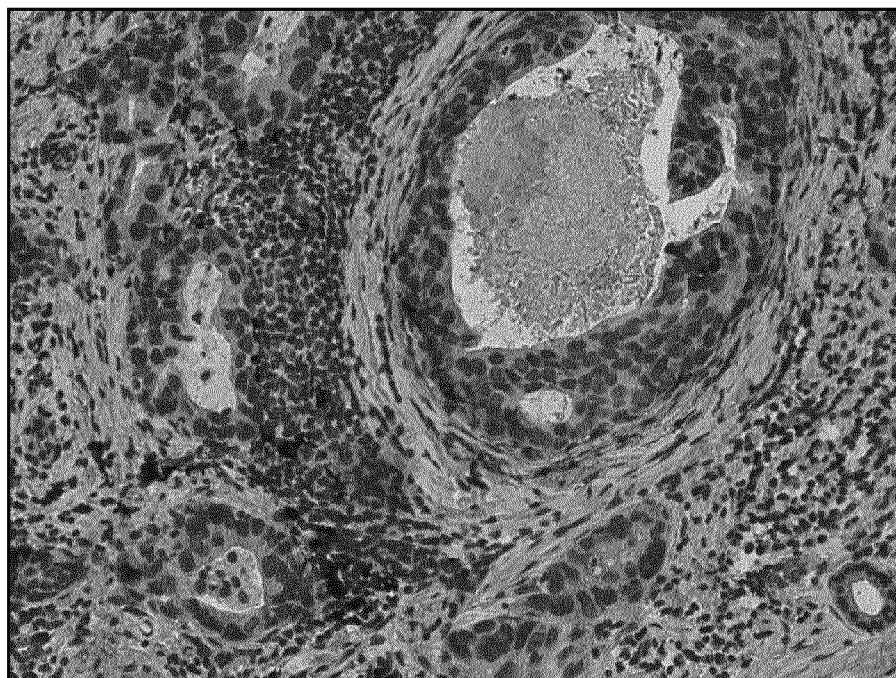
ФИГ. 13В



ФИГ. 14А

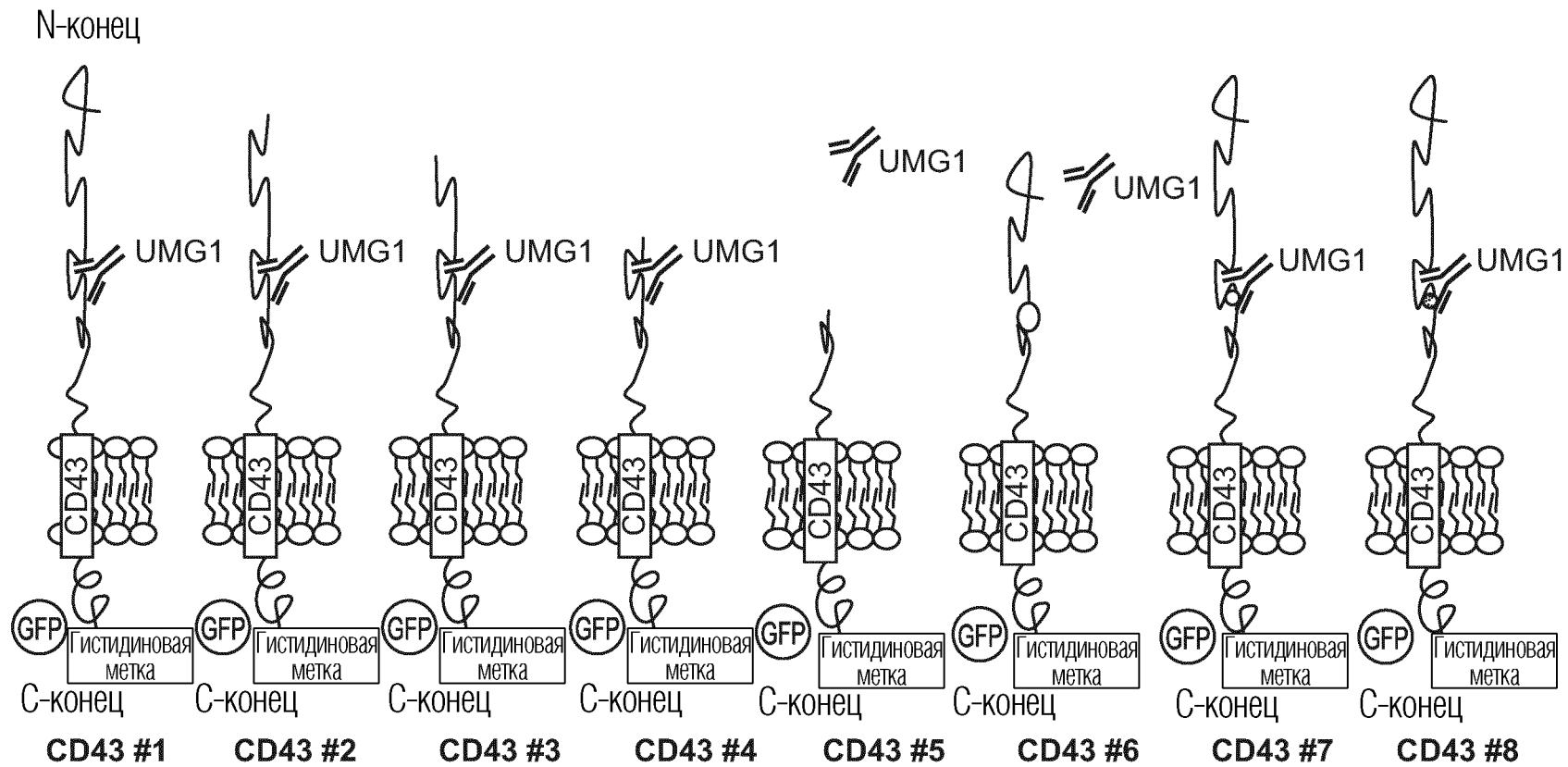


ФИГ. 14В

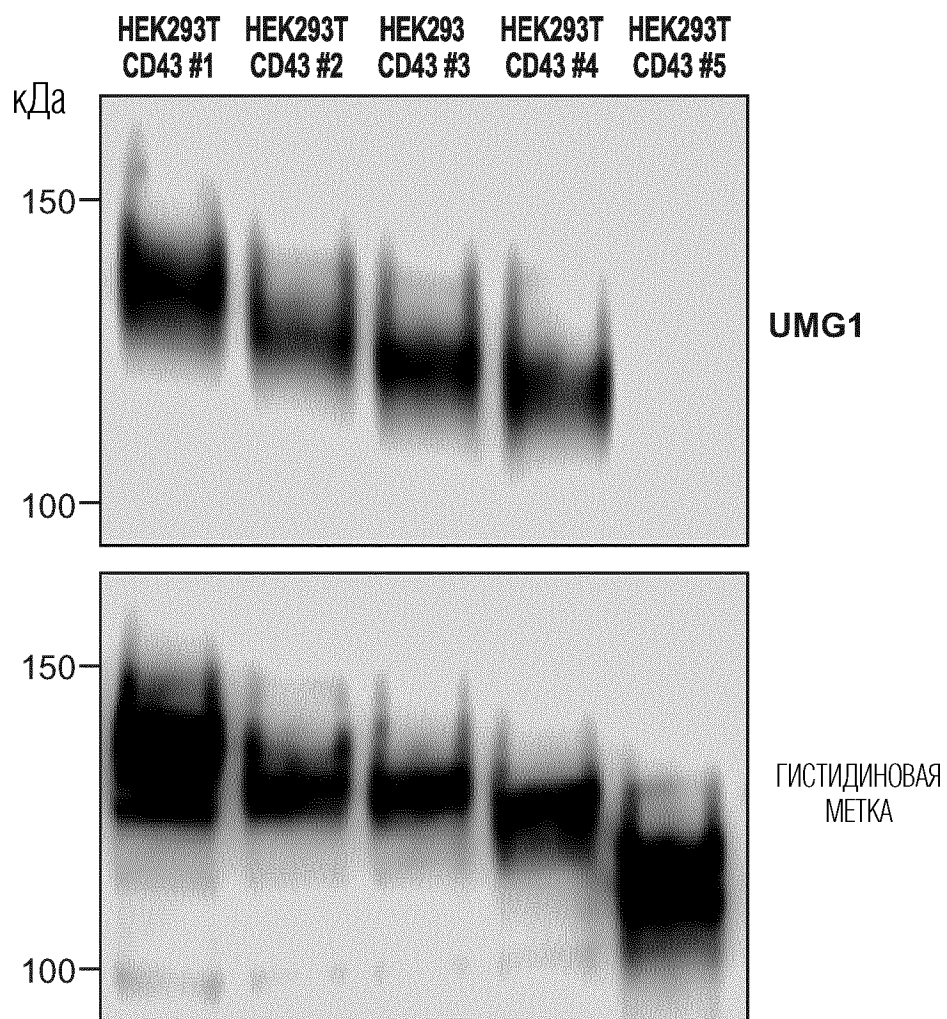


ФИГ. 14С

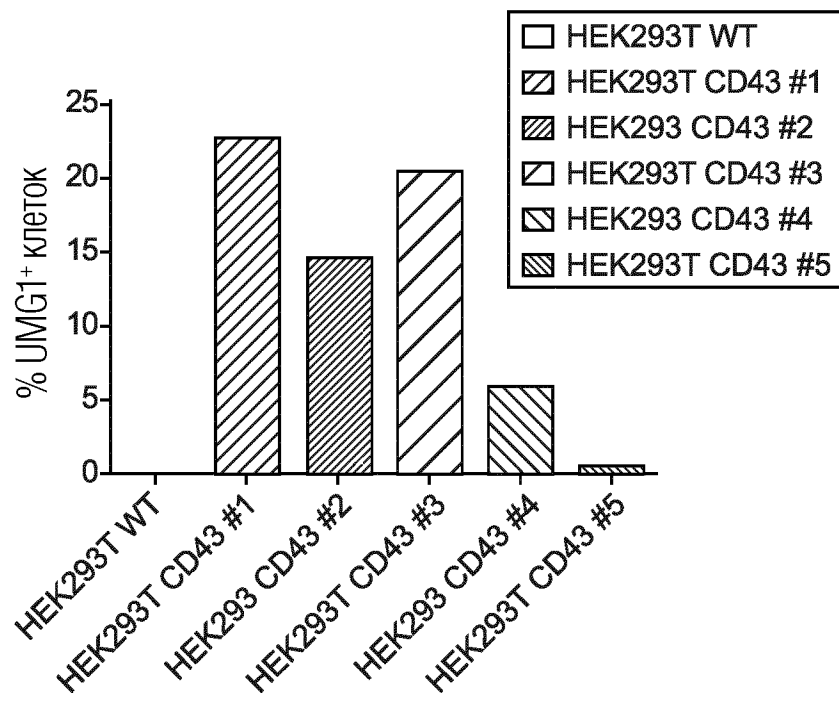
10	20	30	40	50
MATLLLLLGV	LVVSPDALGS	TTAVQTP TSG	EPLVSTSEPL	SSKMYTTSIT
60	70	80	90	100
SDPKADSTGD	QTSALPPSTS	INEGSPLWTS	IGASTGSPLP	EPTTYQEVSI
110	120	130	140	150
KMSSVPQETP	HATSHPAVPI	TANSLGSHTV	TGGTITTNSP	ETSSRTSGAP
160	170	180	190	200
VTTAASSLET	SRGTSGPPLT	MATVSLETSK	GTS GPPVTMA	TDSLETSTGT
210	220	230	240	250
TGPPVTMTTG	SLEPSSGASG	PQVSSVKLST	MMSPTTSTNA	STVPFRNPDE
260	270	280	290	300
NSRGMLPVAV	LVAL LAVIVL	VALLLLWRRR	QKRRTGALVL	SRGGKRNGVV
310	320	330	340	350
DAWAGPAQVP	EEGAVTVTVG	GSGGDKGSGF	PDGEGSSRRP	TLTTFFGRRK
360	370	380	390	400
SRQGLAMEE	LKSGSGPSLK	GEEEPLVASE	DGAVDAPAPD	EPEGGDGAAP



