

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202290851** (13) **A1**

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

(43) Дата публикации заявки
2022.08.12

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)

(22) Дата подачи заявки
2020.09.11

(54) **АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD371 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ**

(31) 62/900,118; 62/936,913

(32) 2019.09.13; 2019.11.18

(33) US

(86) PCT/US2020/050380

(87) WO 2021/050857 2021.03.18

(71) Заявитель:

**МЕМОРИАЛ СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
КЭНСЕР СЕНТЕР; ТРИ-
ИНСТИТЮШНЛ ТЕРАПЬЮТИКС
ДИСКАВЕРИ ИНСТИТЮТ,
ИНК.; СЛОАН-КЕТТЕРИНГ
ИНСТИТЮТ ФОР КЭНСЕР
РИСЕРЧ; МЕМОРИАЛ ХОСПИТАЛ
ФОР КЭНСЕР ЭНД ЭЛЛАЙД
ДИЗИЗЕС (US)**

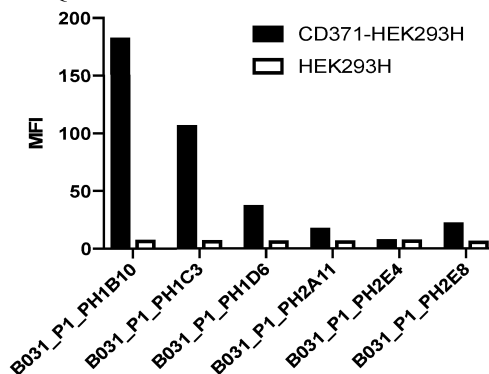
(72) Изобретатель:

**Даниян Энтони, Брентдженс Ренье
Дж., Лоренц Иво К., Пол Мэри Энн
(US)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с CD371, и к способам применения таких антител или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371, или его антигенсвязывающий фрагмент, содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере примерно на 80%, по меньшей мере примерно на 85%, по меньшей мере примерно на 90%, по меньшей мере примерно на 95%, по меньшей мере примерно на 96%, по меньшей мере примерно на 97%, по меньшей мере примерно на 98%, по меньшей мере примерно на 99%, по меньшей мере примерно на 100% гомологичны или идентичны аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.



A1

202290851

202290851

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-573686EA/061

АНТИТЕЛА ПРОТИВ CD371 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ

ПЕРЕКРЕСТНАЯ ССЫЛКА НА РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

По настоящей заявке испрашивается приоритет по временной заявке США № 62/900118, поданной 13 сентября 2019 года, и временной заявке США № 62/936913, поданной 18 ноября 2019 года, содержание каждой из которой включено в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме.

СПИСОК ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

Настоящая заявка содержит список последовательностей, поданный в формате ASCII с помощью EFS-Web и включенный, таким образом, в настоящее описание в качестве ссылки в полном объеме. Указанная копия ASCII, созданная 11 сентября 2020 года, названа 0727341146_ST25 и имеет размер 58682 байт.

1. ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам, связывающимся с CD371, и способам применения таких антител.

2. УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

CD371 (CEC12A), также известный как DCAL-2, MICL или CLL-1, является лектиновым трансмембранным гликопротеином С-типа массой 30 кДа. Он экспрессируется на моноцитах, гранулоцитах, естественных киллерах (NK) и базофилах. CD371 является иммуноингибиторным рецептором, рекрутирующим фосфатазы Src-гомологии SHP-1 и SHP-2 к их фосфорилированному цитоплазматическому иммунорецепторному тирозиновому ингибиторному мотиву (ITIM) (Sancho et al., *Annu Rev. Immunol* (2012); 30:491-529; Yan et al., *Front Immunol* (2015);6:408; Lahoud et al., *J Immunol* (2011);187:842). CD371 действует в качестве отрицательно регулирующего рецептора кристаллов мочевой кислоты (урата мононатрия, MSU), контролирующего аутоиммунитет и воспалительные заболевания (Neumann et al., *Immunity* (2014);40:389-99). CD371 является отрицательным регулятором функции гранулоцитов и моноцитов (Marshall et al., *J Biol Chem* (2004);279(15):14792-802; Pye et al., *Eur J Immunol* (2008);38(4):1157-63). Аномальная экспрессия CD371 описана при остром миелолейкозе (AML) и миелодиспластическом синдроме (MDS) (Sadonik et al., *Blood* (2016);128:4234; Toft-Petersen et al., *Br J Haematol* (2016);175(3):393-41). Недавнее исследование показало, что CD371 экспрессируется на 92% клеток острого миелолейкоза (AML) и отсутствует на гранулоцитарно-макрофагальных предшественниках (GMP) (Bakker et al., *Cancer Res.* (2004);64(22):8443-50). CD371 также экспрессируется на лейкозных стволовых клетках (LSC), обладающих способностью к бесконечному самообновлению и образованию множества дочерних бластных клеток со специфическим фенотипом CD371, являясь одной из наиболее важных причин рецидива лейкоза (Siveen et al., *Mol Cancer* (2017);16:13; Yoshida et al., *Cancer Sci*(2016);107:5-11). Учитывая значительную роль

CD371 при заболеваниях, желательными являются антитела, связывающиеся с CD371, и способы применения таких средств.

3. СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, специфически связывающимся с CD371, и способам применения антител или их антигенсвязывающих фрагментов.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит (a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и (b) вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на

на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 11, и вариабельной области легкой цепи содержащей аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи, где вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи выбраны из группы, состоящей из:

(а) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

(b) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(с) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

(d) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(e) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; и

(f) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3, где домены CDR3 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи выбраны из группы, состоящей из:

(a) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, и ее консервативную модификацию;

(b) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, и ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, и ее консервативную модификацию;

(c) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, и ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45, и ее консервативную модификацию;

(d) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51, и ее консервативную модификацию;

(e) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, и ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и ее консервативную модификацию; и

(f) CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, и ее консервативную модификацию; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, и ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления домены CDR2 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи антитела или его антигенсвязывающей части выбраны из группы, состоящей из:

(a) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и ее консервативную модификацию;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и ее консервативную модификацию;

(с) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и ее консервативную модификацию;

(d) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50, и ее консервативную модификацию;

(е) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56, и ее консервативную модификацию;

(f) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, и ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления домены CDR1 переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи антитела против CD371 или его антигенсвязывающей части выбраны из группы, состоящей из:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, и ее консервативную модификацию;

(b) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, и ее консервативную модификацию;

(с) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, и ее консервативную модификацию;

(d) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49, и ее консервативную модификацию;

(е) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55, и ее консервативную модификацию; и

(f) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, и ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления одна или более из последовательностей CDR имеет до приблизительно 5 замен аминокислот. В некоторых вариантах осуществления одна или более из последовательностей CDR имеет до приблизительно 3 замен аминокислот.

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30;

(b) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(с) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42;

(d) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; CDR2 варибельной области тяжелой

CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51;

(е) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53; CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54; CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55; CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57; или

(f) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60; CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61; CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, перекрестно конкурирующему за связывание с CD371 с любым из описанного выше антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, связывающемуся с тем же эпитопом на CD371, что и любое из описанного выше антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

В некоторых вариантах осуществления последовательность антитела находится в ориентации варибельных областей легкой и тяжелой цепей (V_L - V_H). В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 человека с константой диссоциации (K_D) от приблизительно 1×10^{-7} М до приблизительно 1×10^{-8} М или от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-8} М.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит каркасную область варибельной области человека. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является полностью человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В

некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент является химерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающая часть является гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом. В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий фрагмент антитела представляет собой Fab, Fab', F(ab')₂, вариабельный фрагмент (Fv) или одноцепочечный вариабельный фрагмент (scFv).

Настоящее изобретение также относится к иммуноконъюгату, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем описании, связанный с терапевтическим средством. В некоторых вариантах осуществления терапевтическое средство является лекарственным средством, цитотоксином или радиоактивным изотопом.

Кроме того, настоящее изобретение относится к биспецифической молекуле, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем описании, связанный со вторым функциональным остатком. В некоторых вариантах осуществления второй функциональный остаток имеет иную специфичность связывания, чем антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Настоящее изобретение также относится к композиции, содержащей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем описании, иммуноконъюгату, представленному в настоящем описании, или биспецифическому антителу, представленному в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления композиция является фармацевтической композицией, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

Кроме того, настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, представленный в настоящем описании, экспрессирующий вектор, содержащий такую молекулу нуклеиновой кислоты, и клетке-хозяину, содержащей такой экспрессирующий вектор.

Настоящее изобретение относится к способу детекции CD371 в целой клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления способ включает: приведение клетки или ткани в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит детектируемую метку; и определение количества меченого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с указанной клеткой или тканью, посредством измерения количества детектируемой метки, ассоциированной с указанной клеткой или тканью, где количество связанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента свидетельствует о количестве CD371 в указанной клетке или ткани.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения опухолевой нагрузки у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, его иммуноконъюгата, его биспецифической молекулы или композиции, представленной в

настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ снижает количество опухолевых клеток. В некоторых вариантах осуществления способ снижает размер опухоли. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к эрадикации опухоли у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способам лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, его иммуноконъюгата, его биспецифической молекулы или его композиции, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к эрадикации опухоли у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, его иммуноконъюгата, его биспецифической молекулы или его композиции, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления способ приводит к эрадикации опухоли у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

Кроме того, настоящее изобретение относится к способу профилактики и/или лечения опухоли или неоплазии. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, его иммуноконъюгата, его биспецифической молекулы или его композиции, представленной в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления индивидуум является человеком.

В некоторых вариантах осуществления опухоль или неоплазия выбрана из группы, состоящей из острого миелолейкоза (AML), множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), глиобластомы, миелодиспластического синдрома (MDS) и хронического миелогенного лейкоза (CML). В некоторых вариантах осуществления опухоль является AML.

Кроме того, настоящее изобретение относится к набору для лечения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии и/или повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию, содержащему антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, его иммуноконъюгат, его биспецифическую молекулу или его композицию, представленную в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит письменные инструкции по использованию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, его иммуноконъюгата, его биспецифической молекулы или его композиции, представленной в настоящем описании, для лечения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии и/или

повышения или пролонгирования выживаемости у индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию.

4. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

Следующее подробное описание, приведенное в качестве примера, а не для ограничения изобретения конкретными описанными вариантами осуществления, можно истолковывать в сочетании с сопутствующими чертежами.

На фигуре 1 показано связывание моноклональных фаговых препаратов против CD371 с клетками НЕК293Н, трансфицированными с использованием CD371 человека.

На фигурах 2А и 2В показано связывание 1В10 и 1С3 в формате IgG1 человека с клетками ОС1. На фигуре 2А показано В10 (обозначенное как "1В10"). На фигуре 2В показано С3 (обозначаемое как "1С3").

На фигуре 3 показано связывание scFv-Fc-слитых белков и фрагментов scFv с клетками НЕК293, экспрессирующими CD371 человека.

5. ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к антителам против CD371. Неограничивающие варианты осуществления настоящего изобретения представлены в настоящем описании и примерах.

Для ясности раскрытия, а не для ограничения, подробное описание разделено на следующие подразделы:

- 5.1. Определения;
- 5.2. CD371;
- 5.3. Антитела против CD371;
- 5.4. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или антигенсвязывающие фрагменты;
- 5.5. Фармацевтические композиции и способы лечения;
- 5.6. Наборы; и
- 5.7. Способы детекции.

5.1. Определения

В следующем описании будут соблюдены некоторые соглашения в отношении использования терминологии. Как правило, термины, используемые в настоящем описании, следует интерпретировать в соответствии с тем значением этих терминов, которое известно специалистам в этой области.

"Антигенсвязывающий белок" является белком или полипептидом, содержащим антигенсвязывающую область или антигенсвязывающую часть, т.е. имеет сильную аффинность к другой молекуле, с которой он связывается. Антигенсвязывающие белки включают антитела, химерные антигенные рецепторы (CAR) и слитые белки.

Термины "антитело" и "антитела", как они известны в этой области, относятся к антигенсвязывающим белкам иммунной системы. Термин "антитело", как он обозначен в настоящем описании, включает целые, полноразмерные антитела, имеющие

антигенсвязывающую область, и любой их фрагмент, в котором сохранена "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающая область", или отдельные цепи, например, их одноцепочечный переменный фрагмент (scFv). Природное "антитело" является гликопротеином, содержащим по меньшей мере две тяжелые цепи (H) и две легкие цепи (L), соединенные друг с другом дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь состоит из переменной области тяжелой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как V_H) и константной области тяжелой цепи (CH). Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь состоит из переменной области легкой цепи (сокращенно обозначаемой в настоящем описании как V_L) и константной области легкой цепи C_L . Константная область легкой цепи состоит из одного домена, C_L . Области V_H и V_L можно дополнительно разделять на области гипервариабельности, обозначаемые как определяющие комплементарность области (CDR), перемежающиеся с областями, являющиеся более консервативными, обозначаемыми как каркасные области (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, расположенных от amino-конца к карбокси-концу в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен, взаимодействующий с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами организма-хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

В рамках изобретения термин "антитело человека" предназначен для включения антител, имеющих переменные области, в которых каркас и области CDR получают из последовательностей иммуноглобулинов человека зародышевой линии. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из последовательностей иммуноглобулинов человека зародышевой линии. Антитела человека по настоящему изобретению могут включать аминокислотные остатки, неcodируемые последовательностями иммуноглобулинов человека зародышевой линии (например, мутации, встраиваемые посредством случайного или сайт-специфического мутагенеза *in vitro* или посредством соматической мутации *in vivo*).

В рамках изобретения термин "моноклональное антитело" относится к антителу, получаемому из популяции, по существу, гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, идентичны и/или связываются с одним и тем же эпитопом, за исключением возможных вариантов антител, например, содержащих природные мутации или возникающих во время получения препарата моноклональных антител, такие варианты, как правило, присутствуют в незначительных количествах. В отличие от препаратов поликлональных антител, как правило, включающих разные антитела против разных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело из препарата моноклональных антител направлено против одной детерминанты на антигене. Таким образом, определение "моноклональный" включает характер антитела как получаемого из, по существу, гомогенной популяции антител, и не следует истолковывать его как

требующее получения антитела любым конкретным способом. Например, моноклональные антитела для использования по настоящему изобретению можно получать различными способами, включая, в качестве неограничивающих примеров, гибридомный способ, способы рекомбинантной ДНК, способы фагового дисплея и способы с использованием трансгенных животных, содержащие все или часть локусов иммуноглобулинов человека, такие способы и другие примеры способов получения моноклональных антител представлены в настоящем описании.

В рамках изобретения термин "рекомбинантное антитело человека" включает все антитела человека, полученные, экспрессируемые, созданные или выделенные рекомбинантными способами, такие как (a) антитела, выделенные из животного (например, мыши), являющегося трансгенным или трансхромосомным по генам иммуноглобулина человека, или гибридомы, полученной из них (описано ниже), (b) антитела, выделенные из клетки-хозяина, трансформированной для экспрессии антител человека, например, из трансфектомы, (c) антитела, выделенные из рекомбинантной, комбинаторной библиотеки антител человека, и (d) антитела, полученного, экспрессируемого, созданного или выделенного любыми другими способами, включающими сплайсинг последовательностей генов иммуноглобулина человека в другие последовательности ДНК. Такие рекомбинантные антитела человека имеют переменные области, в которых каркас и области CDR получены из последовательностей иммуноглобулинов зародышевой линии человека. Однако в некоторых вариантах осуществления такие рекомбинантные антитела человека можно подвергать мутагенезу *in vitro* (или, при использовании животного, трансгенного по последовательностям Ig человека, соматическому мутагенезу *in vivo*), и, таким образом, аминокислотные последовательности областей V_H и V_L рекомбинантных антител являются последовательностями, которые, хотя и получены и родственны последовательностям V_H и V_L зародышевой линии человека, могут не встречаться в природе в репертуаре антител человека зародышевой линии *in vivo*.