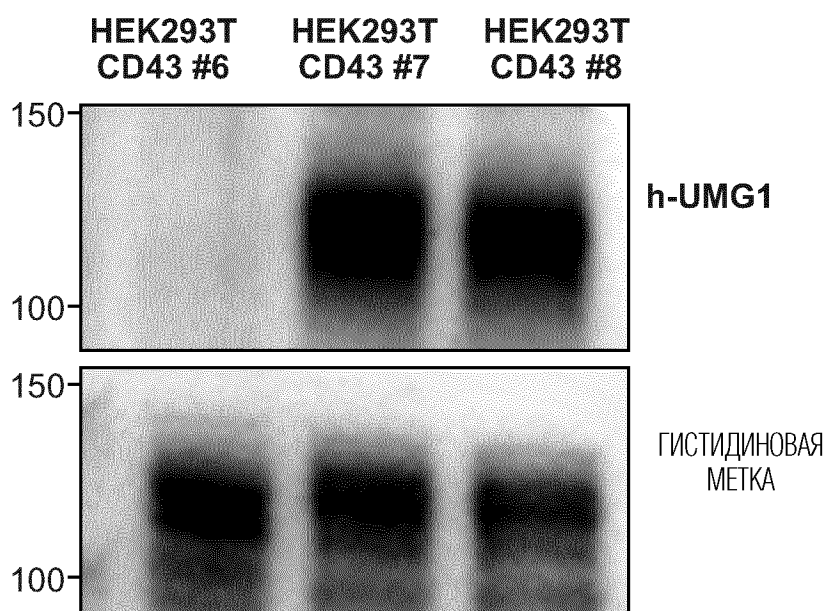
ФИГ. 15В



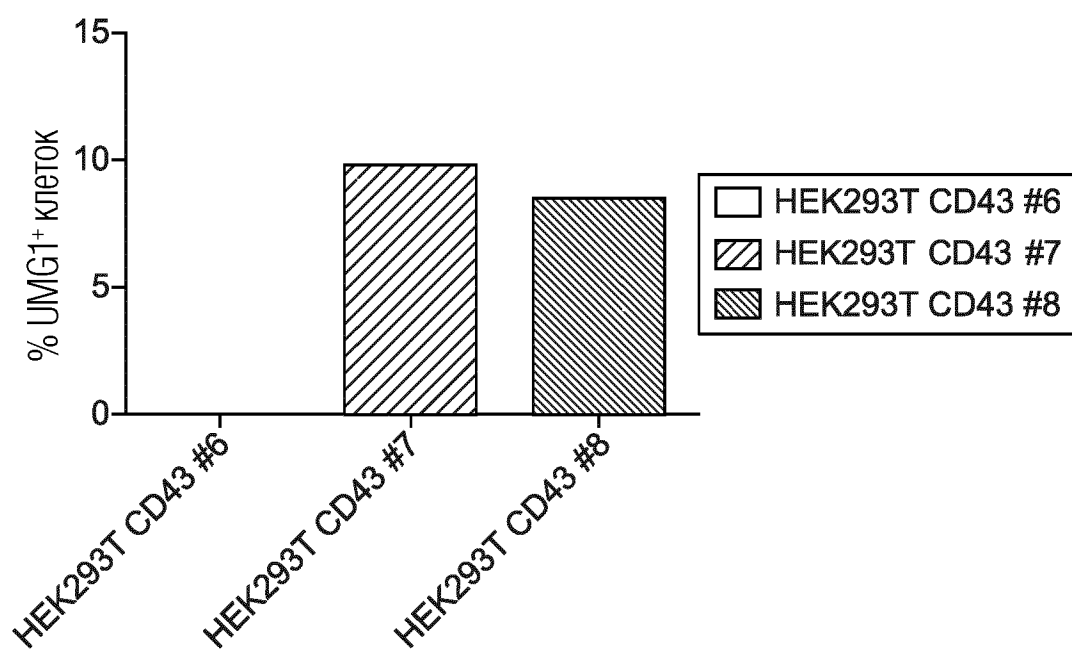
ФИГ. 15С



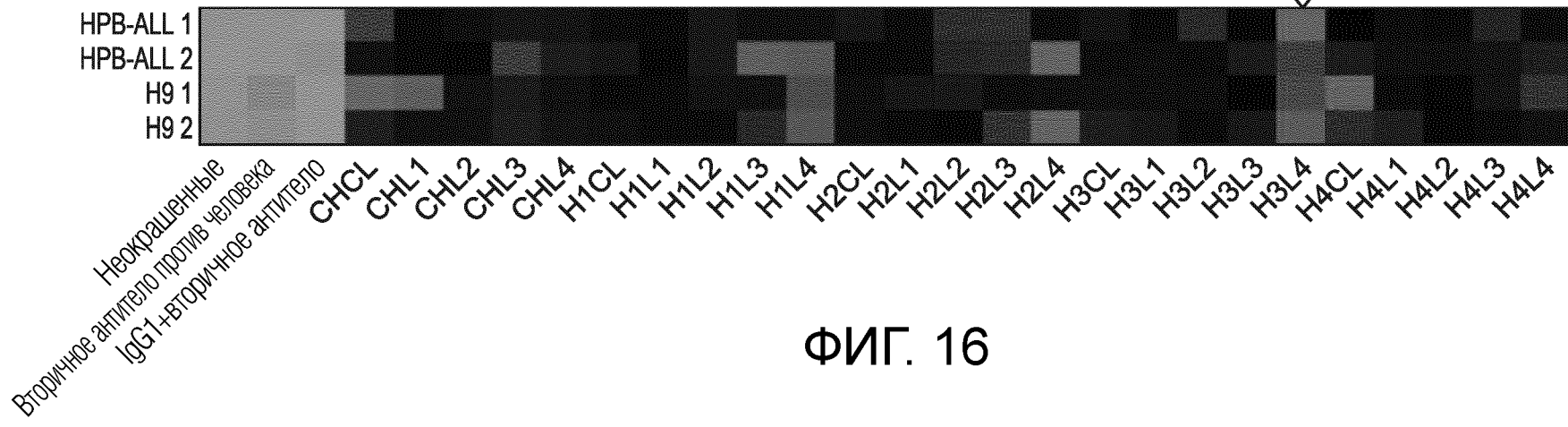
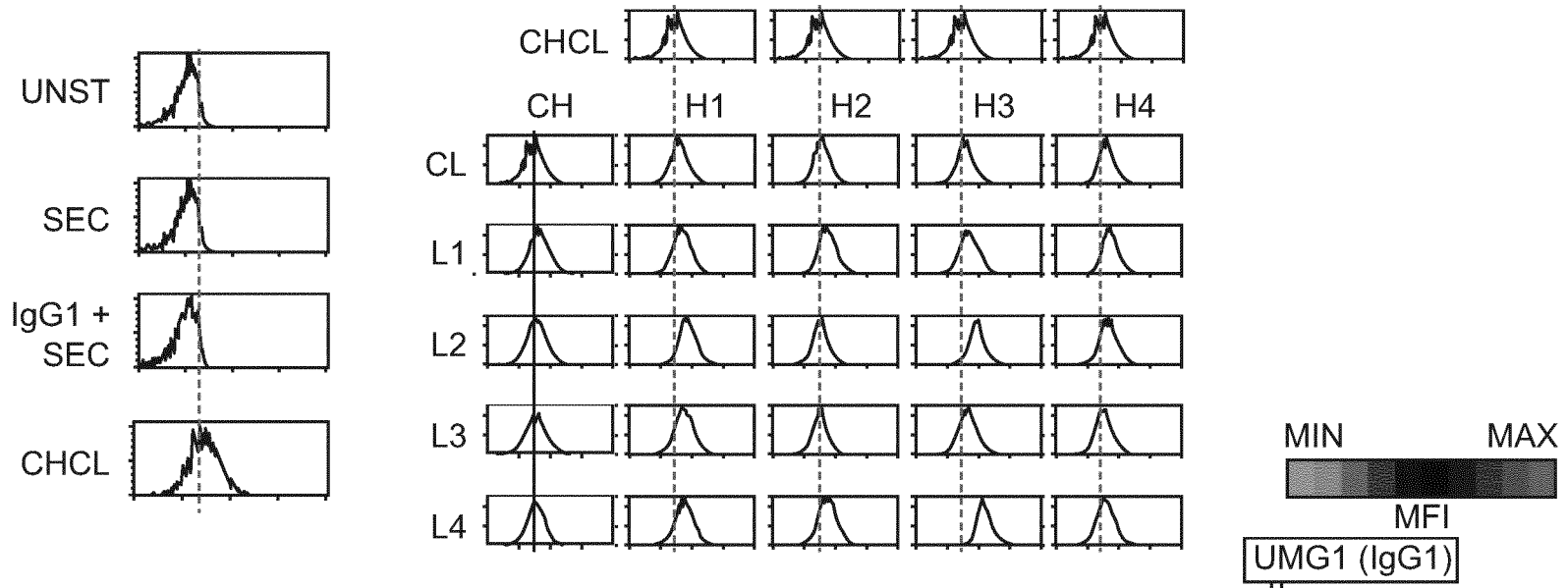
ΦΙΓ. 15D



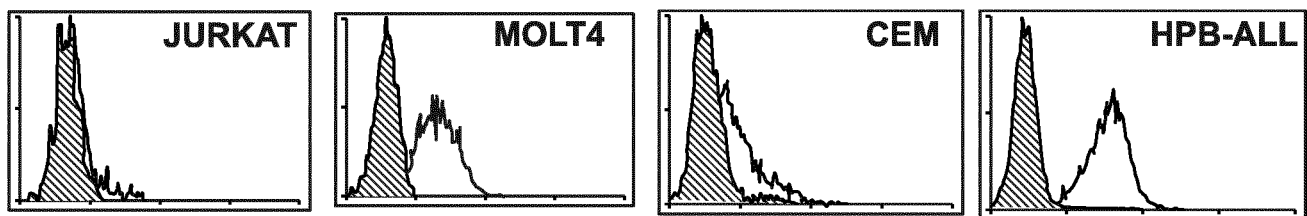
ФИГ. 15Е



ФИГ. 15F

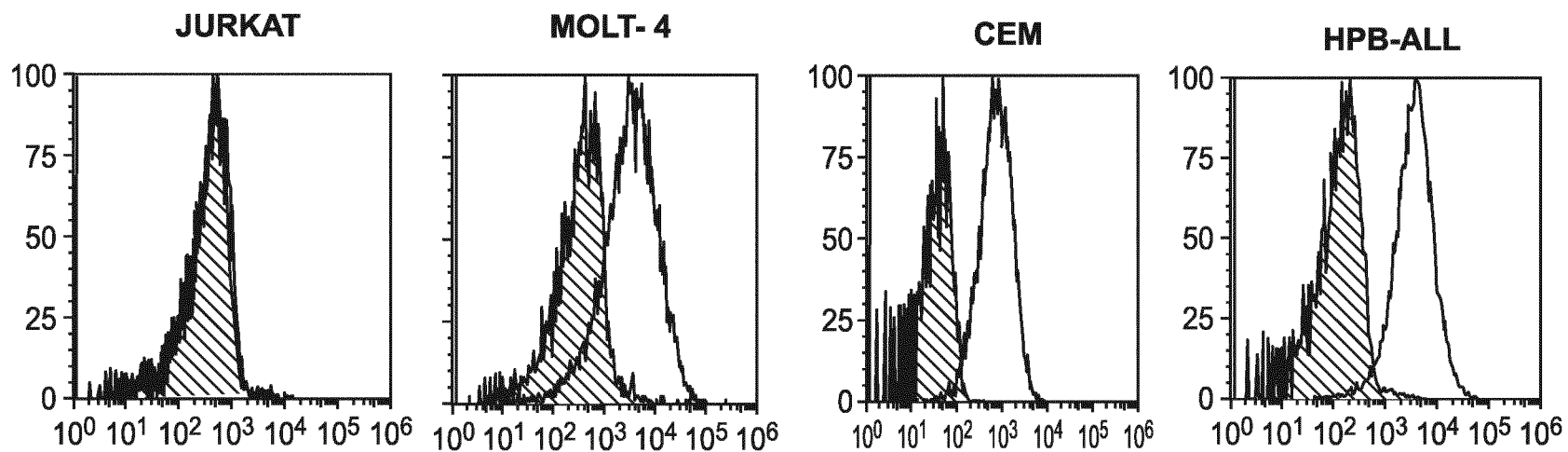


ФИГ. 16



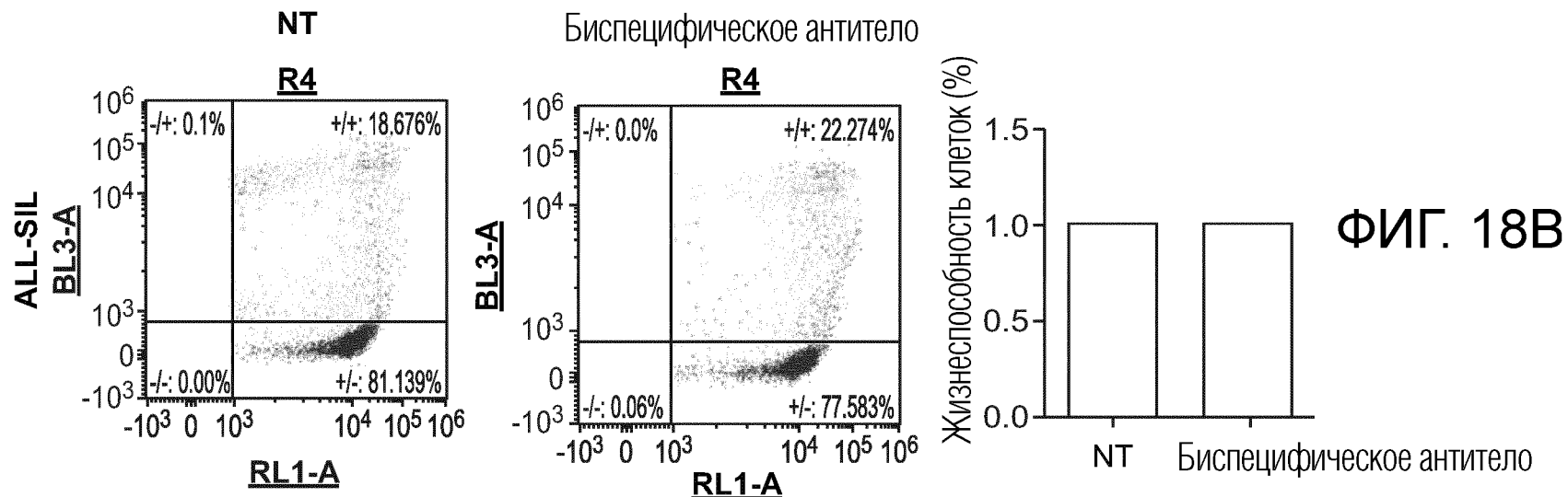
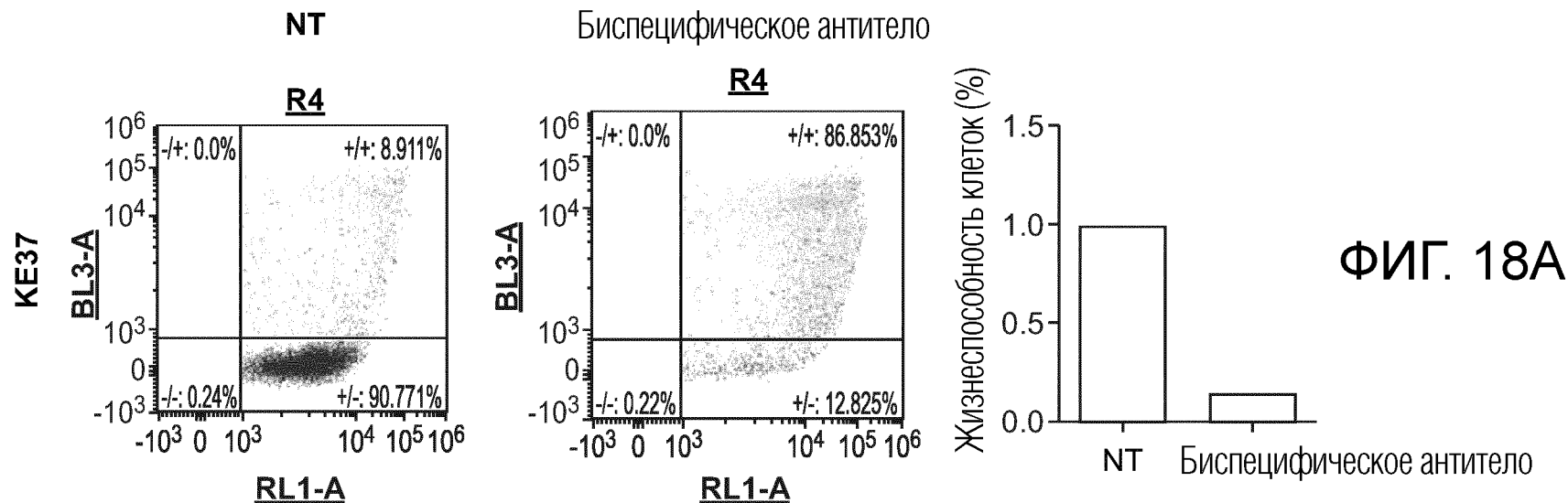
Tassone et al, 1994

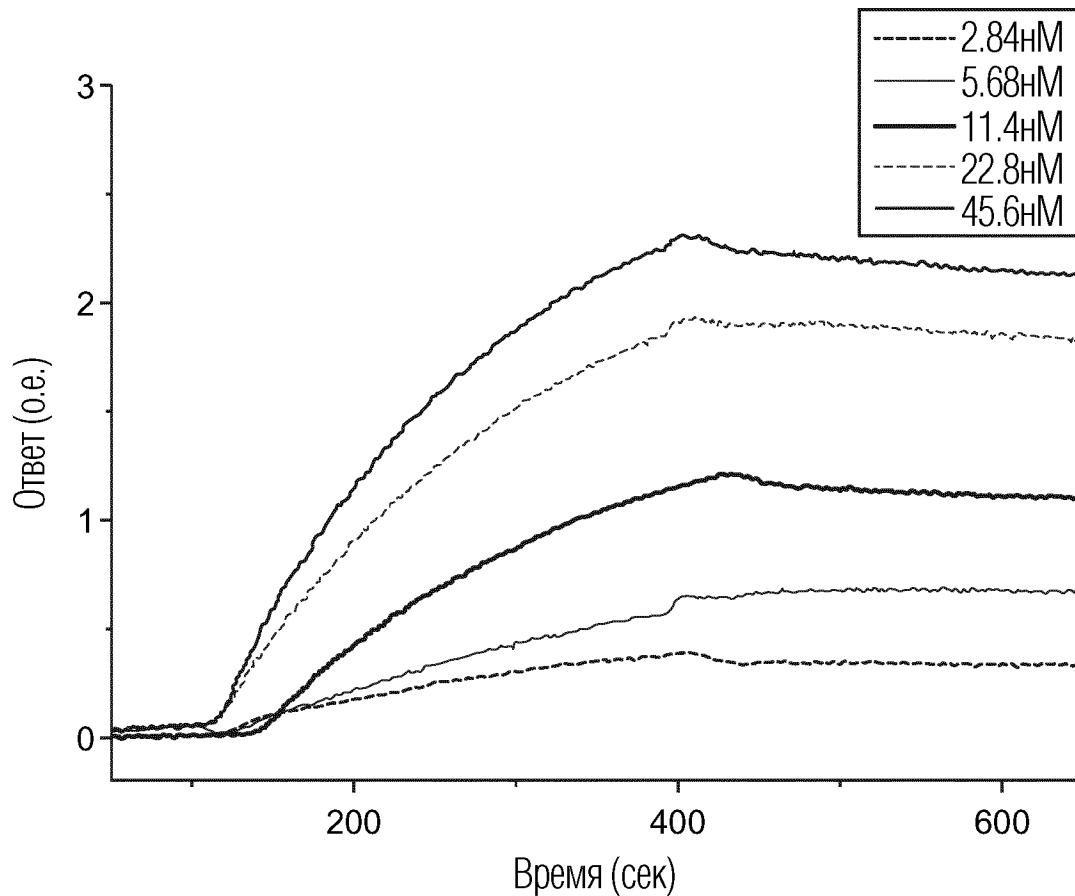
ФИГ. 17А



ФИГ. 17В

РВМС Е:Т 20:1,
 Биспецифическое антитело UMG1-CD3, 1 мкг/мл

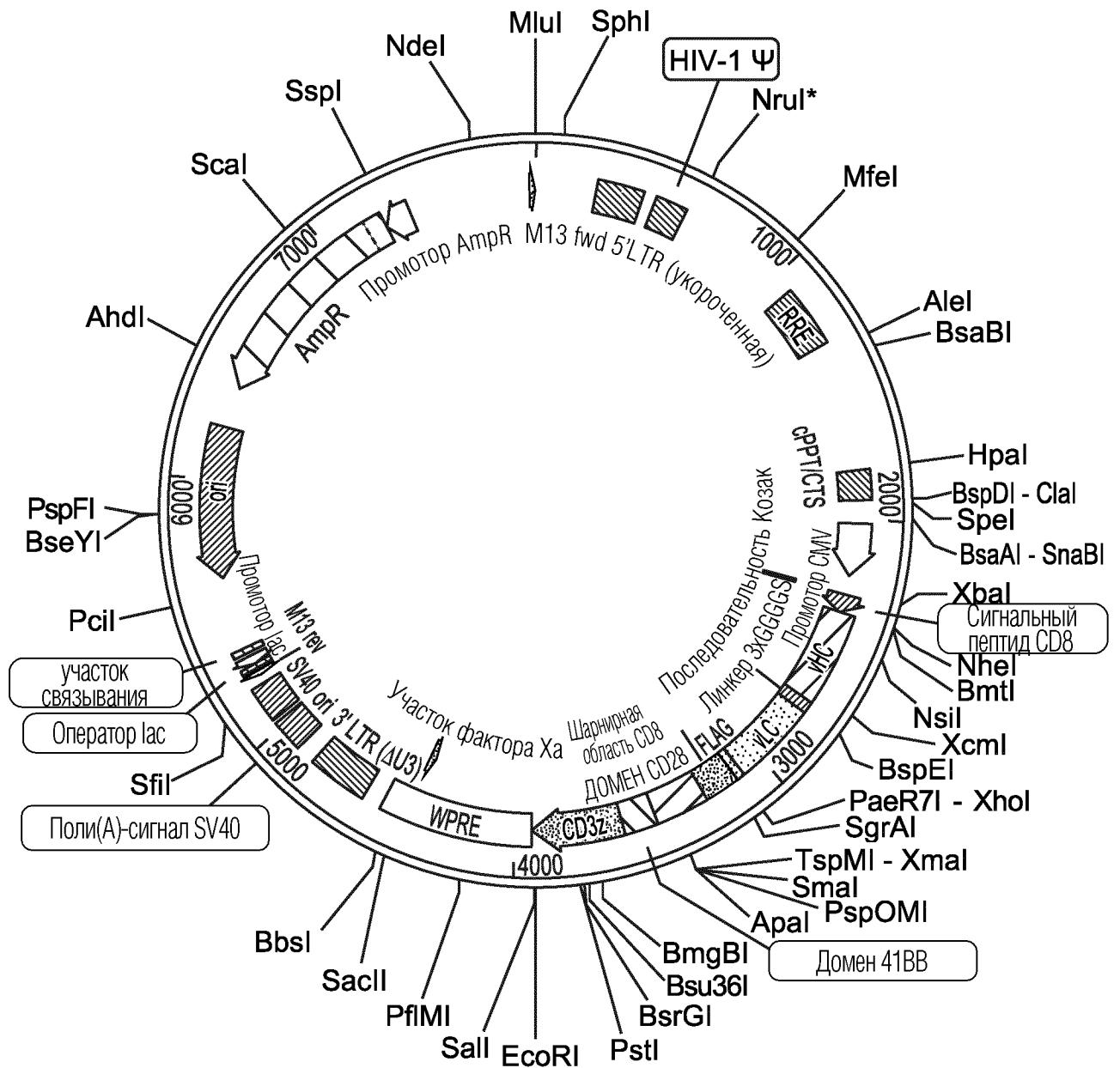




Лиганд	Гуманизированное антитело UMGI
Аналит	Рекомбинантный CD43 человека (аминокислоты 20-253)