Термин "гуманизированное антитело" предназначен для обозначения антител, в которых последовательности CDR, полученные из зародышевой линии других видов млекопитающих, таких как мышь, пересажены на каркасные последовательности человека. В каркасных последовательностях человека можно осуществлять дополнительные модификации каркасной области.

Термин "химерное антитело" предназначен для обозначения антител, в которых последовательности переменной области получены из одного вида, а последовательности константной области получены из другого вида, таких как антитело, в котором последовательности переменной области получены из антитела мыши, а последовательности константной области получены из антитела человека.

В рамках изобретения термин антитело, "специфически связывающееся с CD371", предназначен для обозначения антитела, связывающегося с CD371 (например, CD371 человека) с константой диссоциации (K_d) приблизительно 5×10^{-7} М или менее,

приблизительно 1×10^{-7} М или менее, приблизительно 5×10^{-8} М или менее, приблизительно 1×10^{-8} М или менее, приблизительно 5×10^{-9} М или менее, приблизительно 1×10^{-9} М или менее, приблизительно 5×10^{-10} М или менее, приблизительно 1×10^{-10} М или менее, приблизительно 5×10^{-11} М или менее или приблизительно 1×10^{-11} М или менее.

Термин "антитело, конкурирующее за связывание" или "антитело, перекрестно конкурирующее за связывание" в отношении антитела в случае связывания с антигеном, например, CD371, относится к антителу, блокирующему связывание референсного антитела с антигеном (например, CD371) в конкурентном анализе на 50% или более, и наоборот, референсное антитело блокирует связывание антитела с антигеном (например, CD371) в конкурентном анализе на 50% или более. Пример конкурентного анализа описан в "Antibodies", Harlow and Lane (Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY).

В рамках изобретения термин "изотип" относится к классу антитела (например, IgM или IgG1), кодируемого генами константной области тяжелой цепи.

Фразы "антитело, распознающее антиген" и "антитело, специфическое для антигена" используют в настоящем описании взаимозаменяемо с термином "антитело, специфически связывающееся с антигеном (например, полипептидом CD371)".

В рамках изобретения термин "антигенсвязывающая часть" или "антигенсвязывающая область" антитела относится к области или части антитела, связывающейся с антигеном и придающей антигенную специфичность антителу; фрагменты антигенсвязывающих белков, например, антител, включают один или более фрагментов антитела, сохраняющих способность специфически связываться с антигеном (например, полипептидом CD391). Показано, что антигенсвязывающую функцию антитела могут выполнять фрагменты полноразмерного антитела. Примеры антигенсвязывающих фрагментов, включенных в термин "фрагменты антител" антитела, включают Fab-фрагмент, моновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_H1 ; $F(ab)_2$ -фрагмент, бивалентный фрагмент, содержащий два Fab-фрагмента, связанных с дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из доменов V_H и C_H1 ; Fv-фрагмент, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward et al., Nature 1989;341:544-546), состоящий из домена V_H ; и выделенную определяющую комплементарность область (CDR).

Кроме того, хотя два домена Fv-фрагмента, V_L и V_H , кодируются отдельными генами, их можно соединять рекомбинантными способами, с помощью синтетического линкера, позволяющего получать их в виде единой белковой цепи, в которой области V_L и V_H спариваются, образуя моновалентные молекулы. Они известны как одноцепочечный Fv (scFv); см., например, Bird et al., Science (1988);242:423-426; и Huston et al., Proc Natl Acad Sci(1998);85:5879-5883. Эти фрагменты антител получают общепринятыми способами, известными специалистам в этой области, и фрагменты подвергают скринингу на пригодность аналогично интактным антителам.

"Антитело" или "антигенсвязывающий белок" является белком, идентифицированным и отделенным и/или выделенным из компонентов его природного

окружения. "Синтетические антитела" или "рекомбинантные антитела", как правило, получают с использованием рекомбинантной технологии или способов синтеза пептидов, известных специалистам в этой области.

В рамках изобретения термин "одноцепочечный переменный фрагмент" или "scFv" является слитым белком из переменных областей тяжелых (V_H) и легких цепей (V_L) иммуноглобулина (например, мыши или человека), ковалентно связанных с образованием гетеродимера $V_H::V_L$. Тяжелые (V_H) и легкие цепи (V_L) соединяют напрямую или с помощью пептид-кодирующего линкера (например, 10, 15, 20, 25 аминокислот), соединяющего N-конец V_H с C-концом V_L или C-конец V_H с N-концом V_L . Линкер, как правило, богат глицином для гибкости, а также серином или треонином для растворимости. С помощью линкера можно связывать переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи внеклеточного антигенсвязывающего домена.

Неограничивающие примеры линкеров описаны в Shen et al., Anal Chem(2008);80(6):1910-1917 и WO 2014/087010, содержание которых включено, таким образом, в качестве ссылки в полном объеме. В некоторых вариантах осуществления линкер является линкером G4S. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13, приведенную ниже: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 13].

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14, приведенную ниже: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 14].

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 64, приведенную ниже: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 64].

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 65, приведенную ниже: GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 65].

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 66, приведенную ниже: GGGGS [SEQ ID NO: 66].

В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 67, приведенную ниже: GGGGSGGGGS [SEQ ID NO: 67].

Несмотря на удаление константных областей и встраивание линкера, белки scFv сохраняют специфичность исходного иммуноглобулина. Одноцепочечный полипептидные антитела Fv могут экспрессироваться с нуклеиновой кислоты, содержащей V_H - и V_L -кодирующие последовательности, как описано в Huston, et al. (Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1988;85:5879-5883). Также см. патенты США №№ 5091513, 5132405 и 4956778; патентные публикации США №№ 20050196754 и 20050196754. Описаны антагонистические scFv, имеющие ингибиторную активность (см., например, Zhao et al.,

Hybridoma (Larchmont) 2008;27(6):455-51; Peter et al., J Cachexia Sarcopenia Muscle 2012 August 12; Shieh et al., J Immunol 2009; 183(4):2277-85; Giomarelli et al., Thromb Haemost 2007;97(6):955-63; Fife et al., J Clin Invest 2006;116(8):2252-61; Brocks et al., Immunotechnology 1997;3(3):173-84; Moosmayer et al., Ther Immunol 1995; 2(10):31-40)). Описаны агонистические scFv, имеющие стимулирующую активность (см., например, Peter et al., J Biol Chem 2003; 278(38):36740-7; Xie et al., Nat Biotech 1997; 15(8):768-71; Ledbetter et al., Crit Rev Immunol 1997; 17(5-6):427-55; Ho et al., Biochim Biophys Acta 2003; 1638(3):257-66).

В рамках изобретения термин "F(ab)" относится к фрагменту структуры антитела, связывающемуся с антигеном, но являющемуся моновалентным и несодержащим Fc-часть, например, антитело, расщепляемое ферментом папаином, дает два F(ab)-фрагмента и Fc-фрагмент (например, константную область тяжелой цепи (H); Fc-область, несвязывающуюся с антигеном).

В рамках изобретения термин "F(ab')₂" относится к фрагменту антитела, получаемому посредством расщепления пепсином целых антител IgG, где этот фрагмент имеет две антигенсвязывающие (ab') (бивалентные) области, где каждая (ab') область содержит две отдельные аминокислотные цепи, часть цепи H и легкую цепь (L), связанные S-S-связью, для связывания антигена, и где оставшиеся части цепи H связаны друг с другом. "F(ab')₂"-фрагмент можно разделять на два отдельных Fab'-фрагмента.

В рамках изобретения термин "вектор" относится к любому генетическому элементу, такому как плазида, фаг, транспозон, космида, хромосома, вирус, вирион и т.д., способный к репликации при связывании с правильными контрольными элементами и который может переносить последовательности гена в клетки. Таким образом, термин включает клонирующие и экспрессирующие носители, а также вирусные векторы и плазмидные векторы.

"CDR" определяют как аминокислотные последовательности определяющих комплементарность областей антитела, являющиеся гипервариабельными областями тяжелых и легких цепей иммуноглобулина. См., например, Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4th U. S. Department of Health and Human Services, National Institutes of Health (1987), или систему нумерации IMGT (Lefranc, The Immunologist (1999);7:132-136; Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. (2003);27:55-77). В рамках изобретения термин "гипервариабельная область" или "HVR" относится к каждой из областей вариабельного домена антитела, являющейся гипервариабельной по последовательности ("определяющие комплементарность области" или "CDR"), и/или образующей структурно определенные петли ("гипервариабельные петли"), и/или содержащей контактирующие с антигеном остатки ("антигенные контакты"). Как правило, антитела содержат три CDR или области CDR тяжелой цепи и три CDR или области CDR легкой цепи в вариабельной области. CDR предоставляют большинство контактных остатков для связывания антитела с антигеном или эпитопом. В некоторых вариантах осуществления CDR определяют по системе IMGT. В некоторых вариантах

осуществления CDR определяют с использованием системы нумерации IMGT, доступной на http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input.

Термины "выделенный" означает степень отделения от исходного источника или окружения.

"Выделенное антитело" является антителом, отделенным от компонентов своего природного окружения. В некоторых вариантах осуществления антитело очищают до более 95% или 99% чистоты, что определяют посредством, например, электрофореза (например, электрофореза в ПААГ с SDS, изоэлектрофокусирования (IEF), капиллярного электрофореза) или хроматографии (например, ионообменной или обращенно-фазовой ВЭЖХ). Обзор способов оценки чистоты антител см., например, в Flatman et al., J. Chromatogr (2007); В 848:79-87.

Термин "выделенная нуклеиновая кислота" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, отделенной от компонентов своего природного окружения. Выделенная нуклеиновая кислота включает молекулу нуклеиновой кислоты, содержащуюся в клетках, как правило, содержащих молекулу нуклеиновой кислоты, но молекула нуклеиновой кислоты присутствует экстрахромосомно или в хромосомной локализации, отличающейся от природной хромосомной локализации.

Термин "выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело" (включая ссылки на конкретное антитело, например, антитело против KLB) относится к одной или более молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим тяжелые и легкие цепи антитела (или их фрагменты), включая такие молекулы нуклеиновой кислоты в одном векторе или отдельных векторах, и такие молекулы нуклеиновой кислоты находятся в одной или более локализациях в клетке-хозяине.

В рамках изобретения термин "вектор" относится к молекуле нуклеиновой кислоты, способной приводить к размножению другой нуклеиновой кислоты, с которой она связана. Термин включает вектор как самореплицирующуюся структуру нуклеиновой кислоты, а также вектор, встроенный в геном клетки-хозяина, в которую он внесен. Некоторые векторы могут направлять экспрессию нуклеиновых кислот, с которыми они функционально связаны. Такие векторы обозначают в настоящем описании как "экспрессирующие векторы".

"Иммуноконъюгат" является антителом, конъюгированным с одной или более гетерологичными молекулами, включая, в качестве неограничивающих примеров, цитотоксическое средство.

"Эффективное количество" (или "терапевтически эффективное количество") является количеством, достаточным для осуществления благоприятного или желаемого клинического результата после лечения. Эффективное количество можно вводить индивидууму в одной или более дозах. В терминах лечения эффективное количество является количеством, достаточным для временного облегчения, улучшения, стабилизации, реверсирования или замедления прогрессирования заболевания или иного снижения патологических последствий заболевания. Эффективное количество, как

правило, определяет лечащий врач в индивидуальном порядке, и это входит в объем навыков специалиста в этой области. При определении подходящей дозы для достижения эффективного количества, как правило, учитывают несколько факторов. Эти факторы включают возраст, пол и массу индивидуума, состояния, подвергаемого лечению, тяжести состояния и формы и эффективной концентрации вводимых клеток.

Термин "индивидуум" в настоящем описании означает позвоночного, такого как человек или не являющееся человеком животное, например, млекопитающее. Млекопитающие включают, в качестве неограничивающих примеров, людей, приматов, сельскохозяйственных животных, спортивных животных, грызунов и питомцев. Неограничивающие примеры не являющихся человеком животных включают грызунов, таких как мыши, крысы, хомяки и морские свинки; кроликов; собак; кошек; овец; свиней; коз; крупного рогатого скота; лошадей; и не являющихся человеком приматов, таких как человекообразные и мартышкообразные обезьяны.

В рамках изобретения термин "лечение" (и его грамматические варианты, такие как "лечить") относится к клиническому вмешательству в попытке изменить естественное течение заболевания у индивидуума, подвергаемого лечению, и его можно осуществлять для профилактики или в ходе клинической патологии. Желаемые эффекты лечения включают, в качестве неограничивающих примеров, профилактику возникновения или рецидивирования заболевания, облегчение симптомов, уменьшение любых прямых или косвенных патологических последствий заболевания, профилактику метастазирования, снижение скорости прогрессирования заболевания, улучшение или временное облегчение состояния заболевания и ремиссию или улучшенный прогноз. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению используют для задержки развития заболевания или замедления прогрессирования заболевания, например, опухоли (острого миелолейкоза (AML)).

Термин "неоплазия" означает заболевание, отличающееся патологической пролиферацией клетки или ткани и ее последующей миграцией или инвазией в другие ткани или органы. Неопластический рост, как правило, является неконтролируемым и прогрессирующим и возникает в условиях, которые не будут вызывать деление нормальных клеток, или будут вызывать прекращение деления нормальных клеток.

Термины "содержит", "содержащий" должны иметь широкое значение, приписываемое им в патентном законодательстве США, и могут означать "включает", "включающий" и т.п.

В рамках изобретения термин "приблизительно" означает в пределах приемлемого диапазона ошибок для конкретного значения, определяемого специалистом в этой области, которое частично будет зависеть от того, как значение измеряют или определяют, т.е. ограничений системы измерения. Например, термин "приблизительно" может означать в пределах 3 или более 3 стандартных отклонений в соответствии с практикой в этой области. Альтернативно, термин "приблизительно" может означать диапазон до 20%, предпочтительно - до 10%, более предпочтительно - до 5%, и более

предпочтительно - до 1% от указанного значения. Альтернативно, в частности в отношении биологических систем или процессов, термин может означать в пределах порядка величины, предпочтительно - в пределах 5-кратного, и более предпочтительно - в пределах 2-кратного значения.

Как представлено в настоящем описании, любой диапазон концентраций, диапазон процентов, диапазон соотношений или диапазон целых чисел следует понимать как включающий значение любого целого числа в пределах указанного диапазона и, если это целесообразно, его долей (таких как одна десятая и одна сотая от целого числа), если не указано иначе.

Другие аспекты настоящего изобретения представлены в следующем описании и входят в объем настоящего изобретения.

5.2. CD371

CD371 (CEC12A), также известный как DCAL-2, MICL или CLL-1, является лектиновым трансмембранным гликопротеином С-типа массой 30 кДа. Он экспрессируется на моноцитах, гранулоцитах, естественных киллерах (NK) и базофилах. CD371 является иммуноингибиторным рецептором, рекрутирующим фосфатазы Src-гомологии SHP-1 и SHP-2 к их фосфорилированному цитоплазматическому иммунорецепторному тирозиновому ингибиторному мотиву (ITIM) (Sancho et al., *Annu Rev. Immunol* (2012); 30:491-529; Yan et al., *Front Immunol* (2015);6:408; Lahoud et al., *J Immunol* (2011);187:842). CD371 действует в качестве отрицательно регулирующего рецептора кристаллов мочевой кислоты (урата мононатрия, MSU), контролирующего аутоиммунитет и воспалительные заболевания (Neumann et al., *Immunity* (2014);40:389-99). CD371 является отрицательным регулятором функции гранулоцитов и моноцитов (Marshall et al., *J Biol Chem* (2004);279(15):14792-802; Pye et al., *Eur J Immunol* (2008);38(4):1157-63).

В некоторых вариантах осуществления CD371 является CD371 человека, содержащим или состоящим из аминокислотной последовательности со ссылкой в NCBI №: NP_612210.4 (SEQ ID NO: 15) или ее фрагмента.

SEQ ID NO: 15 приведена ниже:

MSEEVTYADL QFQNSSEMEK IPEIGKFGEK APPAPSHVWR PAALFLTLLC
LLLLIGLGVL

ASMFHVTLKI EMKKMNKLQN ISEELQRNIS LQLMSNMNIS NKIRNLSTTL
QTIATKLCRE

LYSKEQEHKC KPCPRRWIWH KDSCYFLSDD VQTWQESKMA CAAQNASLLK
INNKNLEFI

KSQSRSYDYW LGLSPEEDST RGMVRDNIIN SSAWVIRNAP DLNNMYCGYI
NRLYVQYYHC

TYKKRMICEK MANPVQLGST YFREA [SEQ ID NO: 15]

В некоторых вариантах осуществления CD371 содержит или состоит из аминокислотной последовательности, являющейся по меньшей мере на приблизительно

80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98% или по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 15, или ее фрагменту.

5.3. Антитела против CD371

Антитела по настоящему изобретению отличаются конкретными функциональными признаками или свойствами антител. Например, антитела специфически связываются с CD371 (например, связываются с CD371 человека).

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с аффинностью связывания, например с константой диссоциации (K_d) 1×10^{-6} М или менее, например, приблизительно 1×10^{-7} М или менее, приблизительно 1×10^{-8} М или менее, приблизительно 1×10^{-9} М или менее, приблизительно 1×10^{-10} М или менее, или приблизительно 1×10^{-11} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с K_d от приблизительно 1×10^{-8} М до приблизительно 1×10^{-7} М. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с K_d от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с K_d приблизительно $1,5 \times 10^{-8}$ М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с K_d приблизительно 1×10^{-8} М или менее. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с K_d приблизительно 1×10^{-8} М. В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 (например, CD371 человека) с K_d приблизительно 9×10^{-9} М.

Тяжелые и легкие цепи антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента могут являться полноразмерными (например, антитело может включать по меньшей мере одну (например, одну или две) полные тяжелые цепи и по меньшей мере одну (например, одну или две) полные легкие цепи) или могут включать антигенсвязывающую часть (Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv-фрагмент ("scFv")). В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела выбрана, например, из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD и IgE, в частности, выбрана из, например, IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления изотип иммуноглобулина представляет собой IgG1 (например, IgG1 человека). В

некоторых вариантах осуществления константная область легкой цепи антитела выбрана, например, из каппа или лямбда, в частности, каппа.

5.3.1. Одноцепочечные переменные фрагменты (scFv)

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение включает антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, имеющие последовательность scFv, слитую с одним или более константными доменами для образования антитела с Fc-областью иммуноглобулина человека для получения бивалентного белка, повышения общей авидности и стабильности антитела. Кроме того, Fc-часть делает возможной прямую конъюгацию других молекул, включая, в качестве неограничивающих примеров, флуоресцентные красители, цитотоксины, радиоактивные изотопы и т.д., с антителом, например, для использования в исследованиях по количественному анализу антигена, для иммобилизации антитела для измерений аффинности, для направленной доставки терапевтического средства, для тестирования на Fc-опосредованную цитотоксичность с использованием иммунных эффекторных клеток и во многих других областях использования.

Представленные результаты подчеркивают специфичность, чувствительность и пригодность антител по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов при таргетинге полипептида CD371 (например, CD371 человека).

Молекулы по настоящему изобретению основаны на идентификации и селекции одноцепочечных переменных фрагментов (scFv) с использованием фагового дисплея, аминокислотная последовательность которого придает молекуле специфичность к интересующему полипептиду CD371 и образует основу всех антигенсвязывающих белков по настоящему изобретению. Таким образом, scFv можно использовать для дизайна разнообразного массива молекул "антител", включая, например, полноразмерные антитела, их фрагменты, такие как Fab и F(ab')₂, минитела, слитые белки, включая слитые белки scFv-Fc, мультивалентные антитела, т.е. антитела, имеющие более одной специфичности к одному антигену или разным антигенам, например, биспецифические антитела, триатела и т.д. (см. Cuesta et al., Multivalent antibodies: when design surpasses evolution. Trends in Biotechnology 28:355-362 2010).

В некоторых вариантах осуществления антигенсвязывающий белок является полноразмерным антителом, тяжелые и легкие цепи антитела по настоящему изобретению могут являться полноразмерными (например, антитело может включать по меньшей мере одну или две полные тяжелые цепи и по меньшей мере одну и предпочтительно две полные легкие цепи) или могут включать антигенсвязывающий фрагмент (Fab, F(ab')₂, Fv или scFv). В некоторых вариантах осуществления константная область тяжелой цепи антитела выбрана из IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgM, IgA1, IgA2, IgD, IgE и т.д. В некоторых вариантах осуществления изотип иммуноглобулина выбран из IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. В некоторых вариантах осуществления изотип иммуноглобулина представляет собой IgG1 (например, IgG1 человека). Выбор изотипа антитела может зависеть от иммунной эффекторной функции, для выполнения которой сконструировано антитело.

В случае конструирования рекомбинантного иммуноглобулина, специалистам в этой области известны подходящие аминокислотные последовательности для константных областей различных изотипов иммуноглобулина и способы получения широкого спектра антител.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 является слитым белком scFv-Fc или полноразмерным IgG человека с областями V_H и V_L или CDR, выбранными из таблицы 1. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления scFv обозначен как "B031_P1_PH1B10" (также обозначаемый как "B10").

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 28-30 приведены в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 31-33 приведены в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, или ее консервативную модификацию, CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, или ее консервативную модификацию, CDR1 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28, CDR2 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, CDR3 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, CDR1 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31, CDR2 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и CDR3 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления переменные области связаны друг с другом таким образом, что переменная область тяжелой цепи (V_H) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления переменные области расположены от N- к C-концу: V_H-V_L. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 68, приведенной в таблице 1.

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи (V_L) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления переменные области расположены от N- к C-концу: V_L-V_H. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16, приведен в SEQ ID NO: 22. SEQ ID NO: 16 и 22 приведены в таблице 1 ниже.

Таблица 1

CDR	1	2	3
V _H	GFTFSDYQ [SEQ ID NO: 28]	IQGGGGST [SEQ ID NO: 29]	AREMWRGDYYSGMDV [SEQ ID NO: 30]
V _L	QSVLDSYNNENN [SEQ ID NO: 31]	WAS [SEQ ID NO: 32]	QQYTSEPIT [SEQ ID NO: 33]
Полная V _H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSG IQGGGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREM WRGDYYSGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 1]		
Полная V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLAWYQQKPGQPPK LLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYTSEPIF		

	GQGTKVEIK [SEQ ID NO: 2]
V _L -V _H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENNLA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLT ISSSLQAEDVAVYYCQQYTSEPIFGQGTKVEIKGGGG SGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSC AASGFTFSDYQMSWVRQAPGKGLEWVSGIQGGGGST YYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAV YYCAREMWRGDYYSGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 16]
ДНК для V _L - V _H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGT GTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCC AGCCAGAGTGTTTTAGACAGCTATAACAATGAGAA CAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCT CTAAGCTGCTCATTTACTGGGCATCTACCCGGGAAT CCGGGGTCCCTGACCGATTCAGTGGCAGCGGGTCTGG GACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCT GAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATAACC AGCGAACCTATCACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTG GAAATCAAAGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGT TCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTG CAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCT GGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATT CACCTTTAGCGACTATCAGATGAGCTGGGTCCGCCAG GCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGT CAGGCATT CAGGGTGGCGGTGGTAGCACATATTACGCAGACTCCG TGAA GGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCA AGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTG CCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCGAGAGATGT GGCGTGGGGACTACTACTCCGGTATGGACGTCTGGG GCCA GGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 22]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYQMSW VRQAPGKGLEWVSGIQGGGGSTYYADSVKGRFTISR DN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREMWRGDYY SGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGSDI VMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSYNNENN LA WYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGS GTDFTLTISSSLQAEDVAVYYCQQYTSEPIFGQGTK VEIK [SEQ ID NO: 68]

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4, необязательно с линкерной последовательностью, например, линкерным пептидом, между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность,

приведенную в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 3 и 4 приведены в таблице 2 ниже. В некоторых вариантах осуществления scFv обозначают как "B031_P1_PH1C3" (также обозначаемый как "C3").

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 является слитым белком scFv-Fc или полноразмерным IgG человека с областями V_H и V_L или CDR, выбранными из таблицы 2. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, как показано в таблице 2. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 34-36 приведены в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 37-39 приведены в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, или ее консервативную модификацию, CDR3 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, или ее консервативную модификацию, CDR1 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34, CDR2 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35,

CDR3 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, CDR1 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37, CDR2 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и CDR3 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к C-концу: V_H-V_L. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 69, приведенной в таблице 2.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи (V_L) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к C-концу: V_L-V_H. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 17. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17, приведен в SEQ ID NO: 23. SEQ ID NO: 17 и 23 приведены в таблице 2 ниже.

Таблица 2

CDR	1	2	3
V _H	GFTFTSYA [SEQ ID NO: 34]	IDGSGGGT [SEQ ID NO: 35]	ARAYYDIL [SEQ ID NO: 36]
V _L	QSVLSSYNNENN [SEQ ID NO: 37]	AAS [SEQ ID NO: 38]	QYYSEPYT [SEQ ID NO: 39]
Полная V _H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIDGSGGGTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYDILTGYPVDGMDVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 3]		
Полная V _L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLA WYQQKPGQPPKLLIYA AASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQYYSEPYTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 4]		
V _L -V _H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLA WYQQKPGQPPKLLIYA AASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQYYSEPYTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSC		

	AASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGIDGSGGGTNYADSVKGRFTISR DNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYYDILTGYPVDGMDVWGQGTTV TVSS [SEQ ID NO: 17]
ДНК для V _L - V _H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCG AGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAAGCAGCTA TAACAATGAGAACAAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCT CCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTG ACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTAT AGCGAACCTTATACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAAAGGTG GTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGG ATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAGCTA TGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT GTCAGGCATTGACGGTAGCGGTGGTGGCACAAATTACGCAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC GAGAGCGTATTACGATATTTTGACTGGTTACCCCGTGGACGGTATGGAC GTCTGGGGGCAAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 23]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGI DGSGGGTNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAYY DILTGYPVDGMDVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ SPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLSSYNNENNLAQYQQKPGQPPKLLIYAAS TRESGVLPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSEPYTFGQGTKV EIK [SEQ ID NO: 69]

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6, необязательно, с линкерной последовательностью, например, линкерным пептидом, между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 5 и 6 приведены в таблице 3 ниже. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 обозначают как "B031_P1_PH1D6" (также обозначаемый как "D6").

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 является слитым белком scFv-Fc или полноразмерным IgG человека с областями V_H и V_L или CDR,

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40, CDR2 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41, CDR3 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, CDR1 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43, CDR2 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44, и CDR3 V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к C-концу: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 70, приведенной в таблице 3.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи (V_L) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к C-концу: V_L - V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 18. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18, приведен в SEQ ID NO: 24. SEQ ID NO: 18 и 24 приведены в таблице 3 ниже.

Таблица 3

CDR	1	2	3
V_H	GFTFTDYA [SEQ ID NO: 40]	IDGSGGST [SEQ ID NO: 41]	ALELGATTVY [SEQ ID NO: 42]
V_L	QSVLRSSNNKNN [SEQ ID NO: 43]	AAS [SEQ ID NO: 44]	QQYYREPLT [SEQ ID NO: 45]
Полная V_H	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIDGSGGSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALELGATTVYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 5]		
Полная V_L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLRSSNNKNNLAWYQQKPGQPPKLLIYA AASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYREPLTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 6]		
V_L - V_H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLRSSNNKNNLAWYQQKPGQPPKLLIYA AASTRESGV PDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYYREPLTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWVSDIDGSGGSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALELGATTVYWGQGTLVTVSS [SEQ ID NO: 18]		
ДНК	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCG		

для V _L - V _H scFv	AGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTACGCAGCAG CAACAATAAAAAACAATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCT CCTAAGCTGCTCATTTACGCCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTG ACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAG CAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATATTAT CGCGAACCTCTGACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAAAGGTG GTGGTGGTTTCAGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGG ATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG GGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCGACTA TGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGT GTCAGACATTGACGGTAGCGGTGGTAGCACAGACTACGCAGACTCCGTG AAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATC TGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGC GCTAGAGCTGGGAGCTACTACCGTCTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTC ACCGTCTCCTCA [SEQ ID NO: 24]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDYAMSWVRQAPGKGLEWVSD IDGSGGSTDYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCALELG ATTVYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQSPDSLAVSL GERATINCKSSQS VLRSSNNKNNLAWYQQKPGQPPKLLIYAASTRESGVPD RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYREPLTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 70]

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8, необязательно, с линкерной последовательностью, например, линкерным пептидом, между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 7 и 8 приведены в таблице 4 ниже. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 обозначают как "B031_P1_PH2A11" (также обозначаемый как "A11").

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 является слитым белком scFv-Fc или полноразмерным IgG человека с областями V_H и V_L или CDR, выбранными из таблицы 4. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 14. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L соединены линкером. В некоторых

вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к С-концу: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления CD371 scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 71, приведенной в таблице 4.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи (V_L) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к С-концу: V_L - V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 19. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, приведен в SEQ ID NO: 25. SEQ ID NO: 19 и 25 приведены в таблице 4 ниже.

Таблица 4

CDR	1	2	3
V_H	GFTFTSTQ [SEQ ID NO: 46]	ISGYGGST [SEQ ID NO: 47]	AKDTEVSGDAFDI [SEQ ID NO: 48]
V_L	QSV DSSN [SEQ ID NO: 49]	GAS [SEQ ID NO: 50]	QQYRSWPIT [SEQ ID NO: 51]
Полная V_H	EVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASGFTFTSTQMSWVRQAPGKGLEWVS EISGYGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD TEVSGDAFDIWGQGTMVTVSS [SEQ ID NO: 7]		
Полная V_L	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSV DSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRSWPITFGQGT KVEIK [SEQ ID NO: 8]		
V_L - V_H scFv	EIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSV DSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYG ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRSWPITFGQGT KVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES G GGLVQP G GSLRLSCAASG FTFTSTQMSWVRQAPGKGLEWVSEISGYGGSTYYADSVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDTEVSGDAFDIWGQGTMVTVSS [SEQ ID NO: 19]		
ДНК для V_L - V_H scFv	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGG AACGTGCCACCCTCTCCTGCCGTGCCAGTCAGAGTGTTGACAGCAGCA ATTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCCGACTCCTCAT CTATGGCGCATCTAGCCGTGCCACTGGTATCCCAGACCGTTTCAGTGGC		

	AGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCT GAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCAGTATCGCAGCTGGCCTATCA CGTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAAAGGTGGTGGTGGTTCAG GTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGGTGGTGGTGGATCCGAGGTGC AGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGC GACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTACCAGCACCCAGATGAG CTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGGTGTCAGAGAT TAGCGGTTATGGTGGTAGCACATACTACGCAGACTCCGTGAAGGGCCG GTTACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG AACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTGTATTACTGTGCAAAGAC ACGGAGGTTTCGGGAGATGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATG GTCACCGTCTCTTCA [SEQ ID NO: 25]
V _H -V _L scFv	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSTQMSWVRQAPGKGLEWVS EISGYGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKD TEVSGDAFDIWGQGTMVTVSSGGGSGGGGSGGGSGGGGSEIVLTQSPGT LSLSPGERATLSCRASQSDSSNLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPD RFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYRSWPITFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 71]

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10, необязательно, с линкерной последовательностью, например, линкерным пептидом, между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 9 и 10 приведены в таблице 5. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 обозначают как "B031_P1_PH2E4" (также обозначаемый как "E4").