Результат	Равновесная константа диссоциации (K_D)	$9,94 \times 10^{-8}$ М, или 99,4 нМ
	Кинетическая константа ассоциации (k_a)	$5,14 \times 10^3$ М ⁻¹ с ⁻¹
	Кинетическая константа диссоциации (k_d)	$5,11 \times 10^{-4}$ с ⁻¹

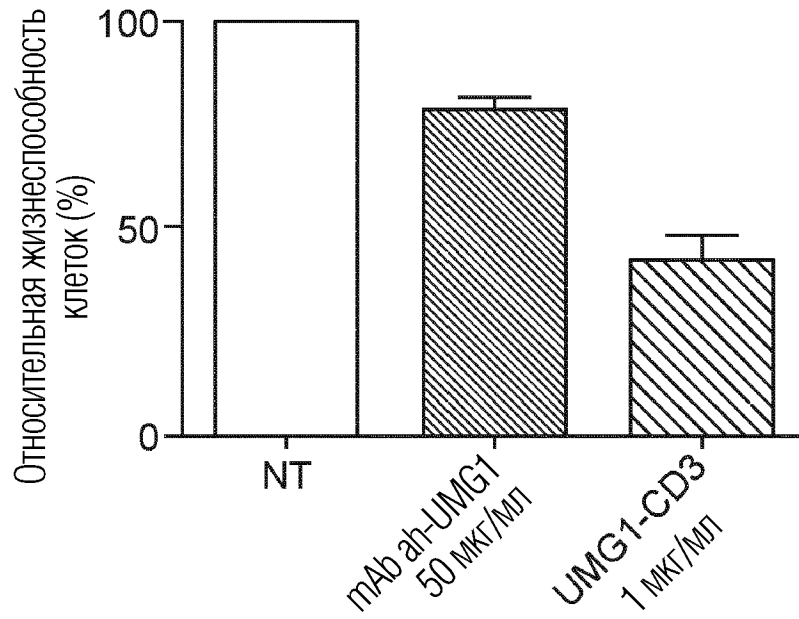
ФИГ. 19



ФИГ. 20

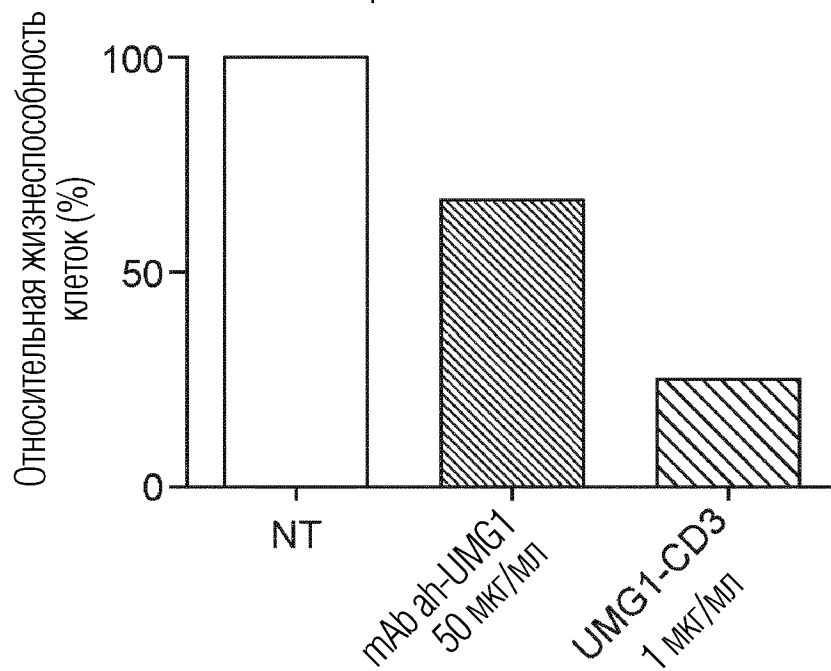
27/47

CEM

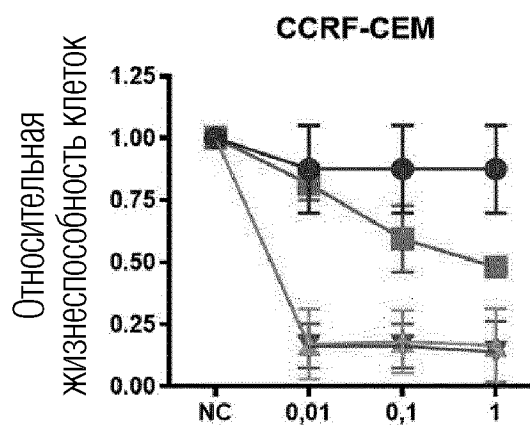


ФИГ. 21А

Первичные клетки T-ALL

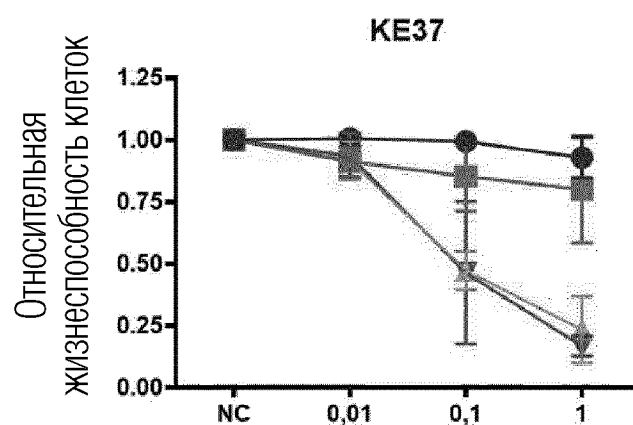


ФИГ. 21В

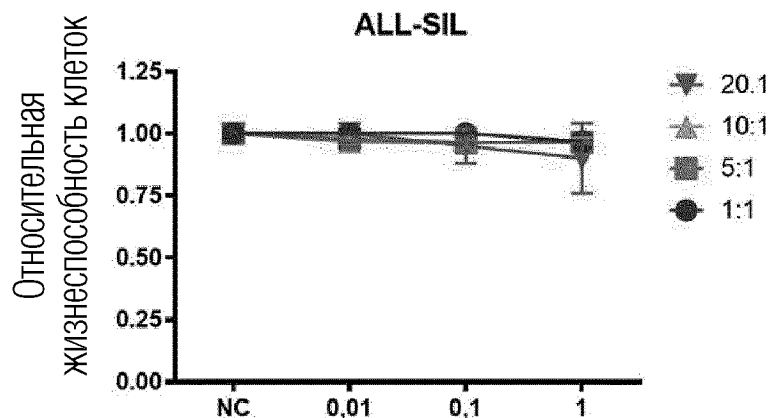


Биспецифическое антитело UMG1-CD3 (мкг/мл) Биспецифическое антитело UMG1-CD3 (мкг/мл)

ФИГ. 22А

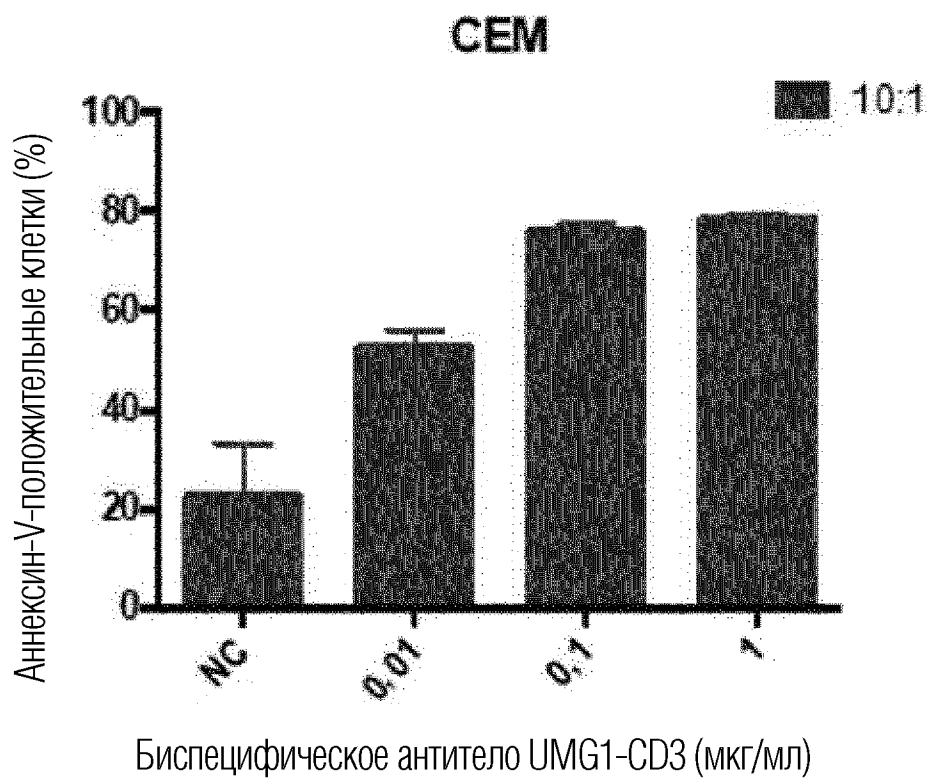


ФИГ. 22В

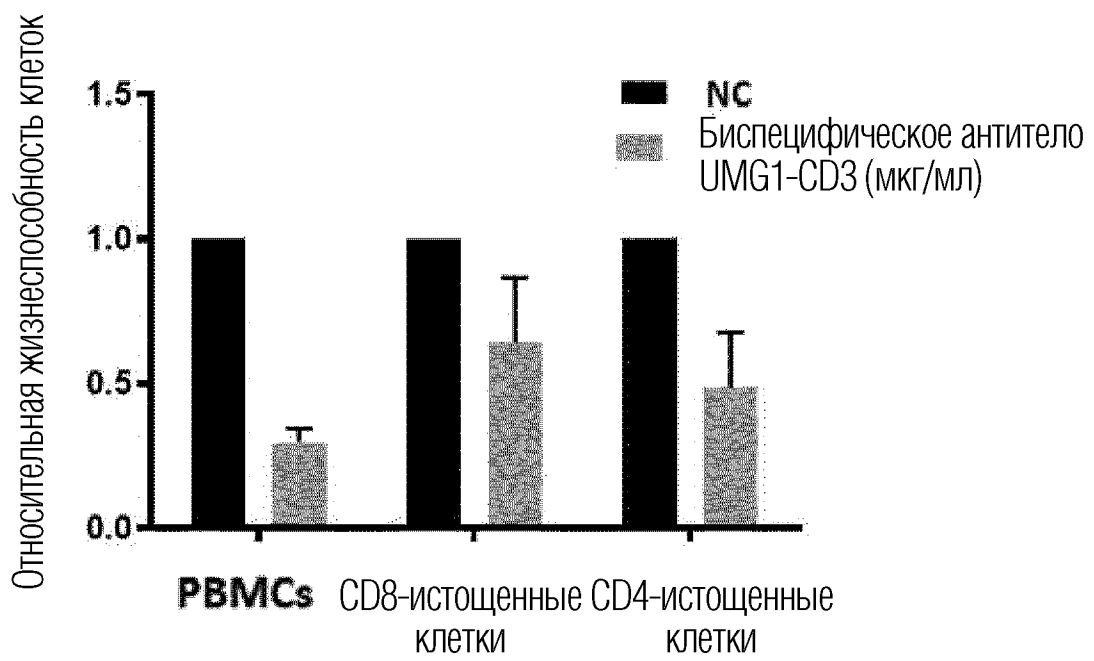


Биспецифическое антитело UMG1-CD3 (мкг/мл)

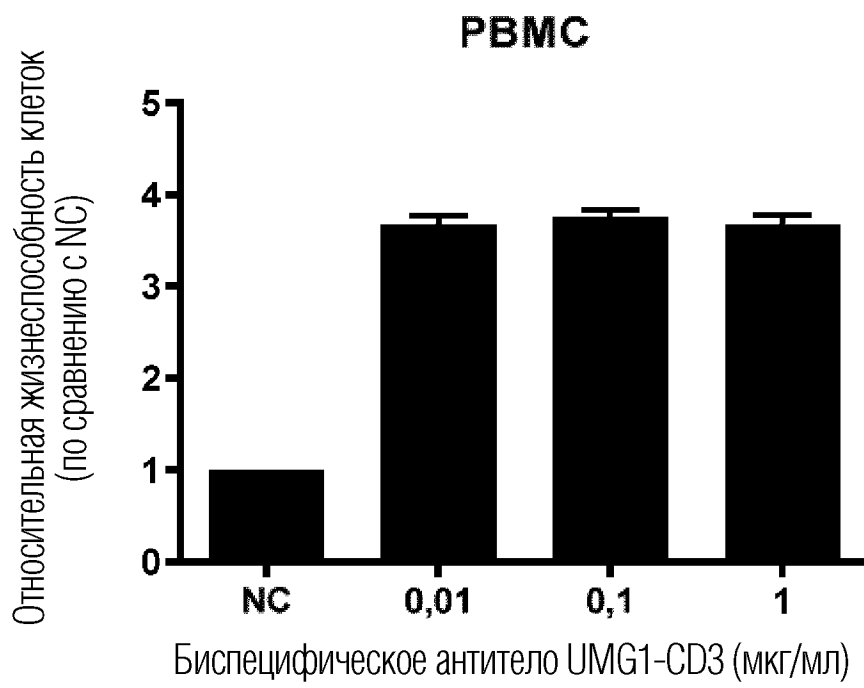
ФИГ. 22С



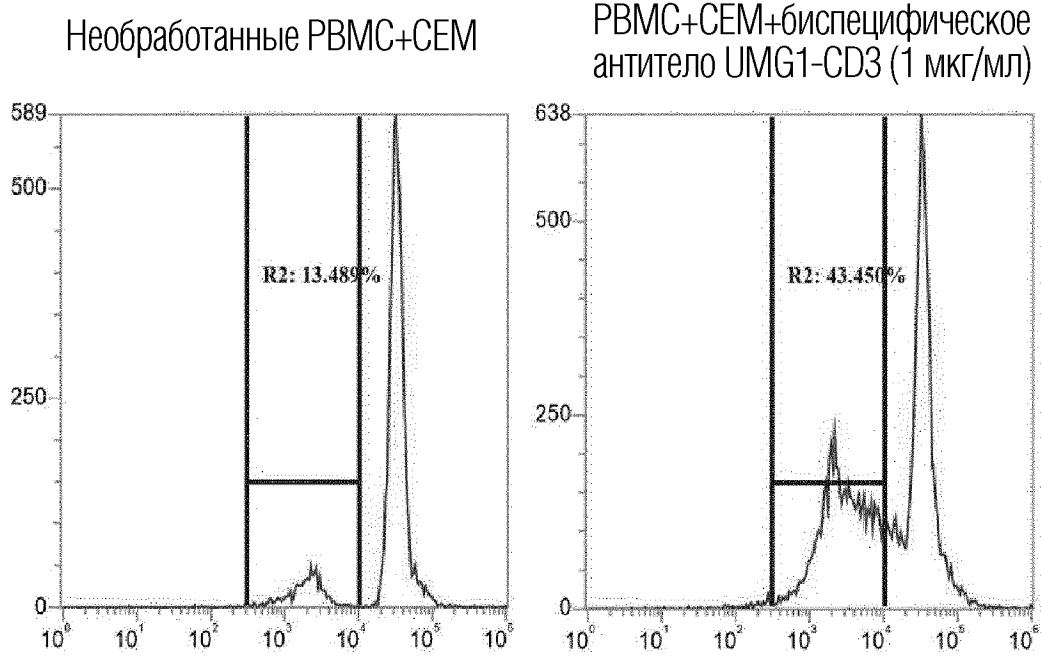
ФИГ. 23



ФИГ. 24

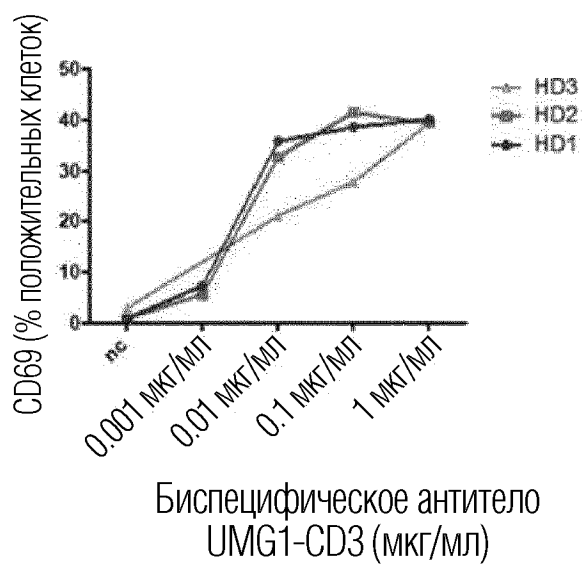


ФИГ. 25

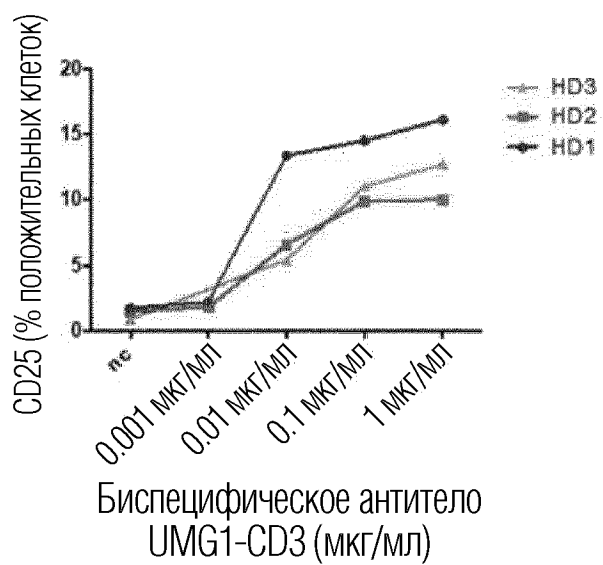


ФИГ. 26А

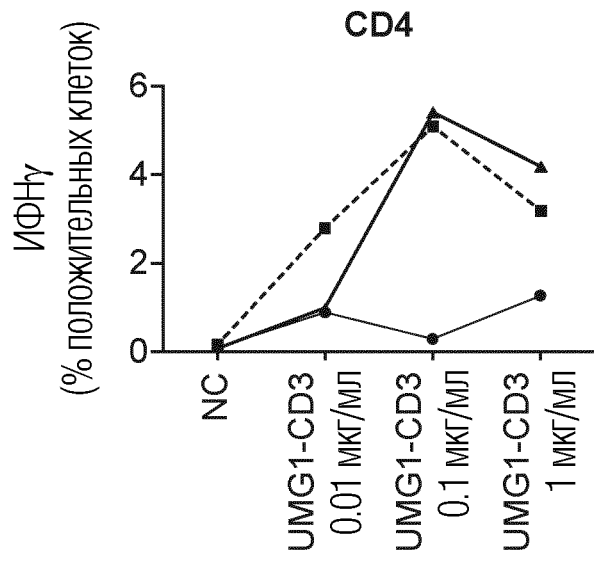
ФИГ. 26В



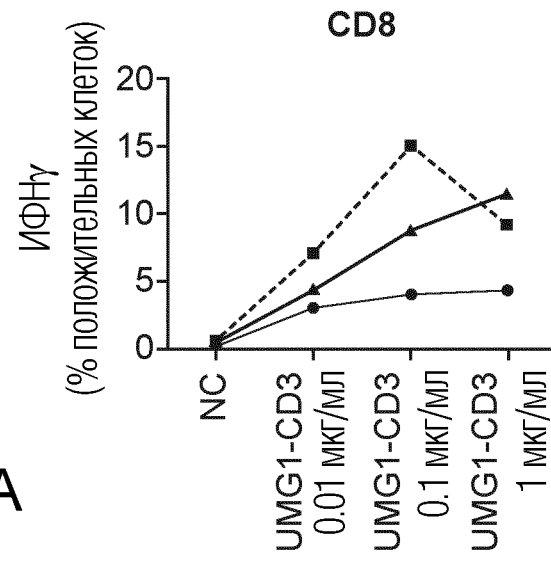
ФИГ. 27А



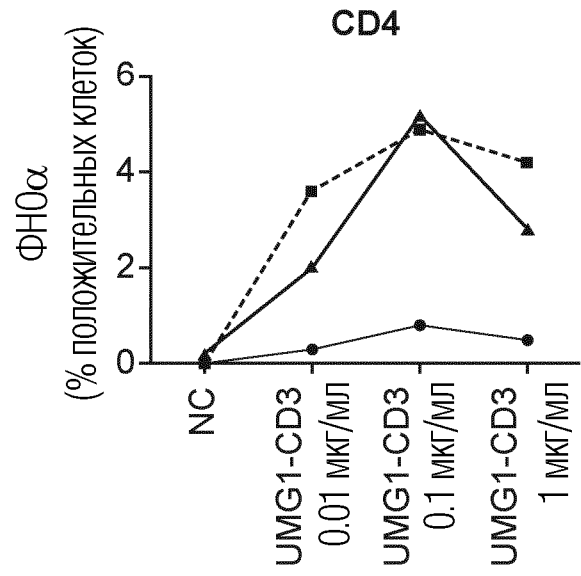
ФИГ. 27В



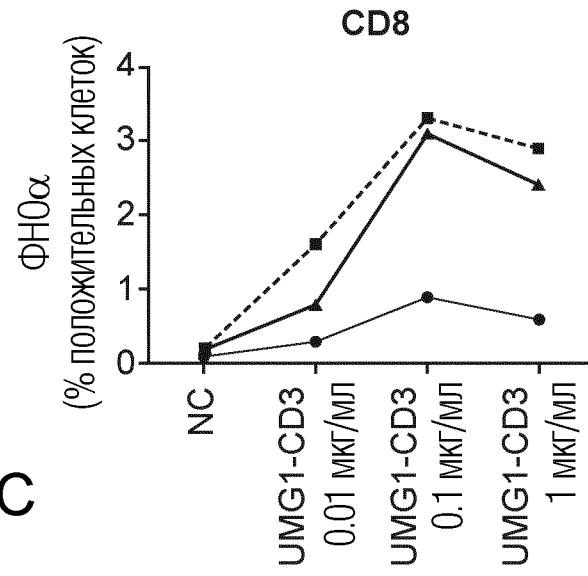
ФИГ. 28А



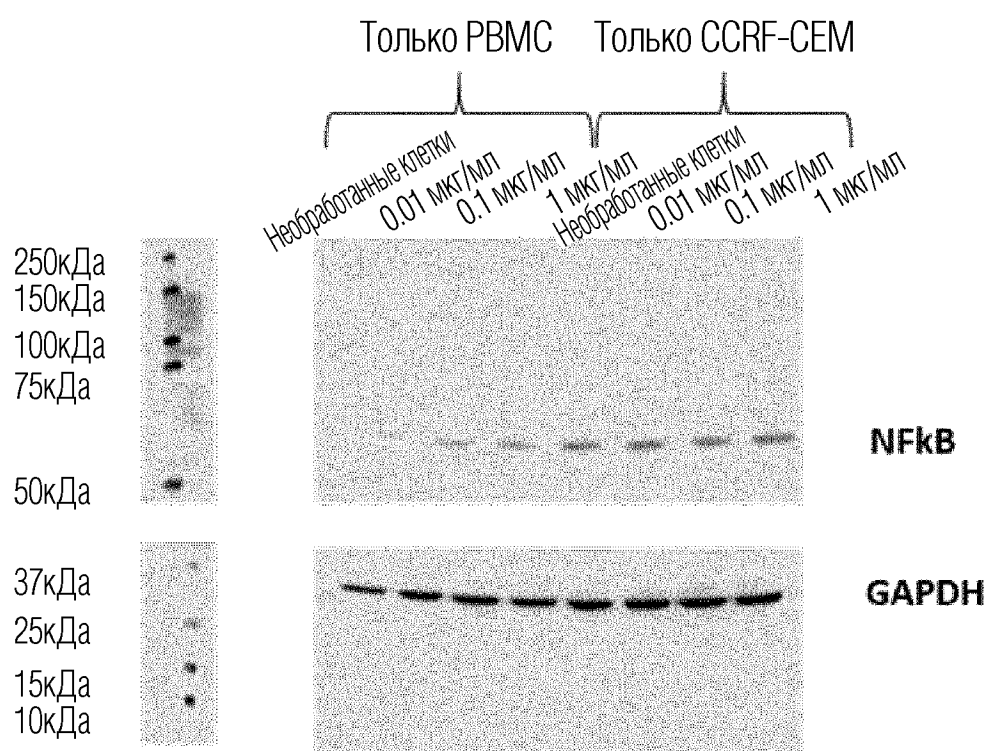
ФИГ. 28В



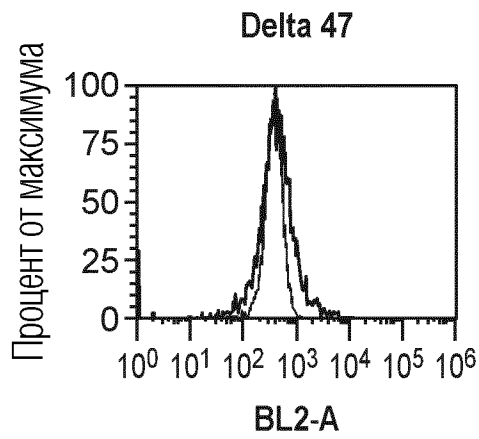
ФИГ. 28С



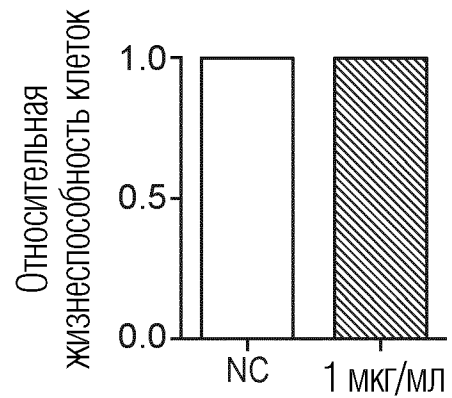