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 является слитым белком scFv-Fc или полноразмерным IgG человека с областями V_H и V_L или CDR, выбранными из таблицы 5. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10.

В некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи (V_H) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления переменные области расположены от N- к C-концу: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 72, приведенной в таблице 5.

В некоторых вариантах осуществления переменная область легкой цепи (V_L) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления переменные области расположены от N- к C-концу: V_L - V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 20. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20, приведен в SEQ ID NO: 26. SEQ ID NO: 20 и 26 приведены в таблице 5 ниже.

Таблица 5

CDR	1	2	3
V_H	GFTFTSY [SEQ ID NO: 52]	ISGSGDST [SEQ ID NO: 53]	AREAGGDYDSGAFDI [SEQ ID NO: 54]
V_L	QSVLYSGNNKNY [SEQ ID NO: 55]	GAS [SEQ ID NO: 56]	QQYDYAPFT [SEQ ID NO: 57]
Полная V_H	EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGDSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAGGDYDSGAFDIWGQGTMTVSS [SEQ ID NO: 9]		
Полная V_L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSGNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYDYAPFTFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 10]		
V_L - V_H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSGNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYCQQYDYAPFTFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSYMSWVRQAPGKGLEWVSGISGSGDSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREAGGDYDSGAFDIWGQGTMTVSS [SEQ ID NO: 20]		
ДНК для V_L - V_H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTATATAGCGGCAACAATAAAAACTATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCTAAGCTGCTCATTTACGGCGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCCTGACCGATTCAAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAATA		

	TGACTATGCCCCTTTTACGTTTCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAA AGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTTCTGGCGGCGGCTCCGGTGG TGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA GCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTT ACCAGCTATTATATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTGTCAGGCATTAGCGGTAGCGGTGACAGCACAAGCTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCTGTG TATTACTGTGCGAGAGAGGCAGGTGGTGACTACGATAGTGGTGCTTTT GATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA [SEQ ID NO: 26]
V _H -V _L scFv	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTSY YMSWVRQAPGKGLEWVS GISGSGDSTSYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE AGGDYDSGAFDIWGQGTMTVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSDIVMTQ SPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSGNNKNYLA WYQQKPGQP PKLLIYG ASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQYDYAPFTFGQG TKVEIK [SEQ ID NO: 72]

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12, необязательно, с линкерной последовательностью, например, линкерным пептидом, между вариабельной областью тяжелой цепи и вариабельной областью легкой цепи. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13. SEQ ID NO: 11 и 12 приведены в таблице 6 ниже. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 обозначают как "B031_P1_PH2E8" (также обозначаемый как "E8").

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 является слитым белком scFv-Fc или полноразмерным IgG человека с областями V_H и V_L или CDR, выбранными из таблицы 6. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и V_L, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, или ее

консервативную модификацию, CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 58-60 приведены в таблице 6.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию. SEQ ID NO: 61-63 приведены в таблице 6.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, или ее консервативную модификацию, CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, или ее консервативную модификацию, CDR1 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, или ее консервативную модификацию, CDR2 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, или ее консервативную модификацию, и CDR3 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63, или ее консервативную модификацию.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит CDR1 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, CDR2 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59, CDR3 V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60, CDR1 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, CDR2 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62, и CDR3 V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит V_H , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и V_L , содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L соединены линкером. В некоторых вариантах осуществления линкер содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 13.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область тяжелой цепи (V_H) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к C-концу: V_H - V_L . В некоторых вариантах осуществления scFv против

CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 73, приведенной в таблице 6.

В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи (V_L) расположена на N-конце. В некоторых вариантах осуществления вариабельные области расположены от N- к С-концу: V_L - V_H . В некоторых вариантах осуществления scFv против CD371 содержит аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 21. Пример нуклеотидной последовательности, кодирующей аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, приведен в SEQ ID NO: 27. SEQ ID NO: 21 и 27 приведены в таблице 6 ниже.

Таблица 6

CDR	1	2	3
V_H	GFTFSSYA [SEQ ID NO: 58]	IDGEGGYT [SEQ ID NO: 59]	AREGVDDYDILTGYYPYG MDV [SEQ ID NO: 60]
V_L	QSVLDSSNNKNY [SEQ ID NO: 61]	DAS [SEQ ID NO: 62]	QQGTSSPLT [SEQ ID NO: 63]
Полная V_H	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS EIDGEGGYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE GVDYDILTGYYPYGM DVWGQGTTVTVSS [SEQ ID NO: 11]		
Полная V_L	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQGTSSPL TFGQGTKVEIK [SEQ ID NO: 12]		
V_L - V_H scFv	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYLAWYQQKPGQPP KLLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQGTSSPL TFGQGTKVEIKGGGGSGGGSGGGSGGGGSEVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSEIDGEGGYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGVDDYDILTGYYPYGM DVWG QGTTVTVSS [SEQ ID NO: 21]		
ДНК для V_L - V_H scFv	GACATCGTGATGACCCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCG AGCGTGCCACCATCAACTGCAAGTCCAGCCAGAGTGTTTTAGACAGCA GCAACAATAAAAACTATTTAGCTTGGTATCAGCAGAAACCAGGACAGC CTCCTAAGCTGCTCATTTACGACGCATCTACCCGGGAATCCGGGGTCCC TGACCGATT CAGTGGCAGCGGGTCTGGGACAGATTTCACTCTCACCAT CAGCAGCCTGCAGGCTGAAGATGTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAAGG CACCAGCAGCCCTCTGACGTTCCGGCCAAGGTACCAAGGTGGAAATCAA AGGTGGTGGTGGTTCAGGTGGTGGTGGTCTGGCGGCGGCTCCGGTGG TGGTGGATCCGAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACA		

	GCCTGGGGGGTCCCTGCGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACCTTT AGCAGCTATGCCATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTG GAGTGGGTGTCAGAGATTGACGGTGAGGGTGGTTATACAAATTACGCA GACTCCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGTGACAATTCCAAGAAC ACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGCGTGCCGAGGACACGGCCGTG TATTACTGTGCGAGAGAAGGGGTAGATTACGATATTTTGACTGGTTATT ATCCTTACGGTATGGACGTCTGGGGCCAAGGGACCACGGTCACCGTCT CCTCA [SEQ ID NO: 27]
V _H -V _L scFv	EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVS EIDGEGGYTNYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE GVDYDILTGYYPYGM DVWGQGTTVTVSSGGGGSGGGSGGGSGGGGSD IVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLDSSNNKNYLAWYQQKPGQPPK LLIYDASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQGTSSPLT FGQG TKVEIK [SEQ ID NO: 73]

5.3.2. Моноклональные антитела

Настоящее изобретение относится к антителам (например, антителам человека, например, моноклональным антителам человека), специфически связывающимся с CD371 (например, CD371 человека). Аминокислотные последовательности V_H антител против CD371 B031_P1_PH1B10 (также обозначаемого как "B10"), B031_P1_PH1C3 (также обозначаемого как "C3"), B031_P1_PH1D6 (также обозначаемого как "D6"), B031_P1_PH2A11 (также обозначаемого как "A11"), B031_P1_PH2E4 (также обозначаемого как "E4") и B031_P1_PH2E8 (также обозначаемого как "E8") приведены в SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 и 11, соответственно. Аминокислотные последовательности V_L B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 и 12, соответственно.

Учитывая, что каждое из антител B031_P1_PH1B10 (B10), B031_P1_PH1C3 (C3), B031_P1_PH1D6 (D6), B031_P1_PH2A11 (A11), B031_P1_PH2E4 (E4) и B031_P1_PH2E8 (E8) может связываться с CD371, последовательности V_H и V_L можно "сочетать и комбинировать" для получения других связывающих молекул против CD371. Связывание с CD371 таких "сочетанных и комбинированных" антител можно тестировать с использованием анализов связывания, известных в этой области, включая например, ELISA, вестерн-блоттинг, RIA, анализ Biacore. Предпочтительно, если V_H и V_L сочетают и комбинируют, последовательность V_H из конкретной пары V_H/V_L заменяют структурно схожей последовательностью V_H. Аналогично, последовательность V_L из конкретной пары V_H/V_L заменяют структурно схожей последовательностью V_L.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или части, содержащей: (a) переменную область тяжелой цепи (V_H), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 1, 3, 5, 7, 9 и 11; и (b) переменную

область легкой цепи (V_L), содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 2, 4, 6, 8, 10 и 12; где антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD371, например, CD371 человека. В некоторых вариантах осуществления V_H и V_L выбраны из:

(а) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2; или

(b) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(с) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

(d) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(е) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; и

(f) вариабельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и вариабельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, содержащим CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи B10, C3, D6, A11, E4 и E8.

Аминокислотные последовательности CDR1 V_H B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 28, 34, 40, 46, 52 и 58, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_H антител B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 29, 35, 41, 47, 53 и 59, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_H B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 30, 36, 42, 48, 54 и 60, соответственно.

Аминокислотные последовательности CDR1 V_L B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 31, 37, 43, 49, 55 и 61, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR2 V_L B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 32, 38, 44, 50, 56 и 62, соответственно. Аминокислотные последовательности CDR3 V_L B10, C3, D6, A11, E4 и E8 приведены в SEQ ID NO: 33, 39, 45, 51, 57 и 63, соответственно. Подчеркнуты области CDR с использованием системы IMGT. В некоторых вариантах осуществления подчеркнуты области CDR с использованием системы нумерации IMGT, доступной на http://www.imgt.org/IMGT_vquest/input.

Учитывая, что каждое из этих антител или их антигенсвязывающих фрагментов могут связываться с CD371, и что специфичность связывания антигена обеспечивается,

главным образом, областями CDR1, CDR2 и CDR3, последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и последовательности CDR1, CDR2 и CDR3 V_L можно "сочетать и комбинировать" (т.е. CDR из разных антител можно сочетать и комбинировать, хотя каждое антитело должно содержать CDR1, CDR2 и CDR3 V_H и CDR1, CDR2 и CDR3 V_L) для получения других связывающих молекул против CD371. Связывание CD371 такими "сочетанными и комбинированными" антителами можно тестировать с использованием описанных выше анализов связывания. Если последовательности CDR V_H сочетать и комбинировать, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_H заменяют структурно схожими последовательностями CDR. Аналогично, если последовательности CDR V_L сочетать и комбинировать, последовательность CDR1, CDR2 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_L , предпочтительно, заменяют структурно схожими последовательностями CDR. Как правило, специалистам в этой области будет очевидно, что новые последовательности V_H и V_L можно получать посредством замен последовательностей одной или более областей CDR V_H и/или V_L структурно схожими последовательностями из последовательностей CDR антител или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем описании, B10, C3, D6, A11, E4 и E8.

В некоторых вариантах осуществления настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или части, содержащей:

- (a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 28, 34, 40, 46, 52 и 58;
- (b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 29, 35, 41, 47, 53 и 59;
- (c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 30, 36, 42, 48, 54 и 60;
- (d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 31, 37, 43, 49, 55 и 61;
- (e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 32, 38, 44, 50, 56 и 62; и
- (f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO: 33, 39, 45, 51, 57 и 63.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

- (a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28;
- (b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29;
- (c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 31;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33.

В некоторых вариантах осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 37;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 43;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 44; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 49;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 50; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 55;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 56; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57.

В некоторых вариантах осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59;

(c) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60;

(d) CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61;

(e) CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и

(f) CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

Константную область/каркасную область антител против CD371, представленных в настоящем описании, можно изменять, например, посредством замены аминокислоты, для модификации свойств антитела (например, для повышения или снижения одного или более из: аффинности связывания с антигеном, связывания Fc-рецептора, содержания

углеводов в антителе, например, гликозилирования, фукозилирования и т.д., количества остатков цистеина, функции эффекторных клеток, функции комплемента или встраивания участка конъюгации).

В некоторых вариантах осуществления антитело против CD371 по настоящему изобретению является полностью человеческим антителом, например, любым из B10, C3, D6, A11, E4 и E8. Полностью человеческие mAb при введении людям вызывают серьезные побочные эффекты, включая анафилаксию и реакции гиперчувствительности.

Использование библиотек фагового дисплея делает возможной селекцию больших количеств репертуаров антител для уникальных и редких Ab против очень определенных эпитопов (больше подробностей о фаговом дисплее см. в McCafferty et al., Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains. Nature, 348: 552-554). Таким образом, становится возможной быстрая идентификация Fab человека или одноцепочечных Fv (scFV) фрагментов, высокоспецифических в отношении полученных из опухолевого антигена молекул комплексов пептид-МНС. Кроме того, конструируя полноразмерное моноклональное антитело (mAb) с использованием Fab-фрагментов, можно напрямую получать терапевтическое mAb человека, избегая месяцев трудоемкой работы, как правило, необходимой для разработки терапевтических mAb. Настоящее изобретение включает разработку полностью человеческого mAb, распознающего, например, полипептид CD371 человека (например, полипептид, имеющий аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 23), для противоопухолевой терапии, например, для лечения AML.

5.3.3. Гомологичные антитела

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменные области тяжелой и легкой цепи, содержащие аминокислотные последовательности, являющиеся гомологичными или идентичными аминокислотным последовательностям антител, представленным в настоящем описании (например, антител B10, C3, D6, A11, E4 и E8), и где антитела или их антигенсвязывающие фрагменты сохраняют желаемые функциональные свойства антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению.

Например, настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или части, содержащей переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где:

(а) переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или

идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11;

(b) вариабельная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12; и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с CD371 человека с K_d 1×10^{-7} М или менее или K_d 1×10^{-8} М или менее.

В некоторых вариантах осуществления аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут являться по меньшей мере на приблизительно 80%, приблизительно 81%, приблизительно 82%, приблизительно 83%, приблизительно 84%, приблизительно 85%, приблизительно 86%, приблизительно 87%, приблизительно 88%, приблизительно 89%, приблизительно 90%, приблизительно 91%, приблизительно 92%, приблизительно 93%, приблизительно 94%, приблизительно 95%, приблизительно 96%, приблизительно 97%, приблизительно 98% или приблизительно 99% гомологичными или идентичными приведенным выше последовательностям. Антитело, имеющее области V_H и V_L , имеющие высокую (т.е. 80% или более) гомологию или идентичность в отношении областей V_H и V_L приведенных выше последовательностей, можно получать посредством мутагенеза (например, сайт-специфического или ПЦР-опосредованного мутагенеза) с последующим тестированием кодируемого измененного антитела на сохраняемую функцию (т.е. аффинность связывания) с использованием анализов связывания, представленных в настоящем описании.