ФИГ. 28D



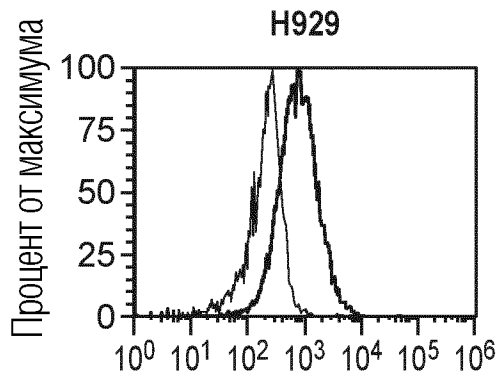
ФИГ. 29



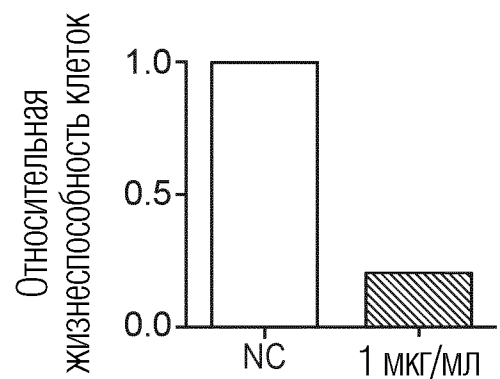
ФИГ. 30А



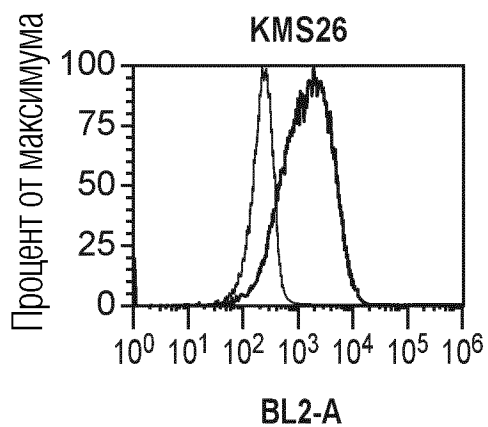
ФИГ. 30В



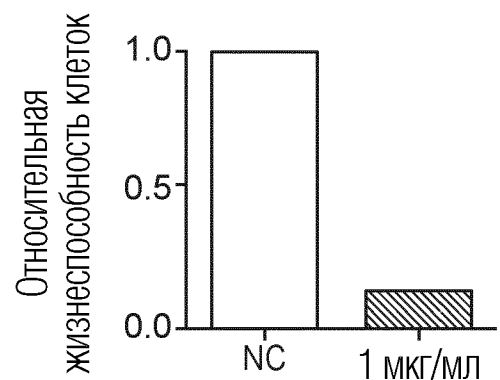
ФИГ. 30С



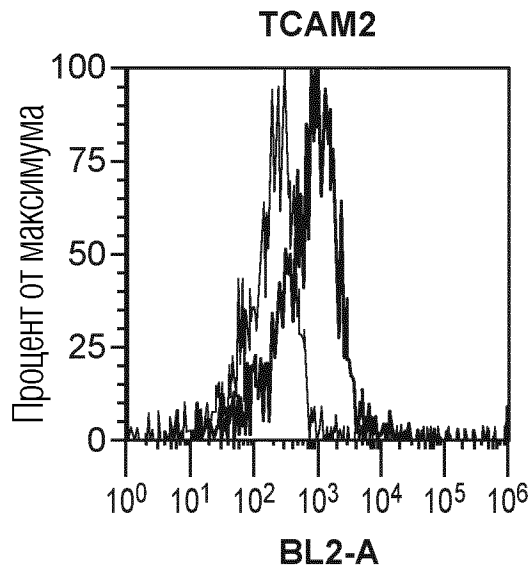
ФИГ. 30D



ФИГ. 30Е

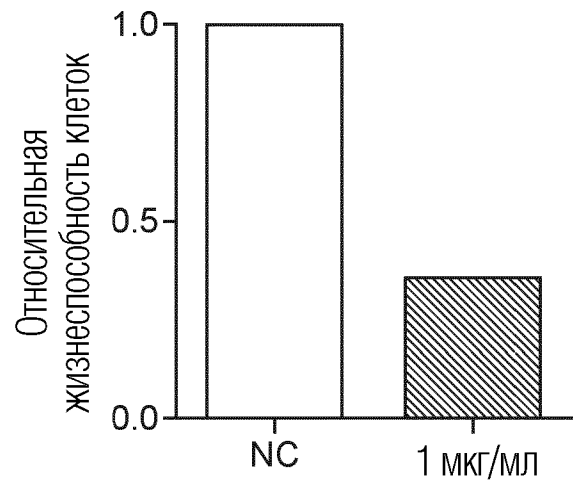


ФИГ. 30F

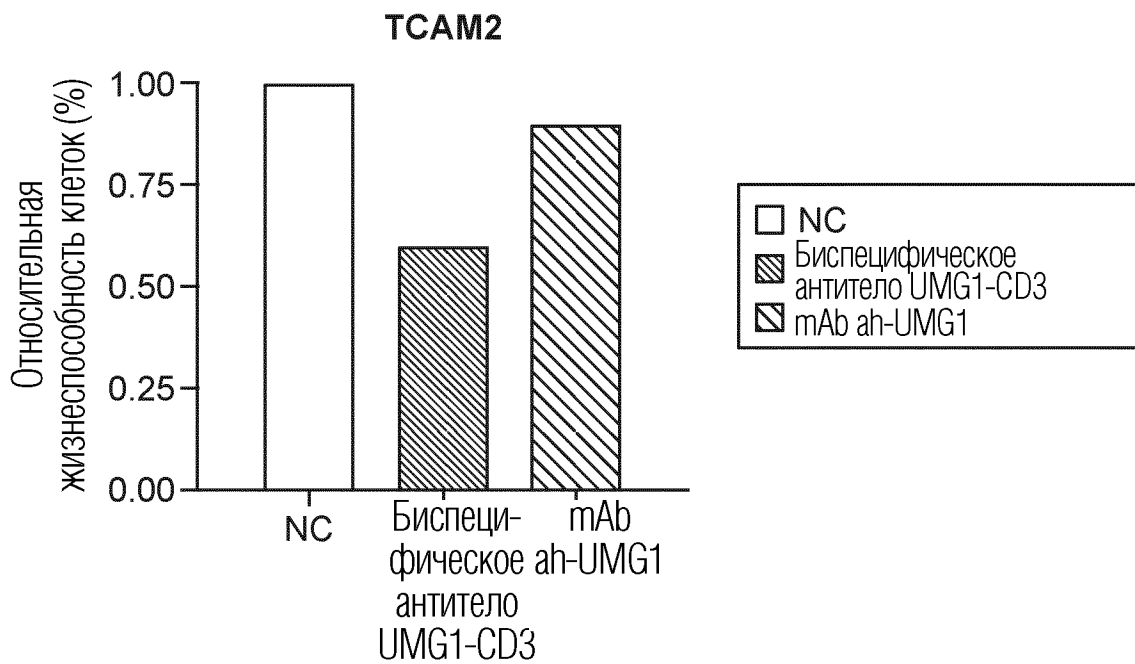


ФИГ. 31А

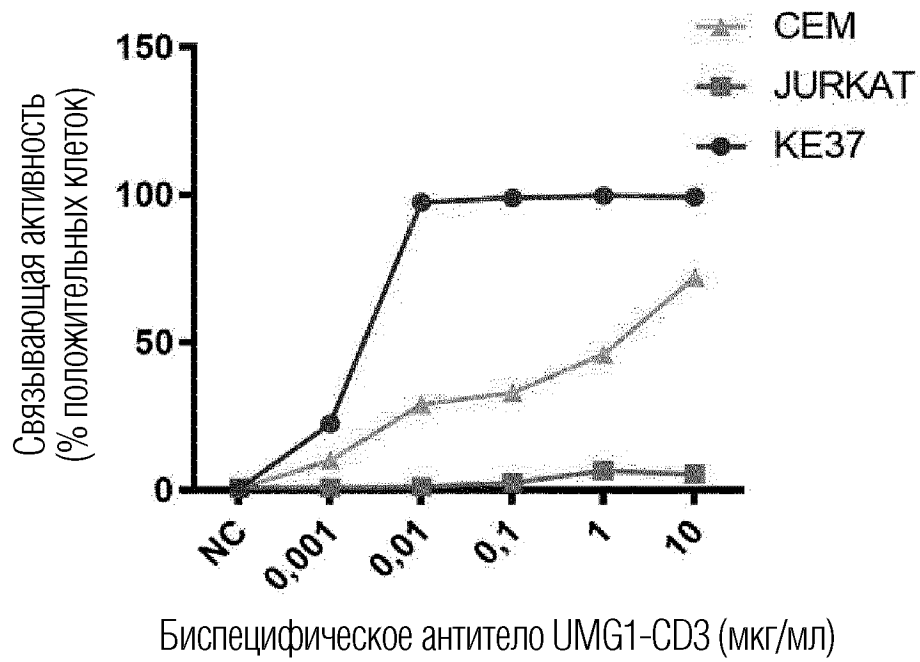
Биспецифическое антитело UMG1-CD3



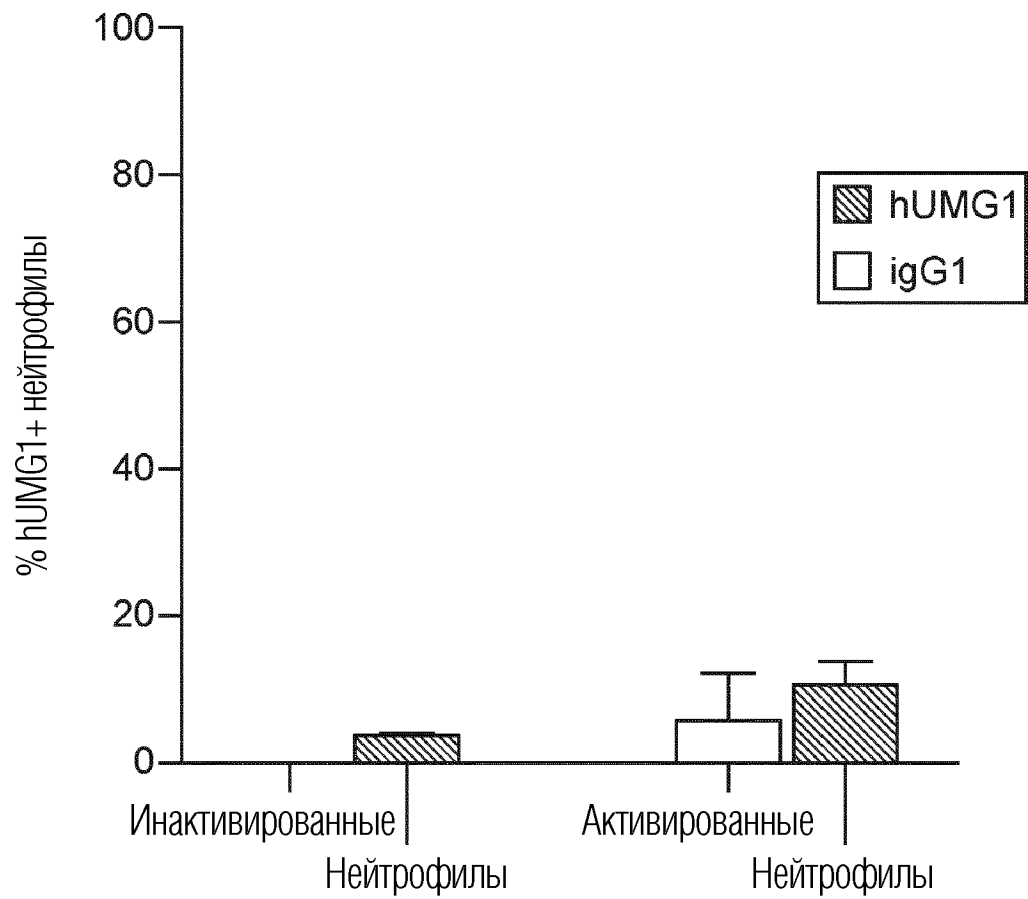
ФИГ. 31В



ФИГ. 31С



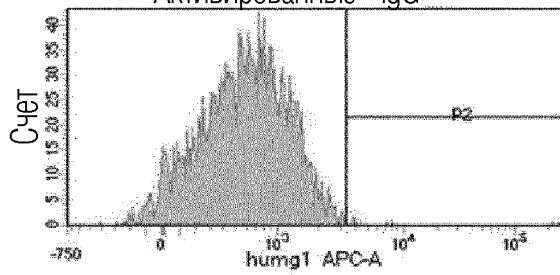
ФИГ. 32



ФИГ. 33

Изотипический контроль

Активированные - IgG

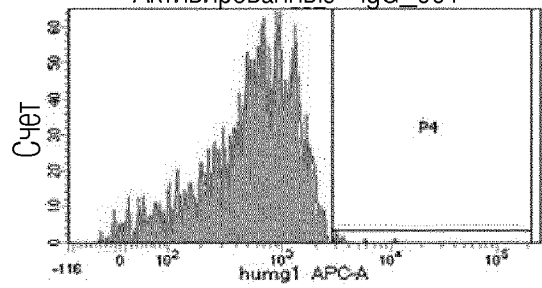


ФИГ. 34А

mAb h-UMG1

Изотипический контроль

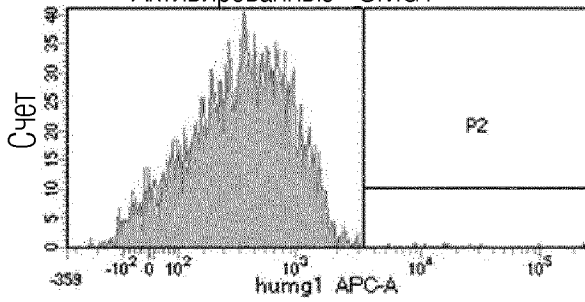
Активированные - IgG_001



ФИГ. 34В

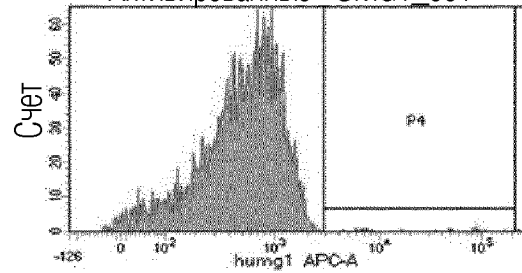
mAb h-UMG1

Активированные - UMG1

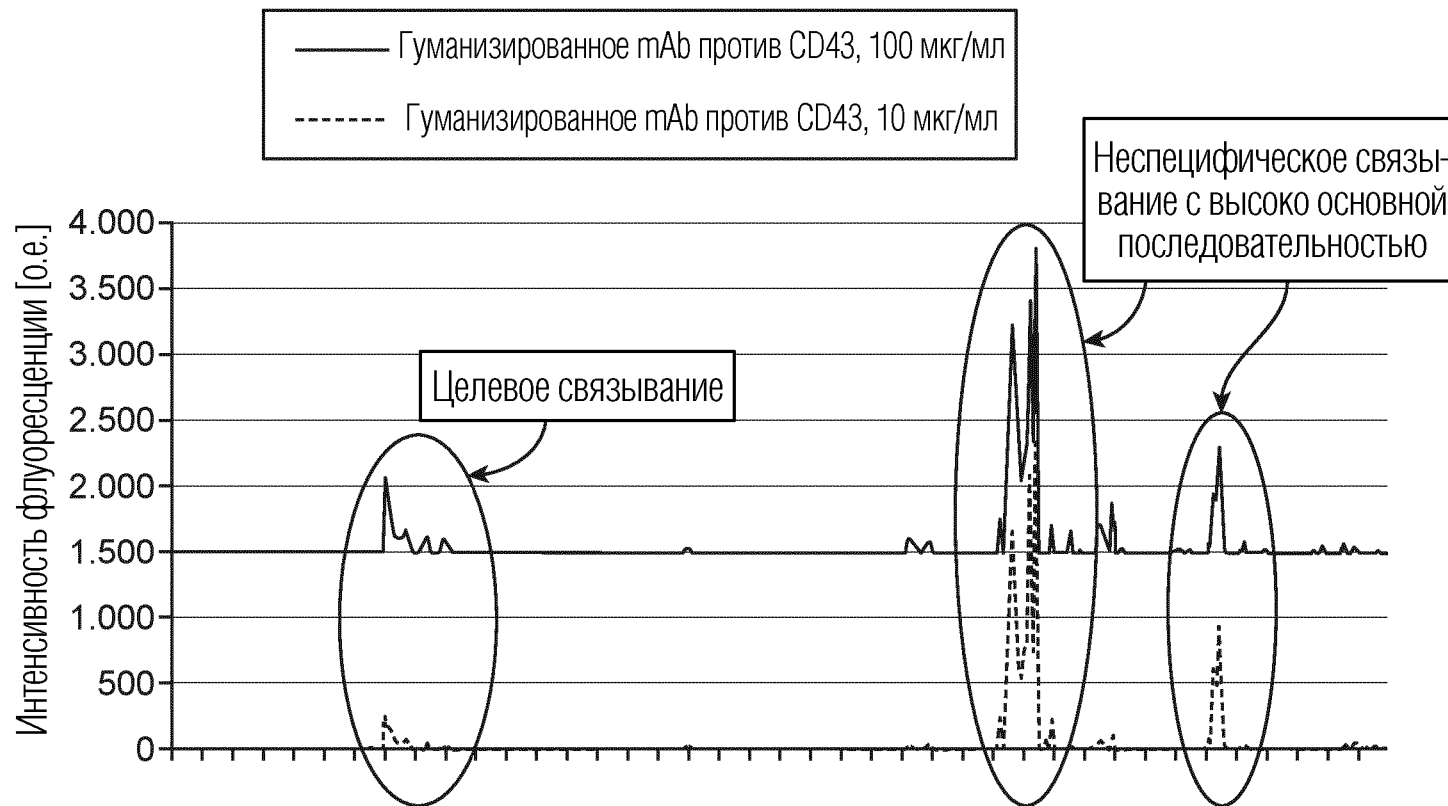
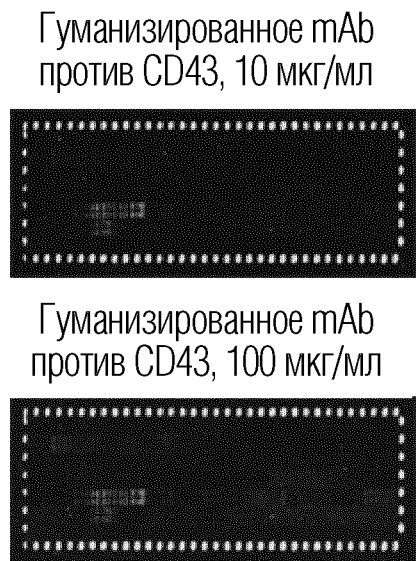


ФИГ. 34С

Активированные - UMG1_001

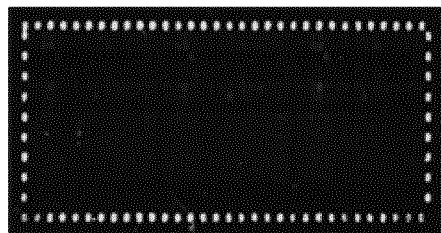


ФИГ. 34D

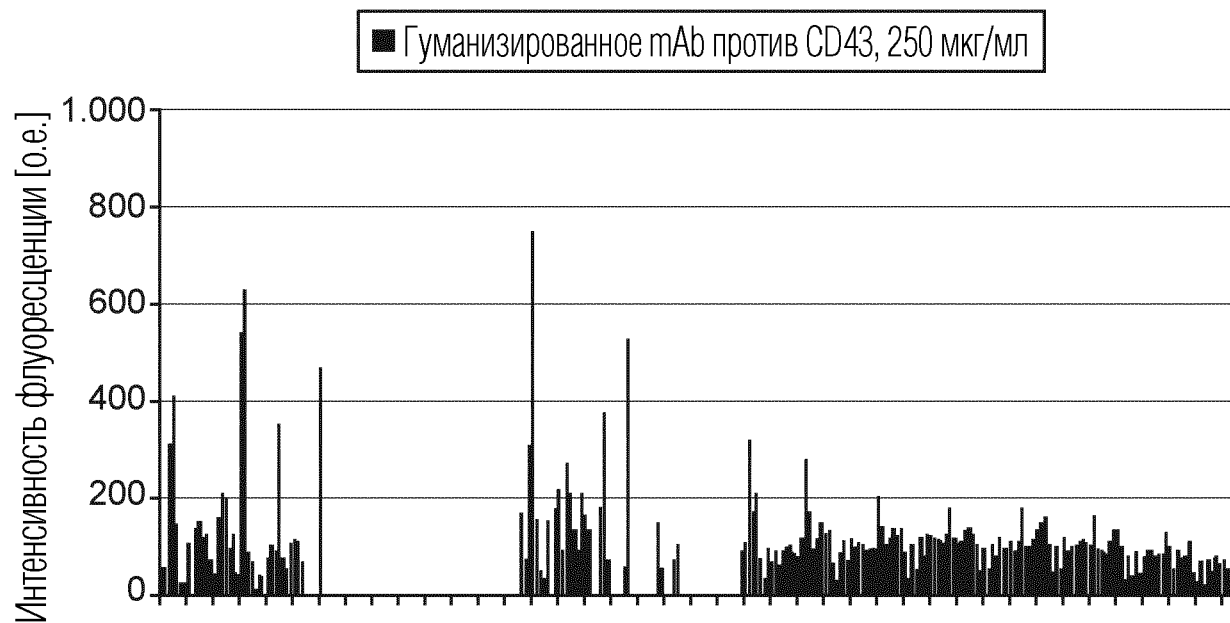
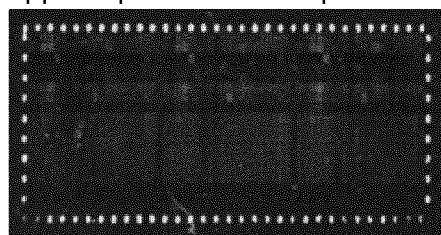