В рамках изобретения процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями эквивалентен проценту идентичности между двумя последовательностями. Процент идентичности или гомологии между двумя последовательностями является функцией количества идентичных положений, общих для последовательностей (т.е. % гомологии = количество идентичных положений / общее количество положений $\times$ 100), с учетом количества пропусков и длины каждого пропуска, который необходимо включить для оптимального выравнивания двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности между двумя последовательностями можно осуществлять с использованием математического алгоритма, как описано в неограничивающих примерах ниже.

Процент гомологии или идентичности между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма E. Meyers and W. Miller (Comput Appl Biosci (1988);14:11-17), встроенного в программу ALIGN (версии 2.0),

с использованием таблицы весов замен остатков PAM120, штрафа за длину пропуска 12 и штрафа пропуска 4. Кроме того, процент гомологии между двумя аминокислотными последовательностями можно определять с использованием алгоритма Needleman and Wunsch (J Mol Biol (1970);48:444-453), встроенного в программу GAP в пакете программ GCG (доступном на www.gcg.com) с использованием матрицы Blossum 62 или матрицы PAM250, веса пропуска 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса удлинения пропуска 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

Дополнительно или альтернативно, белковые последовательности по настоящему изобретению можно дополнительно использовать в качестве "последовательности запроса" для проведения поиска в общедоступных базах данных, например, для идентификации родственных последовательностей. Такие поиски можно осуществлять с использованием программы XBLAST (версии 2.0) по Altschul et al., J Mol Biol(1990);215:403-10. Поиски белков в BLAST можно осуществлять с помощью программы XBLAST, баллы=50, длина слова=3 для получения аминокислотных последовательностей, гомологичных молекулам антител по изобретению. Для получения выравнивания с пропусками в целях сравнения можно использовать Gapped BLAST, как описано в Altschul et al., Nucleic Acids Res (1997);25(17):3389-3402. При использовании программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать параметры по умолчанию соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST).

5.3.4. Антитела с консервативными модификациями

В некоторых вариантах осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или более из этих последовательностей CDR содержат определенные аминокислотные последовательности на основе предпочтительных антител, представленных в настоящем описании (например, антител B10, C3, D6, A11, E4 и E8), или их консервативные модификации, и где антитела сохраняют желаемые функциональные свойства антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению. Настоящее изобретение относится к антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или части, содержащей переменную область тяжелой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, содержащую последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где:

(а) последовательность CDR3 переменной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 36, 42, 48, 54 и 60 и их консервативных модификаций;

(b) последовательность CDR3 переменной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 33, 39, 45, 51, 57 и 63 и их консервативных модификаций; и

где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 человека с $K_d 1 \times 10^{-7}$ М или менее или $K_d 1 \times 10^{-8}$ М или менее.

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR3 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 30, 36, 42, 48, 54 и 60 и их консервативных модификаций; и последовательность CDR3 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 33, 39, 45, 51, 57 и 63 и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR2 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 29, 35, 41, 47, 53 и 59 и их консервативных модификаций; и последовательность CDR2 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 32, 38, 44, 50, 56 и 62 и их консервативных модификаций.

В некоторых вариантах осуществления последовательность CDR1 вариабельной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 28, 34, 40, 46, 52 и 58 и их консервативных модификаций; и последовательность CDR1 вариабельной области легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, выбранную из аминокислотных последовательностей SEQ ID NO: 31, 37, 43, 49, 55 и 61 и их консервативных модификаций.

В рамках изобретения термин "консервативные модификации последовательности" предназначен для обозначения модификаций аминокислот, не влияющих или изменяющих значимо характеристики связывания антитела, содержащего аминокислотную последовательность. Такие консервативные модификации включают замены, добавления и делеции аминокислот. Модификации можно вносить в антитело по изобретению стандартными способами, известными в этой области, такими как сайт-специфический мутагенез и ПЦР-опосредованный мутагенез.

Консервативные аминокислотные замены являются заменами, при которых аминокислотный остаток заменяют аминокислотным остатком, имеющим схожую боковую цепь. В этой области определены семейства аминокислотных остатков, имеющих схожие боковые цепи. Примеры консервативных аминокислотных замен приведены в таблице 7. Замены аминокислот можно вносить в интересующее антитело и подвергать продукты скринингу на желаемую активность, например, сохраненное/улучшенное связывание антигена, сниженную иммуногенность или улучшенную ADCC или CDC. В некоторых вариантах осуществления последовательность, представленная в настоящем

описании, например, последовательность CDR, последовательность V_H или последовательность V_L, может иметь до приблизительно одной, до приблизительно двух, до приблизительно трех, до приблизительно четырех, до приблизительно пяти, до приблизительно шести, до приблизительно семи, до приблизительно восьми, до приблизительно девяти или до приблизительно десяти аминокислотных остатков, являющихся модифицированными и/или замененными.

Таблица 7

Исходный остаток	Пример консервативных аминокислотных замен
Ala (A)	Val; Leu; Ile
Arg (R)	Lys; Gln; Asn
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg
Asp (D)	Glu; Asn
Cys (C)	Ser; Ala
Gln (Q)	Asn; Glu
Glu (E)	Asp; Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe
Lys (K)	Arg; Gln; Asn
Met (M)	Leu; Phe; Ile
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Val; Ser
Trp (W)	Tyr; Phe
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala

Аминокислоты можно группировать по общим свойствам боковой цепи:

гидрофобный: норлейцин, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

нейтральные гидрофильные: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

кислые: Asp, Glu;

основные: His, Lys, Arg;

остатки, влияющие на ориентацию цепи: Gly, Pro;

ароматические: Trp, Tyr, Phe.

Неконсервативные замены повлечет за собой замену члена одного из этих классов другим классом.

5.3.5. Антитела против CD371, перекрестно конкурирующие за связывание с CD371 с антителами против CD371 по изобретению

Настоящее изобретение относится к антителам или их антигенсвязывающим фрагментам, перекрестно конкурирующим с любыми из описанных антител против CD371 за связывание с CD371 (например, CD371 человека). В качестве неограничивающих примеров, перекрестно конкурирующие антитела могут связываться с той же областью эпитопа, например, тем же эпитопом, смежным эпитопом или областью перекрывания, что любое из антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления референсное антитело или его референсные антигенсвязывающие фрагменты для исследования перекрестной конкуренции могут являться любыми из антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, представленных в настоящем описании, например, антител B10, C3, D6, A11, E4 и E8.

Такие перекрестно конкурирующие антитела можно идентифицировать по их способности перекрестно конкурировать с любыми из антител против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов в стандартных анализах связывания CD371. Например, для демонстрации перекрестной конкуренции с антителами по настоящему изобретению можно использовать анализ Biacore, анализы ELISA или проточную цитометрию. Способность тестового антитела ингибировать связывание, например, любого из антител против CD371 по настоящему изобретению (например, антител B10, C3, D6, A11, E4 и E8), с CD371 (например, CD371 человека) свидетельствует о том, что тестовое антитело может конкурировать с любыми из антител против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов за связывание с CD371 (например, CD371 человека) и, таким образом, связывается с той же областью эпитопа на CD371 (например, CD371 человека), что и любое из антител против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов. В некоторых вариантах осуществления перекрестно конкурирующее антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с тем же эпитопом на CD371 (например, CD371 человека), что и любое из антител против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов.

5.3.6. Характеризация связывания антитела с антигеном

Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно тестировать на связывание с CD371 с помощью, например, стандартного ELISA. Для определения того, связываются ли выбранные антитела против CD371 с уникальными эпитопами, каждое антитело можно биотинилировать с использованием коммерчески доступных реагентов (Pierce, Rockford, IL). Конкурентные исследования с использованием немеченых моноклональных антител и биотинилированных моноклональных антител можно осуществлять с использованием покрытых CD371 планшетов для ELISA, как

описано выше. Связывание биотинилированного mAb можно определять с помощью зонда стрептавидин-щелочная фосфатаза.

Для определения изотипа очищенных антител, можно осуществлять ELISA изотипа с использованием реагентов, специфических для антител конкретного изотипа. IgG против CD371 человека можно дополнительно тестировать на реакционную способность в отношении антигена CD371 посредством вестерн-блоттинга.

В некоторых вариантах осуществления K_d измеряют с помощью анализа связывания радиоактивно меченого антигена (RIA). В некоторых вариантах осуществления RIA осуществляют с использованием Fab-версии интересующего антитела и его антигена. Например, аффинность связывания Fab в растворе с антигеном измеряют посредством уравнивания Fab с минимальной концентрацией (^{125}I)-меченого антигена в присутствии серии титров немеченого антигена, а затем захвата связанного антигена с планшетом, покрытым антителом против Fab (см., например, Chen et al., J Mol Biol(1999);293:865-881).

В некоторых вариантах осуществления K_d измеряют с использованием анализа поверхностного плазмонного резонанса BIACORE[®]. Например, анализа с использованием BIACORE[®]-2000 или BIACORE[®]-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ).

5.3.7. Иммуноконъюгаты

Настоящее изобретение относится к антителу против CD371 или его антигенсвязывающему фрагменту, конъюгированному с терапевтическим остатком, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммуносупрессор) или радиотоксин. Такие конъюгаты обозначают в настоящем описании как "иммуноконъюгаты". Иммуноконъюгаты, включающие один или более цитотоксинов, обозначают как "иммунотоксины". Цитотоксин или цитотоксическое средство включает любое средство, являющееся вредоносным для клеток (например, уничтожающее их). Неограничивающие примеры цитотоксинов включают таксол (такой как ризин, дифтерийный токсин, гелонин), цитохалазин В, грамицидин D, бромистый этидий, эметин, митомицин, этопозид, тенипозид, винкристин, винбластин, колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидротестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пуромицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические средства также включают, например, калихеамицин, ауристатин, антиметаболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), алкилирующие средства (например, мехлоретамин, тиотепа, хлорамбуцил, мелфалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклофосфамид, бусульфан, дибромманнит, стрептозотоцин, митомицин С и цис-дихлордиаминплатину (II) (DDP) цисплатин), антрациклины (например, даунорубицин (ранее известный как дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (ранее известный как актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (AMC)), гипометилирующие средства (азациитидин и децитабин) и антимитотические средства (например, винкристин и винбластин).

Другие примеры терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителом против CD371, представленным в настоящем описании, включают дуокармицины, калихимицины, майтанзины, ауристатины и их производные. Цитотоксины можно конъюгировать с антителом против CD371 или его антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании, с использованием линкерной технологии, доступной в этой области. Неограничивающие примеры типов линкеров, используемых для конъюгации цитотоксина с антителом, включают гидразоны, тиозфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептид-содержащие линкеры. Можно выбирать линкер, например, восприимчивый к расщеплению при низком pH в лизосомальном компартменте или восприимчивый к расщеплению протеазами, такими как протеазы, преференциально экспрессирующиеся в опухолевой ткани, такие как катепсины (например, катепсины B, C, D). Дополнительное обсуждение типов цитотоксинов, линкеров и способов конъюгации терапевтических средств с антителами также см. в Saito, G. et al. (2003) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 55:199-215; Trail, P.A. et al. (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Allen, T.M. (2002) *Nat. Rev. Cancer* 2:750-763; Pastan, I. and Kreitman, R. J. (2002) *Curr. Opin. Investig. Drugs* 3:1089-1091; Senter, P.D. and Springer, C.J. (2001) *Adv. Drug Deliv. Rev.* 53:247-264.

Антитела против CD371 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению также можно конъюгировать с радиоактивным изотопом для получения цитотоксических радиофармацевтических средств, также обозначаемых как радиоиммуноконъюгаты. Неограничивающие примеры радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для диагностического или терапевтического использования, включают ^{90}Y , ^{131}I , ^{225}Ac , ^{213}Bi , ^{223}Ra и ^{227}Th . В этой области известны способы получения радиоиммуноконъюгатов. Примеры радиоиммуноконъюгатов коммерчески доступны, включая ZevalinTM (IDEC Pharmaceuticals) и BexxarTM (Corixa Pharmaceuticals), и можно использовать схожие способы для получения радиоиммуноконъюгатов с использованием антител по изобретению.

Конъюгаты антител по настоящему изобретению можно использовать для модификации указанного биологического ответа, и термин "остаток лекарственного средства" не следует истолковывать как ограниченные классическими химическими терапевтическими средствами. Например, остаток лекарственного средства может являться белком или полипептидом, обладающим желаемой биологической активностью. Такие белки могут включать, например, ферментативно активный токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, псевдомонадный экзотоксин или дифтерийный токсин; белок, такой как фактор некроза опухоли (ФНО) или интерферон- γ ; или модификаторы биологического ответа, такие как, например, лимфокины, интерлейкин-1 (ИЛ-1), интерлейкин-2 (ИЛ-2), интерлейкин-6 (ИЛ-6), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (ГМ-КСФ), гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (Г-КСФ) или другие факторы роста.

Способы конъюгации такого терапевтического остатка с антителами хорошо известны, см., например, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", в *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic agents In Cancer Therapy: A Review", в *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", в *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), и Thorpe et al., "The preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982).

5.3.8. Биспецифические молекулы

Настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, содержащим антитело против CD371 или его фрагмент, представленное в настоящем описании. Антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно дериватизировать или связывать с другой функциональной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом для рецептора) для получения биспецифической молекулы, связывающейся с по меньшей мере двумя разными участками связывания или молекулами-мишенями. Антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, фактически, можно дериватизировать или связывать с несколькими другими функциональными молекулами для получения мультиспецифических молекул, связывающихся с более чем двумя разными участками связывания и/или молекулами-мишенями; такие мультиспецифические молекулы также предназначены для включения в термин "биспецифическая молекула" в рамках изобретения. Для получения биспецифической молекулы антитело по настоящему изобретению против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент можно функционально связывать (например, посредством химического сочетания, генетического слияния, нековалентного связывания или др.) с одним или более другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или связывающий миметик, таким образом, получая биспецифическую молекулу.

Настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, имеющим по меньшей мере первую специфичность связывания с CD371 и вторую специфичность связывания со вторым эпитопом-мишенью. Второй эпитоп-мишень может являться эпитопом CD371 или не-CD371 эпитопом, например, другим антигеном. В некоторых вариантах осуществления биспецифическая молекула является мультиспецифической, молекула может дополнительно включать третью специфичность связывания. Если первая часть биспецифического антитела связывается с антигеном на опухолевой клетке, например, и вторая часть биспецифического антитела распознает антиген на поверхности иммунной эффекторной клетки человека, антитело может рекрутировать активность этой

эффекторной клетки посредством специфического связывания с эффекторным антигеном на иммунной эффекторной клетке человека. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления биспецифические антитела могут образовывать связь между эффекторными клетками, например, Т-клетками и опухолевыми клетками, таким образом, повышая эффекторную функцию. В некоторых вариантах осуществления биспецифическое антитело по настоящему изобретению включает по меньшей мере первое связывание с CD371 и по меньшей мере второе связывание с иммунной клеткой.

Биспецифические молекулы по настоящему изобретению можно получать посредством конъюгации компонентов со специфичностями связывания с использованием известных в этой области способов. Например, каждый компонент со специфичностью связывания биспецифической молекулы можно получать отдельно, а затем конъюгировать их друг с другом. Если компоненты со специфичностями связывания являются белками или пептидами, для ковалентной конъюгации можно использовать различные связывающие или сшивающие средства. Неограничивающие примеры сшивающих средств включают протеин А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-нитробензойную кислоту) (DTNB), о-фениленедималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см. например, Karpovsky et al. (1984) *J. Exp. Med.* 160:1686; Liu, MA et al. (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:8648). Другие способы включают описанное в Paulus (1985) *Behring Ins. Mitt.* No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) *Science* 229:81-83) и Glennie et al. (1987) *J. Immunol.* 139: 2367-2375). Конъюгирующие средства могут представлять собой SATA и сульфо-SMCC, доступные в Pierce Chemical Co. (Rockford, IL).

Если компоненты со специфичностью связывания являются антителами, их можно конъюгировать с помощью сульфгидрильного связывания шарнирных областей на C-конце двух тяжелых цепей. В некоторых вариантах осуществления шарнирную область модифицируют так, чтобы она содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, предпочтительно - один, перед конъюгацией.

Альтернативно, оба компонента со специфичностью связывания могут кодироваться одним и тем же вектором и экспрессироваться и собираться в одной клетке-хозяине. Этот способ особенно подходит, если биспецифическая молекула представляет собой mAb×mAb, mAb×Fab, Fab×F(ab')₂ или лиганд×слитый белок Fab.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать посредством, например, твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), радиоиммунологического анализа (RIA), анализа FACS, биологического анализа (например, ингибирования роста) или анализа вестерн-блоттинга. С помощью каждого из этих анализов, как правило, определяют наличие особенно интересующих комплексов белок-антитело, используя меченый реагент (например, антитело), специфический для интересующего комплекса. Альтернативно, комплексы можно определять с использованием любого из различных других иммунологических анализов. Например,

антитело может являться радиоактивно меченым, и его можно использовать в радиоиммунологическом анализе (RIA) (см., например, Weintraub, B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, March, 1986, включенную в настоящее описание в качестве ссылки). Радиоактивный изотоп можно определять, например, с использованием счетчика γ -излучения или сцинтилляционного счетчик или посредством авторадиографии.

5.3.9. Селекция высокоаффинных ScFv против полипептида CD371

Следующей стадией является селекция фага, связывающегося с интересующим антигеном-мишенью (например, CD371) с высокой аффинностью связывания в библиотеке фагового дисплея (например, библиотеке фагового дисплея человека), несвязывающегося или связывающегося с более низкой аффинностью связывания. Это можно осуществлять посредством итерационного связывания фага с антигеном, связанным с твердой подложкой, например, бусами или клетками млекопитающих, с последующим удалением несвязанного фага и посредством элюции специфически связанного фага. В некоторых вариантах осуществления антигены (например, CD371) иммобилизованы на поверхности (например, полистироловой поверхности). Фаговую библиотеку инкубируют с клетками, бусами или другой твердой подложкой, и несвязавшегося фага удаляют посредством промывки. Связывающиеся клоны выбирают и тестируют.

После селекции положительные клоны scFv тестируют на связывание с CD371 (например, CD371 человека) на поверхности клетки посредством проточной цитометрии. В кратком изложении, фаговые клоны инкубируют с клетками HEK293H, гиперэкспрессирующими CD371. Клетки промывают, а затем инкубируют с mAb против белка оболочки M13. Клетки снова промывают и метят PE-меченым Fab₂ против мыши перед проточной цитометрией.

В других вариантах осуществления антитела против CD371 могут содержать одну или более замен аминокислот в каркасной области, предназначенных для улучшения стабильности белка, связывания антитела, уровней экспрессии или для встраивания участка для конъюгации терапевтических средств. Затем эти scFv используют для получения рекомбинантных моноклональных Ig человека способами, известными специалистам в этой области.

5.3.10. Конструирование полноразмерного mAb с использованием выбранных ScFv-фрагментов

Технология фагового дисплея делает возможной быструю селекцию и продукцию антиген-специфических scFv- и Fab-фрагментов, которые можно использовать сами по себе или которые далее можно разрабатывать для получения полных антител, антигенсвязывающих белков или их антигенсвязывающих фрагментов. Полные mAb с Fc-доменами имеют ряд преимуществ по сравнению с антителами scFv и Fab. Во-первых, только полноразмерные Ab выполняют иммунологическую функцию, такую как CDC и ADCC, опосредованные Fc-доменом. Во-вторых, бивалентные mAb придают более

сильную аффинность связывания с антигеном, чем мономерные Fab Ab. В-третьих, период полувыведения из плазмы и почечный клиренс будут отличаться в случае Fab и бивалентного mAb. Конкретные признаки и преимущества каждого из них можно адаптировать к планируемой эффекторной стратегии. В-четвертых, бивалентное mAb может интернализироваться с иной скоростью, чем scFv и Fab, изменяя иммунную функцию или функцию носителя. Альфаизлучателям, например, не требуется интернализация для уничтожения мишени, но многие лекарственные средства и токсины будут получать пользу от интернализации иммунного комплекса. Таким образом, в некоторых вариантах осуществления после получения клонов scFv, специфических для CD371, из библиотек фагового дисплея, получали полноразмерные IgG mAb с использованием scFv-фрагментов.

Для получения рекомбинантного моноклонального IgG человека в клетках яичника китайского хомяка (CHO) полноразмерные mAb IgG можно конструировать способом, известным специалистам в этой области (Tomomatsu et al., Production of human monoclonal antibodies against FcεRIα by method combining in vitro immunization with phage display. Biosci Biotechnol Biochem 73(7): 1465-1469 2009). В кратком изложении, вариабельные области антител можно субклонировать в экспрессирующие векторы млекопитающих с совпадающими последовательностями константной области легкой цепи лямбда или каппа и подклассом Fc IgG1 (например) (Lidija P, et al. An integrated vector system for eucaryotic expression of antibodies or their fragments after selection from phage display libraries. Gene 1997; 187(1): 9-18; Lisa JH, et al. Crystallographic structure of an intact IgG1 monoclonal antibody. Journal of Molecular biology 1998; 275 (5): 861-872). Для подтверждения специфического связывания полноразмерных IgG с CD371 с K_d в наномолярном диапазоне можно использовать кинетический анализ связывания (Yasmina NA, et al. Probing the binding mechanism and affinity of tanezumab, a recombinant гуманизированн anti-NGF monoclonal antibody, using a repertoire of biosensors. Protein Science 2008; 17(8): 1326-1335).

5.4. Нуклеиновые кислоты, кодирующие антитела или антигенсвязывающий фрагменты

Настоящее изобретение относится к нуклеиновым кислотам, кодирующим антитела против CD371 или их антигенсвязывающие фрагменты, представленные в настоящем описании. В некоторых вариантах осуществления нуклеиновая кислота содержит или состоит из нуклеотидной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26 или SEQ ID NO: 27.

Кроме того, настоящее изобретение относится к векторам, содержащим нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления вектор является экспрессирующим вектором. Настоящее изобретение относится к клеткам-хозяевам, содержащим экспрессирующие векторы, представленные в настоящем описании.

5.5. Фармацевтические композиции и способы лечения

Настоящее изобретение относится к композициям, содержащим антитело против CD371 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, иммуноконъюгат по настоящему изобретению, биспецифическое антитело по настоящему изобретению. В некоторых вариантах осуществления композиция является фармацевтической композицией, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

Настоящее изобретение относится к различным способам применения антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, иммуноконъюгата, биспецифического антитела и композиции, представленной в настоящем описании. Например, настоящее изобретение относится к способам снижения опухолевой нагрузки у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму одного или более из антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, иммуноконъюгата, биспецифического антитела или композиции, представленной в настоящем описании. Антитела против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты могут снижать количество опухолевых клеток, снижать размер опухоли и/или приводить к эрадикации опухоли у индивидуума.

Настоящее изобретение также относится к способам повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму одного или более из антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, иммуноконъюгата, биспецифического антитела или композиции, представленной в настоящем описании. Способ может снижать или приводить к эрадикации опухолевой нагрузки у индивидуума.

Настоящее изобретение дополнительно относится к способам лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии у индивидуума. В некоторых вариантах осуществления способ включает введение индивидууму одного или более из антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, иммуноконъюгата, биспецифического антитела или композиции, представленной в настоящем описании.

Такие способы включают введение антител против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающих фрагментов в эффективном количестве, композиции по настоящему изобретению (например, фармацевтической композиции) для достижения желаемого эффекта, временного облегчения существующего состояния или профилактики рецидивирования. В случае лечения вводимое количество является количеством, эффективным в достижении желаемого эффекта. Эффективное количество можно предоставлять за одно введение или в серии введений. Эффективное количество можно предоставлять в болюсе или посредством непрерывной перфузии.

Неограничивающие примеры неоплазий или опухолей включают острый миелолейкоз (AML), множественную миелому, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), лимфому (лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому), глиобластому,

миелодиспластический синдром (MDS) и хронический миелогенный лейкоз (CML), злокачественное новообразование костей, рак кишечника, рак печени, рак кожи, рак головы или шеи, меланому (кожную или интраокулярную злокачественную меланому), рак почки (например, прозрачно-клеточную карциному), рак горла, рак предстательной железы (например, гормонально-рефрактерную аденокарциному предстательной железы), гемобластозы (например, лейкозы, лимфомы и миеломы), рак матки, рак прямой кишки, рак анального канала, рак мочевого пузыря, злокачественное новообразование головного мозга, рак желудка, рак яичка, карциному фаллопиевых труб, карциному эндометрия, карциному шейки матки, карциному влагалища, карциному вульвы, лейкозы (например, острый лейкоз, острый лимфоцитарный лейкоз, острый миелоцитарный лейкоз, острый миелобластный лейкоз, острый промиелоцитарный лейкоз, острый моноцитарный лейкоз, острый эритролейкоз, хронический лейкоз, хронический миелоцитарный лейкоз, истинную полицитемию, рак тонкого кишечника, рак эндокринной системы, рак щитовидной железы, рак паращитовидной железы, рак надпочечника, саркому мягких тканей, рак уретры, рак полового члена, солидные опухоли детского возраста, лимфоцитарную лимфому, рак мочевого пузыря, рак почки или мочеточника, карциному почечной лоханки, неоплазию центральной нервной системы (ЦНС), первичную лимфому ЦНС, ангиогенез опухоли, опухоль спинного мозга, глиому ствола мозга, аденому гипофиза, саркому Капоши, эпидермоидный рак, плоскоклеточный рак, Т-клеточную лимфому, индуцируемые факторами окружающей среды злокачественные новообразования, включая новообразования, индуцируемые асбестом, включая макроглобулинемию Вальденстрема, болезнь тяжелых цепей и солидные опухоли, такие как саркомы и карциномы (например, фибросаркому, миксосаркому, липосаркому, хондросаркому, остеогенную саркому, хордому, ангиосаркому, эндотелиосаркому, лимфангиосаркому, лимфангиоэндотелиосаркому, синовиому, мезотелиому, опухоль Юинга, лейомиосаркому, рабдомиосаркому, плоскоклеточную карциному, базально-клеточную карциному, аденокарциному, карциному потовых желез, карциному сальных желез, папиллярную карциному, папиллярные аденокарциномы, цистаденокарциному, медуллярную карциному, бронхогенную карциному, гепатому, карциному желчных протоков, хориокарциному, семиному, эмбриональную карциному, опухоль Вильмса, рак шейки матки, рак слюнных желез, рак матки, рак яичка, карциному мочевого пузыря, эпителиальную карциному, глиому, астроцитому, медуллобластому, краниофарингиому, эпендимому, пинеалому, гемангиобластому, невриному слухового нерва, олигодендроглиому, шванному, менингиому, меланому, нейробластому и ретинобластому.

Неограничивающие примеры подходящих опухолей или неоплазий включают острый миелолейкоз (AML), множественную миелому, неходжкинскую лимфому, лимфому Ходжкина, хронический лимфоцитарный лейкоз (CLL), глиобластому, миелодиспластический синдром (MDS) и хронический миелогенный лейкоз (CML). В некоторых вариантах осуществления опухоль или неоплазия является AML.

Для введения антитела против CD371 по настоящему изобретению и, необязательно, для совместного введения антинеопластических средств можно использовать любой подходящий способ или путь. Пути введения включают, в качестве неограничивающих примеров, пероральное, внутривенное, интраперитонеальное, подкожное, внутримышечное, внутриузловое, внутриопухолевое, внутрикостное, интратекальное, плевральное, интраплевральное и прямое введение. Однако следует понимать, что настоящее изобретение не ограничено любым конкретным способом или путем введения.

Антитела против CD371 по настоящему изобретению или их антигенсвязывающие фрагменты можно вводить в виде конъюгата, специфически связывающегося с рецептором и доставляющим токсическую, летальную нагрузку после интернализации лиганда-токсина.

Антитела против CD371 или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению можно вводить в форме композиции, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель. Подходящие фармацевтически приемлемые носители включают, например, один или более из воды, физиологического раствора, фосфатно-солевого буфера, декстрозы, глицерина, этанола и т.п., а также их комбинаций. Фармацевтически приемлемые носители могут дополнительно содержать незначительные количества вспомогательных веществ, таких как увлажнители или эмульгаторы, консерванты или буферы, повышающие срок годности или эффективность связывающих белков. Как известно в этой области, композиции для инъекций можно составлять так, чтобы обеспечивать быстрое, замедленное или отсроченное высвобождение активного ингредиента после введения млекопитающему.

Настоящее изобретение также относится к применению антител и нуклеиновых кислот, кодирующих их, для лечения опухоли или неоплазии (например, AML), для диагностики и прогнозирования, а также применению в качестве исследовательских инструментов для детекции CD371 в клетках и тканях. Фармацевтические композиции, содержащие описываемые антитела и нуклеиновые кислоты, включены в настоящее изобретение. Векторы, содержащие нуклеиновые кислоты по настоящему изобретению, для лечения на основе антител посредством направленной иммунотерапии также включены в настоящее изобретение. Векторы включают экспрессирующие векторы, делающие возможной экспрессию и секрецию антител, а также векторы, направленные на экспрессию на поверхности клетки антигенсвязывающих белков, таких как химерные антигенные рецепторы.

Клетки, содержащие нуклеиновые кислоты, например, клетки, трансфицированные с использованием векторов по изобретению, также включены в настоящее изобретение.

5.6. Наборы

Настоящее изобретение относится к наборам для лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии (например, AML), для снижения опухолевой нагрузки и/или для повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или

неоплазию (например, AML). В некоторых вариантах осуществления набор содержит композицию, содержащую антитела против CD371 или их антигенсвязывающие фрагменты, иммуноконъюгат, биспецифическое антитело или композицию, представленную в настоящем описании, в стандартной лекарственной форме. В некоторых вариантах осуществления набор содержит стерильный контейнер, содержащий терапевтическую или профилактическую вакцину; такие контейнеры могут являться коробками, ампулами, бутылками, флаконами, пробирками, мешками, пакетами, блистерами или другими подходящими контейнерами, известными в этой области. Такие контейнеры можно получать из пластика, стекла, ламинированной бумаги, металлической фольги или других материалов, подходящих для содержания лекарственных средств.

В некоторых вариантах осуществления набор дополнительно содержит инструкции по введению индивидууму антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, иммуноконъюгата, биспецифического антитела или композиции, представленной в настоящем описании. Как правило, инструкции могут включать информацию об использовании антител против CD371 или их антигенсвязывающих фрагментов, иммуноконъюгата, биспецифического антитела и композиции, представленной в настоящем описании, для лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии (например, AML), для снижения опухолевой нагрузки и/или для повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию (например, AML). В некоторых вариантах осуществления инструкции включают по меньшей мере одно из следующего: описание терапевтического средства; режим дозирования и введение для лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии (например, AML) или ее симптомов; предостережения; предупреждения; показания; противопоказания; информацию о передозировке; побочных реакциях; ветеринарной фармакологии; клинических исследованиях и/или ссылки. Инструкции могут быть напечатаны непосредственно на контейнере (при его наличии), или в виде ярлыка, прикрепленного к контейнеру, или в виде отдельного листа, публикации, карточки или брошюры, предоставляемых в контейнере или вместе с ним.