ФИГ. 35

Гуманизированное mAb
против CD43, 250 мкг/мл



Скорректированное изображение



ФИГ. 36

Тепловая карта



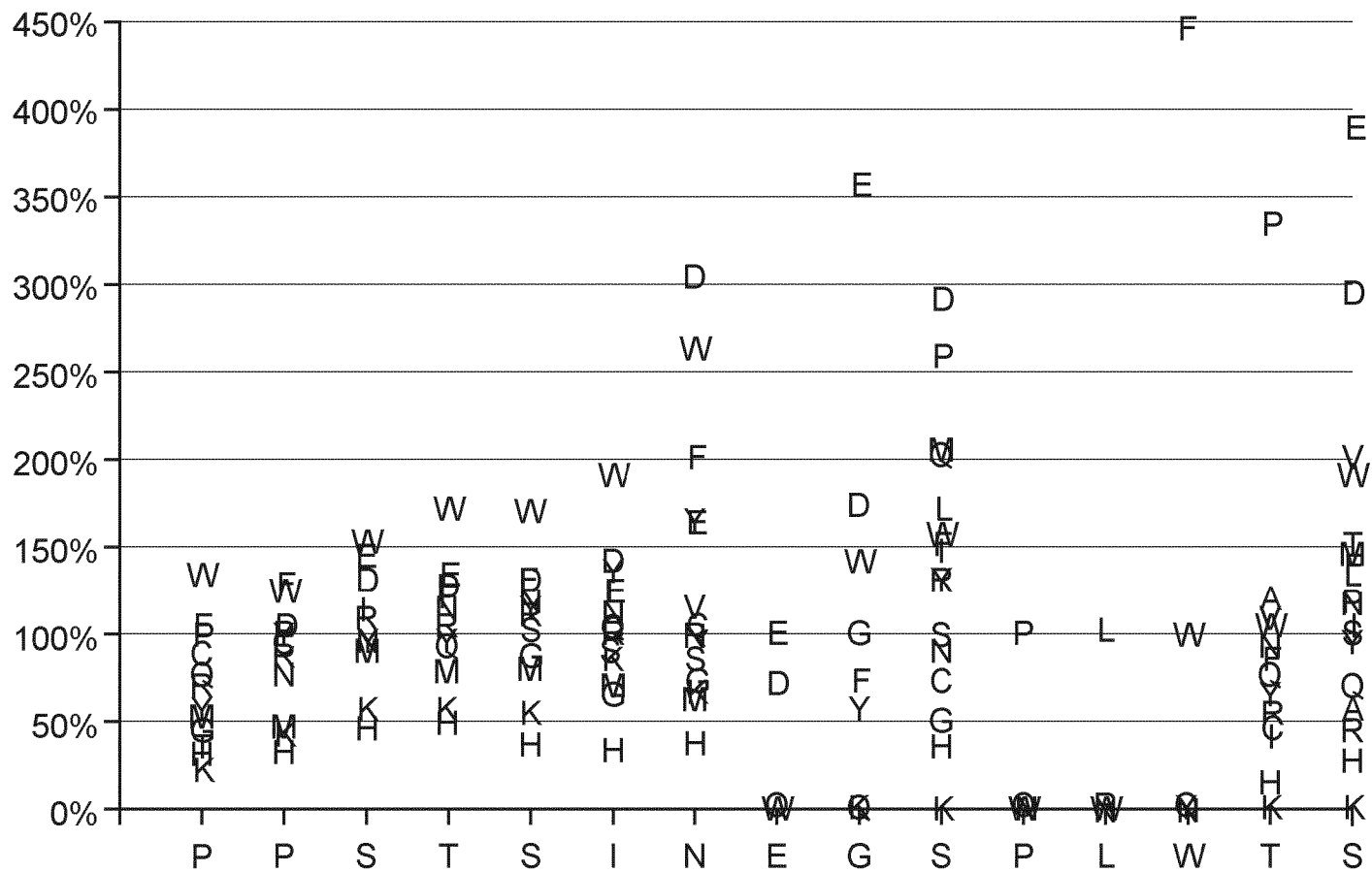
ФИГ. 37A

Матрица замен

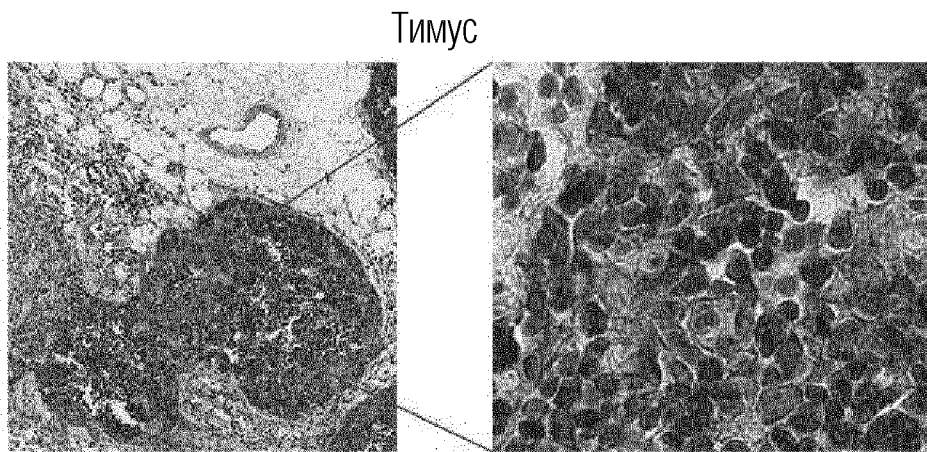
S	E	D	V	W	T	M	F	L	P	N	I	S	Y	Q	C	A	R	H	G	K
T	E	D	P	A	V	W	S	T	M	N	F	Q	L	G	Y	R	C	I	H	K
W	F	W	A	C	D	E	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	Y
L	I	N	R	A	C	D	E	F	G	H	I	K	M	P	Q	S	T	V	W	Y
P	F	C	A	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	Q	R	S	T	V	W	Y
S	E	D	P	M	V	Q	L	A	W	F	I	R	Y	S	N	T	C	G	H	K
G	M	E	D	W	G	F	L	Y	A	C	H	I	K	N	P	Q	R	S	T	V
E	E	D	G	M	N	A	C	F	H	I	K	L	P	Q	R	S	T	V	W	Y
N	D	W	F	E	Y	V	C	N	R	Q	I	L	P	A	S	T	G	K	M	H
I	W	D	Y	F	E	C	N	L	Q	R	I	P	A	V	T	S	K	M	G	H
S	W	D	F	E	N	V	P	Q	C	L	Y	R	A	T	I	S	G	M	K	H
T	W	E	D	F	N	C	R	V	A	G	L	T	Y	P	I	Q	S	M	K	H
S	F	W	E	D	L	R	C	Q	T	G	V	S	P	I	A	N	Y	M	K	H
P	F	E	W	D	P	Y	G	A	Q	R	L	C	V	T	S	I	N	M	K	H
P	W	F	P	C	E	N	D	L	R	I	Q	Y	S	A	V	M	G	T	H	K

ФИГ. 37B

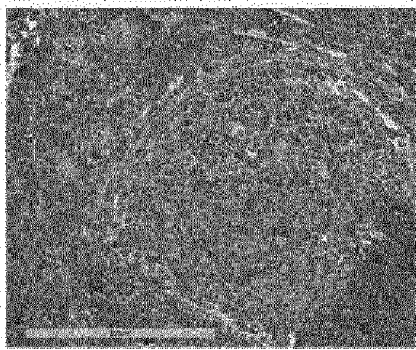
График аминокислот



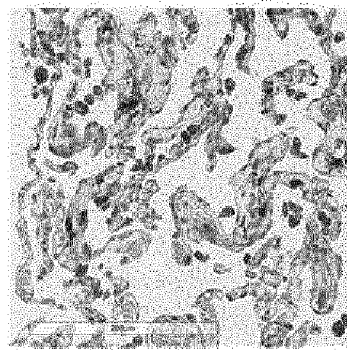
ФИГ. 37С



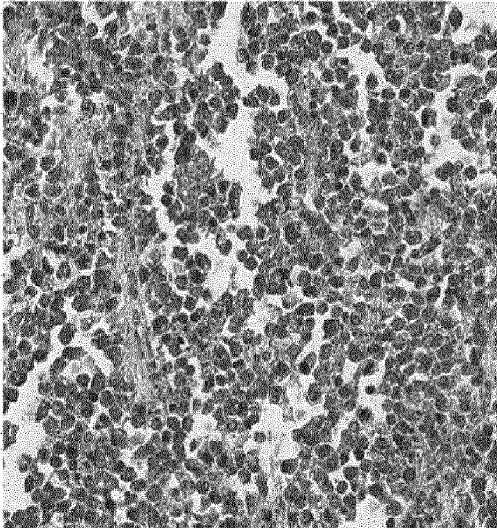
ФИГ. 38А



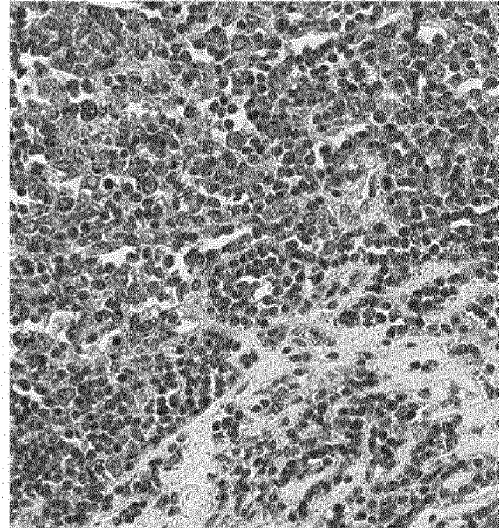
Миндалина
ФИГ. 38В



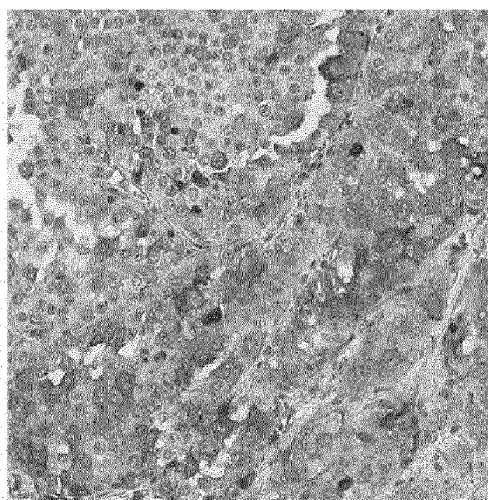
Легкое
ФИГ. 38С



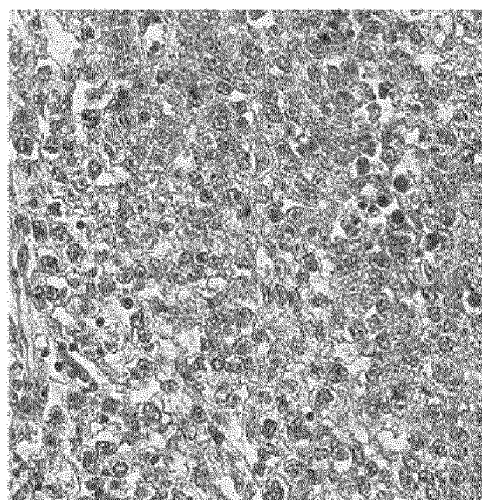
ФИГ. 39А



ФИГ. 39В



ФИГ. 40А



ФИГ. 40В