5.7. Способы детекции

Настоящее изобретение относится к способам детекции CD371 в целой клетке или ткани. В некоторых вариантах осуществления способ включает:

- a) приведение клетки или ткани в контакт с антителом против CD371 или антигенсвязывающим фрагментом, представленным в настоящем описании, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит детектируемую метку; и
- b) определение количества меченого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с клеткой или тканью.

В некоторых вариантах осуществления b) включает измерение количества детектируемой метки, ассоциированной с клеткой или тканью, где количество связанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента свидетельствует о количестве CD371 в клетке или ткани.

Клетка или ткань может являться любой клеткой или тканью, включая любые нормальные, здоровые или злокачественные клетки и ткани.

6. ПРИМЕРЫ

Следующие примеры приведены для обеспечения специалистов в этой области полным раскрытием и описанием того, как получать и применять антитела, биспецифические антитела, композиции, содержащие их, скрининга и терапевтических способов по настоящему изобретению, и не предназначены для ограничения объема того, что авторы считают своим изобретением. Следует понимать, что на практике можно осуществлять различные другие варианты осуществления, учитывая представленное выше общее описание.

Пример 1 - Получение антител против CD371 и scFv

Часть CD371 (регистрационный номер в UniProt Q5QGZ9), соответствующую внеклеточному домену и аминокислотам His 65-Ala 265, рекомбинантно получали как растворимый белок с полигистидиновой меткой для очистки. Внеклеточный домен CD371 мыши (Thr 67-Arg 267) также получали с полигистидиновой меткой для скрининга антител на межвидовую реактивность.

Запатентованную библиотеку фагового дисплея наивных, полусинтетических scFv подвергали скринингу на антитела, связывающиеся с белком CD371, с использованием стандартных способов твердофазного пэннинга фагового дисплея. В кратком изложении, рекомбинантный CD371 иммобилизовали на полистироловой поверхности с последующим блокированием приблизительно 5% молоком и инкубацией с фаговой библиотекой. Последующие стадии промывки, элюции и амплификации фага осуществляли для завершения каждого раунда биопэннинга. Три раунда пэннинга завершали с использованием амплифицированных, обогащенных CD371-связывающим средством совокупностей фагов из предыдущего раунда пэннинга в качестве исходного материала для последующих раундов. Для идентификации клонов, демонстрирующих высокую специфичность к CD371, отдельные клоны из третьего раунда пэннинга анализировали на связывание с CD371 человека, CD371 мыши и BSA (в качестве неспецифического контроля) посредством твердофазного иммуоферментного анализа (ELISA) с использованием антитела против фага M13. Только супернатанты моноклональных фагов, демонстрирующие CD371-специфическое связывание, выбирали для секвенирования антител, приводящего к идентификации шести антител с уникальными последовательностями (B10 (также обозначаемого как "1B10"), C3 (также обозначаемого как "1C3"), D6 (также обозначаемого как "1D6"), A11 (также обозначаемого как "2A11"), E4 (также обозначаемого как "2E4") и E8 (также обозначаемого как "2E8")). Ни одно из подвергнутых скринингу антител не демонстрировало связывание с человеческими и мышинными гомологами CD371.

Для тестирования того, могут ли антитела, выделенные в экспериментах по пэннингу фагов, связываться с CD371 в своей нативной конформации на поверхности клетки, препараты моноклональных фагов также подвергали скринингу посредством

проточной цитометрии на клетках HEK293H, трансфицированных с использованием CD371, и клетках HEK293H дикого типа. На фигуре 1 показан профиль связывания антител 1B10, 1C3, 1D6, 2A11, 2E4 и 2E8.

Пример 2: Связывание антитела с CD371-экспрессирующими линиями клеток

Учитывая предварительную функциональную характеристику *in vitro*, два mAb (1B10 и 1C3) переформатировали в IgG1 человека и тестировали на связывание с клетками OCI, CD371⁺ линией клеток AML. Оба mAb демонстрировали дозозависимое связывание, как показано на фигурах 2А и 2В. B10 дополнительно конструировали в нескольких форматах, включая слитые белки scFv-Fc с вариabельными доменами в обеих ориентациях (V_H-V_L или V_L-V_H). Эти слитые конструкции scFv-Fc демонстрировали специфическое связывание с CD371⁺ клетками (см. фигуру 3). Аналогично, связывание с клетками определяли для scFv B10 в ориентации V_L-V_H. Однако связывания scFv B10 в ориентации V_H-V_L не наблюдали при проточной цитометрии, что позволяет предположить более низкую аффинность и, таким образом, необходимость для бивалентного связывания.

Пример 3: Связывание антитела с рекомбинантным CD371 в растворе

Измерения аффинности вариантов B10 осуществляли посредством интерферометрии биослоя с помощью захвата IgG и Fc-слитых белков антителом против Fc и с использованием растворимого CD371 в качестве аналита. Для измерений аффинности scFv биотинилированный CD371 захватывали с помощью стрептавидина и в качестве аналита использовали растворимый scFv. В таблице 8 показаны константы диссоциации (K_D), скорости прямых реакций (k_{on}) и скорости обратных реакций (k_{off}) для различных форматов антител. В соответствии с результатами проточной цитометрии полные IgG и слитые белки scFv-Fc связывались сильнее, чем scFv (таблица 8), возможно, из-за их бивалентных взаимодействий, приводящих к эффекту avidности. Наблюдали слабое связывание scFv 1B10 в ориентации V_H-V_L, но константу диссоциации нельзя было вычислить каким-либо способом построения прямой.

Таблица 8. Аффинность связывания антитела B10 в различных форматах с растворимым CD371

Формат	K _D (нМ)	K _{on} (1/Мс)	K _{off} (1/с)
IgG1	9,5	1,60×10 ⁵	1,53×10 ⁻³
V _L -V _H -Fc	7,0	2,95×10 ⁵	2,06×10 ⁻³
V _H -V _L -Fc	4,2	2,32×10 ⁵	9,68×10 ⁻⁴
V _L -V _H scFv	16	5,99×10 ⁵	9,52×10 ⁻³
V _H -V _L scFv	Слабое связывание	NA	NA

Варианты осуществления настоящего изобретения

Из представленного выше описания очевидно, что можно осуществлять изменения и модификации настоящего изобретения для его адаптации к различному применению и условиям. Такие варианты осуществления также входят в объем следующей формулы изобретения.

Перечисление списка элементов в любом определении переменной в настоящем описании включает определения этой переменной как любого отдельного элемента или комбинации (или подкомбинации) указанных элементов. Перечисление вариантов осуществления в настоящем описании включает этот вариант осуществления в качестве любого отдельного варианта осуществления или в комбинации с любыми другими вариантами осуществления или их частями.

Все патенты и публикации, упомянутые в описании, включены в настоящее описание в качестве ссылки в той же степени, как если бы каждый независимый патент и публикация были конкретно и отдельно указаны как включенные в качестве ссылки.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

2. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

3. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и

(b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, являющуюся по меньшей мере на приблизительно 80%, по меньшей мере на приблизительно 85%, по меньшей мере на приблизительно 90%, по меньшей мере на приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

4. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи выбраны из группы, состоящей из:

приблизительно 95%, по меньшей мере на приблизительно 96%, по меньшей мере на приблизительно 97%, по меньшей мере на приблизительно 98%, по меньшей мере на приблизительно 99%, по меньшей мере на приблизительно 100% гомологичной или идентичной аминокислотной последовательности, приведенной в SEQ ID NO: 12.

5. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11.

6. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

7. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9 или SEQ ID NO: 11; и

(b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 или SEQ ID NO: 12.

8. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-7, содержащее:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 2;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 6;

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 8;

(e) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 9, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 10; и

(f) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 11, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 12.

9. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3; и вариабельную область легкой цепи, содержащую домены CDR1, CDR2 и CDR3, где домены CDR3 вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи выбраны из:

(а) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30, и ее консервативную модификацию; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 33, и ее консервативную модификацию;

(b) CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36, и ее консервативную модификацию; и CDR3 переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 39, и ее консервативную модификацию;

(с) CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42, и ее консервативную модификацию; и CDR3 переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 45, и ее консервативную модификацию;

(d) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48, и ее консервативную модификацию; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 51, и ее консервативную модификацию;

(е) CDR3 переменной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, и ее консервативную модификацию; и CDR3 переменной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 57, и ее консервативную модификацию;

(f) CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60 и ее консервативную модификацию; и CDR3 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63 и ее консервативную модификацию.

10. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.9, где домены CDR2 варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи выбраны из:

(а) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 32, и ее консервативную модификацию;

(b) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35, и ее консервативную модификацию; и CDR2 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 38, и ее консервативную модификацию;

(с) CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную

(f) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58, и ее консервативную модификацию; и CDR1 варибельной области легкой цепи, содержащей аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61, и ее консервативную модификацию.

12. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.9-11, где одна или более из последовательностей CDR имеет до приблизительно 5 замен аминокислот.

13. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 9-11, где одна или более из последовательностей CDR имеет до приблизительно 3 замен аминокислот.

14. Антитело против CD371 или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее:

(a) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 28; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 29; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 30;

(b) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 34; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 35; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 36;

(c) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 40; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 41; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 42;

(d) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 46; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 47; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 48;

(e) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 52; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 53; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 54, или

(f) CDR1 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; CDR2 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; и CDR3 варибельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную

последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 58; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 59; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 60; CDR1 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 61; CDR2 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 62; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 63.

17. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371, содержащим аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 15, или ее фрагмент.

18. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, перекрестно конкурирующее за связывание с CD371 с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-17.

19. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, связывающееся с тем же эпитопом на CD371, что и антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-17.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-19, где последовательность антитела находится в ориентации вариабельной области легкой-тяжелой цепи (V_L - V_H).

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-20, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент связывается с CD371 человека с константой диссоциации (K_D) от приблизительно 1×10^{-7} М до приблизительно 1×10^{-8} М или от приблизительно 1×10^{-9} М до приблизительно 1×10^{-8} М.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 21.

23. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-22, где антитело содержит каркасную область вариабельной области человека.

24. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23, являющееся полностью человеческим антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

25. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-23, являющееся химерным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

26. Антитело или его антигенсвязывающая часть по любому из пп.1-23, являющееся гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

27. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-26, где антигенсвязывающий фрагмент антитела является Fab, Fab', F(ab')₂, вариабельным фрагментом (Fv) или одноцепочечной вариабельной областью (scFv).

28. Композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по

любому из пп.1-27.

29. Композиция по п. 28, являющаяся фармацевтической композицией, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

30. Иммуноконъюгат, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-27, связанное с терапевтическим средством.

31. Иммуноконъюгат по п.30, где указанное терапевтическое средство является лекарственным средством, цитотоксином или радиоактивным изотопом.

32. Композиция, содержащая иммуноконъюгат по п.30 или 31.

33. Композиция по п. 32, являющаяся фармацевтической композицией, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

34. Биспецифическая молекула, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-27, связанное со вторым функциональным остатком.

35. Биспецифическая молекула по п.34, где второй функциональный остаток имеет иную специфичность связывания, чем указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

36. Композиция, содержащая биспецифическую молекулу по п.34 или 35.

37. Композиция по п.36, являющаяся фармацевтической композицией, дополнительно содержащей фармацевтически приемлемый носитель.

38. Нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-27.

39. Экспрессирующий вектор, содержащий молекулу нуклеиновой кислоты по п.38.

40. Клетка-хозяин, содержащая экспрессирующий вектор по п.39.

41. Способ детекции CD371 в целой клетке или ткани, включающий:

приведение клетки или ткани в контакт с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп.1-27, где указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит детектируемую метку; и

определение количества меченого антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, связанного с указанной клеткой или тканью посредством измерения количества детектируемой метки, ассоциированной с указанной клеткой или тканью, где количество связанного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента свидетельствует о количестве CD371 в указанной клетке или ткани.

42. Способ снижения опухолевой нагрузки у индивидуума, включающий введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-27, иммуноконъюгата по п.30 или 31, биспецифической молекулы по п.34 или 35 или композиции по любому из пп.28, 29, 32, 33, 36 и 37.

43. Способ по п. 42, где способ снижает количество опухолевых клеток, снижает размер опухоли и/или приводит к эрадикации опухоли у индивидуума.

44. Способ лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии у индивидуума,

включающий введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-27, иммуноконъюгата по п.30 или 31, биспецифической молекулы по п.34 или 35 или композиции по любому из пп.28, 29, 32, 33, 36 и 37.

45. Способ получения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию, включающий введение индивидууму антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп.1-27, иммуноконъюгата по п.30 или 31, биспецифической молекулы по п.34 или 35 или композиции по любому из пп.28, 29, 32, 33, 36 и 37.

46. Способ по п. 45, где способ может снижать или приводить к эрадикации опухолевой нагрузки у индивидуума.

47. Способ по любому из пп.42-46, где опухоль или неоплазия выбрана из острого миелолейкоза (AML), множественной миеломы, неходжкинской лимфомы, лимфомы Ходжкина, хронического лимфоцитарного лейкоза (CLL), глиобластомы, миелодиспластического синдрома (MDS) и хронического миелогенного лейкоза (CML).

48. Способ по любому из пп.42-47, где опухоль или неоплазия является AML.

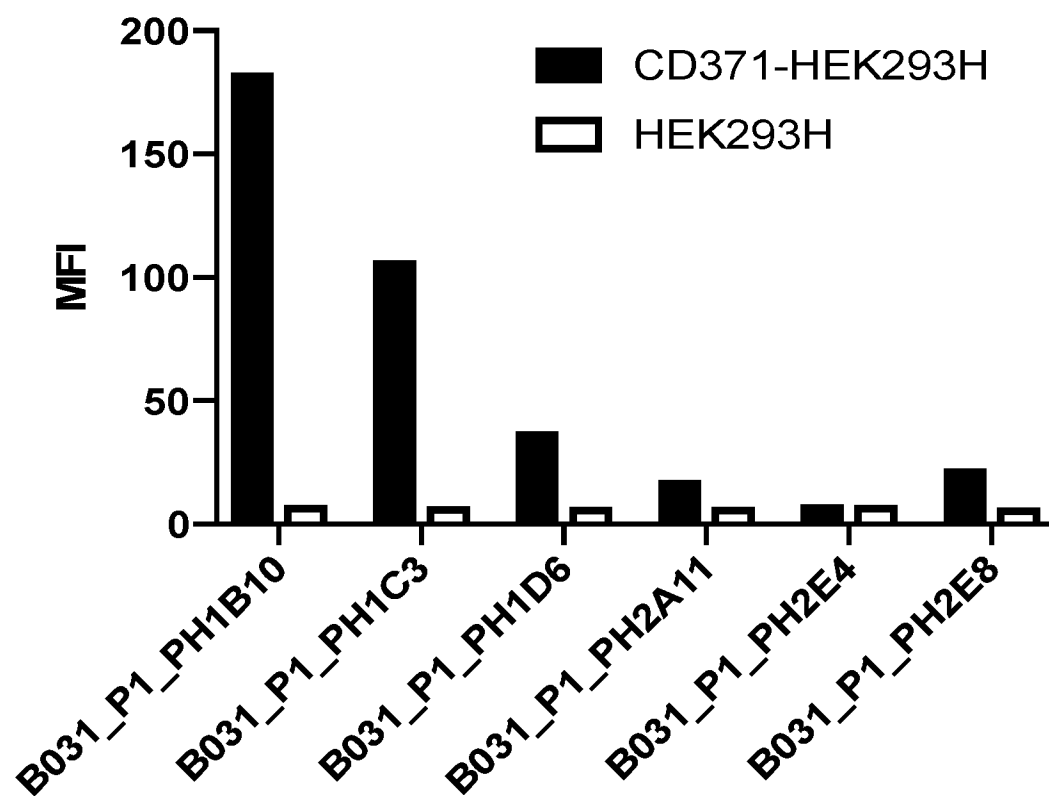
49. Способ по любому из пп. 42-48, где индивидуум является человеком.

50. Набор для снижения опухолевой нагрузки у индивидуума, лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии у индивидуума и/или повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-27.

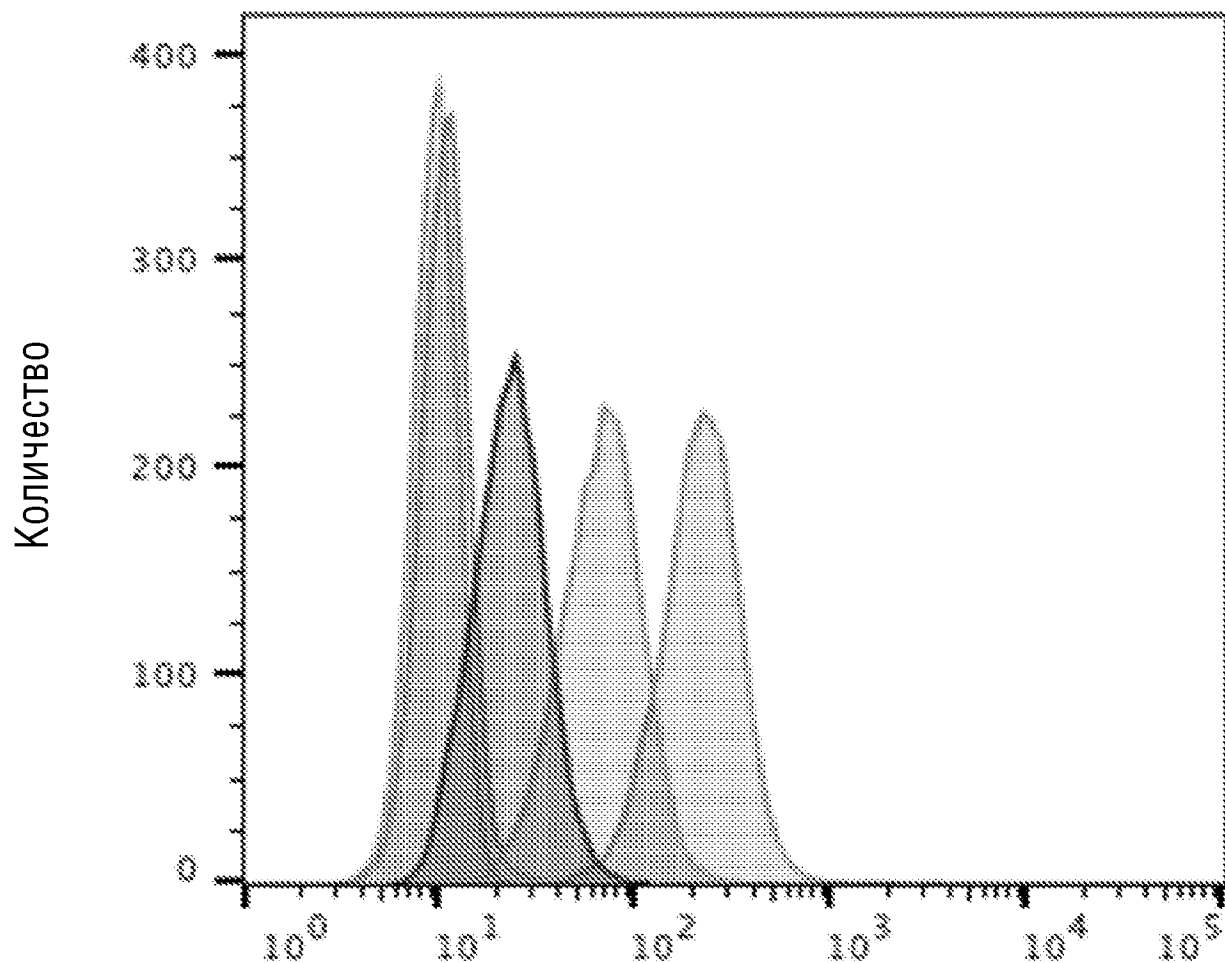
51. Набор по п.50, где набор дополнительно содержит письменные инструкции по использованию антитела или его антигенсвязывающего фрагмента для лечения и/или профилактики опухоли или неоплазии у индивидуума и/или повышения или пролонгирования выживаемости индивидуума, имеющего опухоль или неоплазию.

По доверенности

ФИГ.1



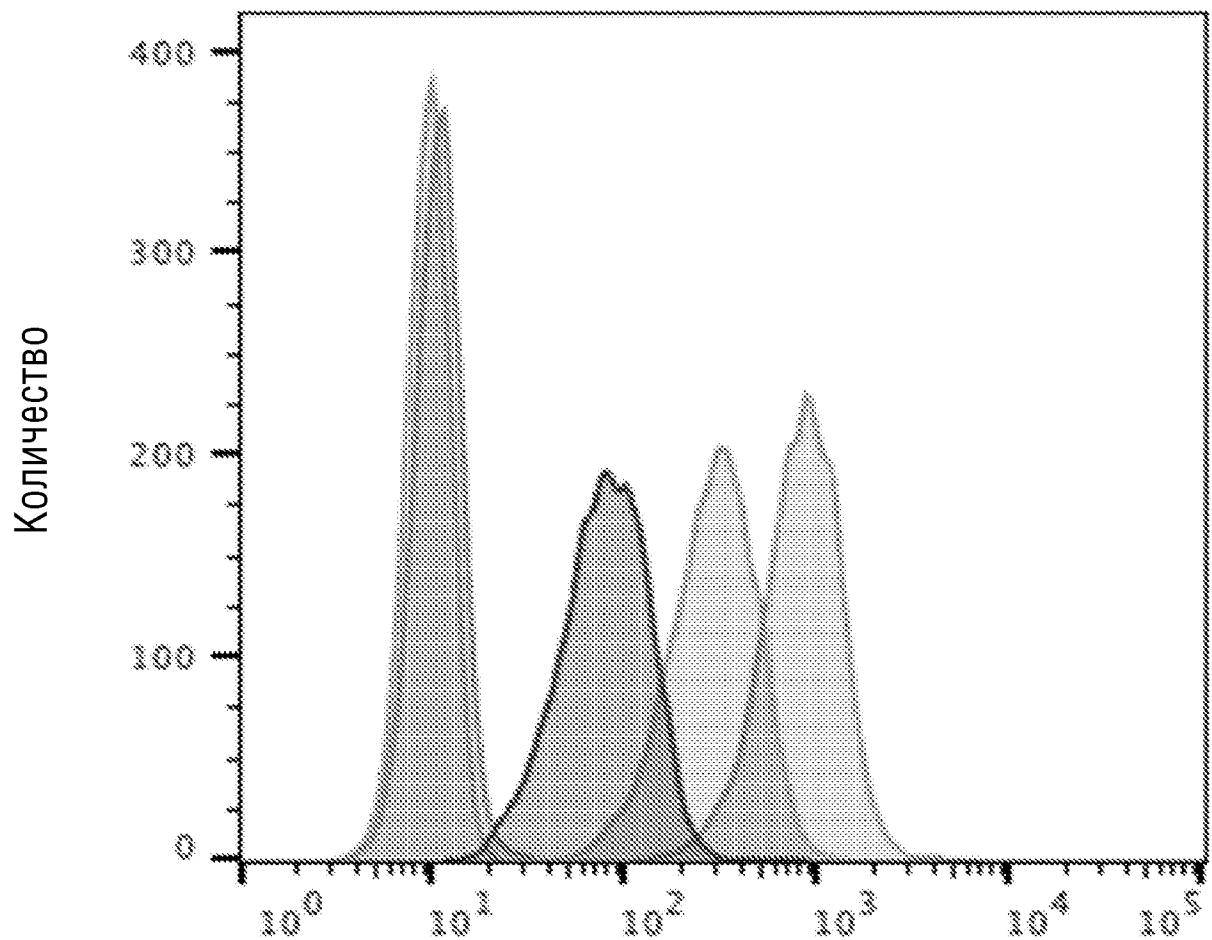
ФИГ.2А



RED-R-HLin :: Флуоресценция Red-R (RED-R-HLin)

	Название подгруппы	Медиана: RED-R-HLin
■	1 B1 0 hulgG1, 2 мкг/мл	22.9
■	1 B1 0 hulgG1, 10 мкг/мл	67.8
■	1 B1 0 hulgG1, 50 мкг/мл	216
■	Только 2' (против человека)	10.7
■	OCl-блокирующее huFc, отсутствие окрашивания	9.47

ФИГ.2В

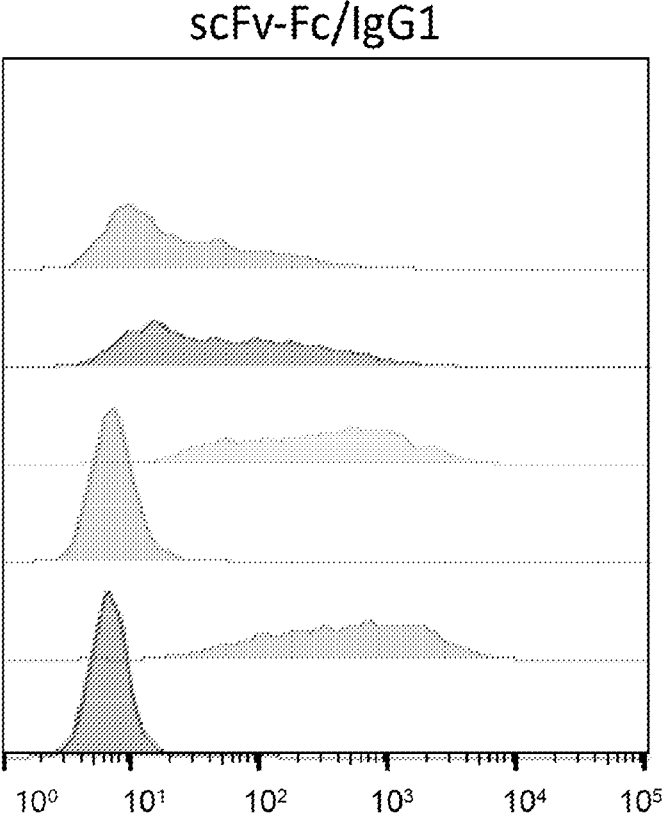
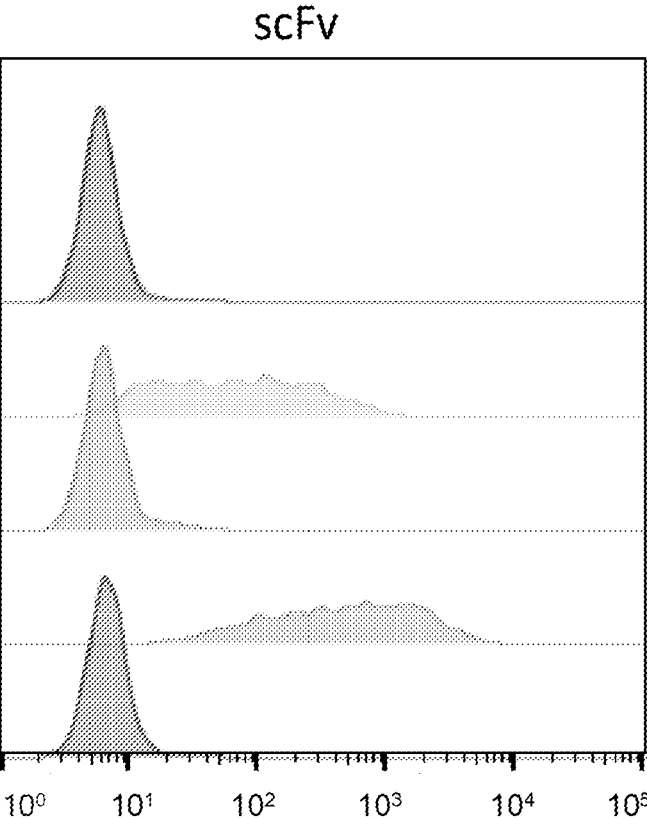


RED-R-HLin :: Флуоресценция Red-R (RED-R-HLin)

	Название подгруппы	Медиана: RED-R-HLin
■	1 B1 0 huIgG1, 2 мкг/мл	78.7
■	1 B1 0 huIgG1, 10 мкг/мл	290
■	1 B1 0 huIgG1, 50 мкг/мл	827
■	Только 2' (против человека)	10.7
■	OCl-блокирующее huFc, отсутствие окрашивания	9.47

ФИГ.3

HEK293-CD371



YEL-B-HLin :: Флуоресценция Yellow-B (YEL-B-HLIN)

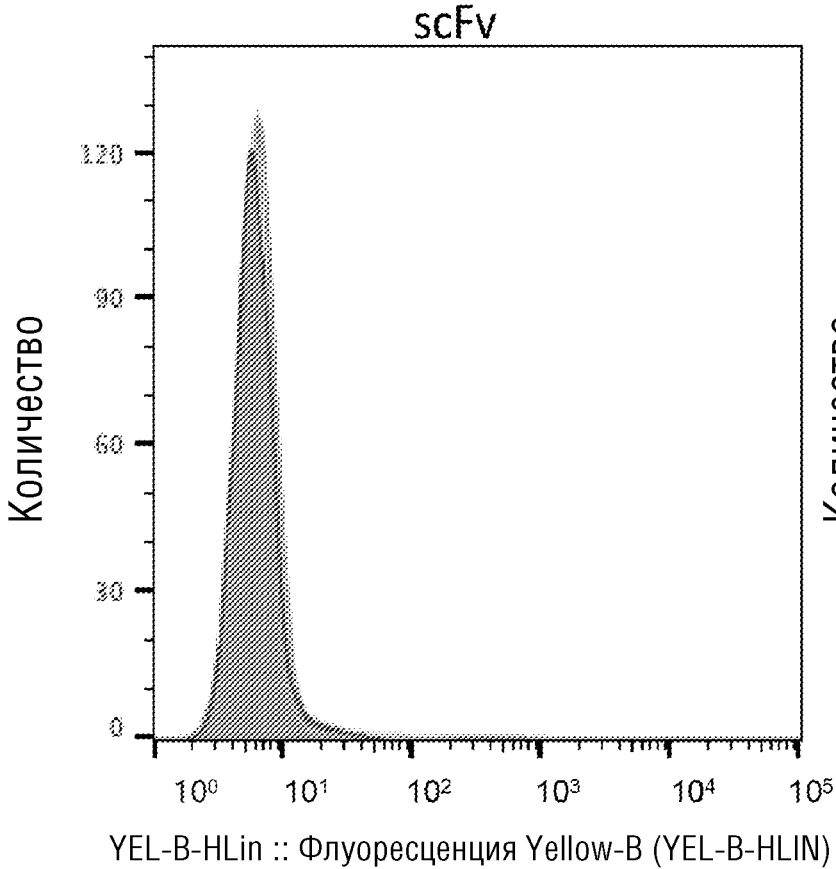
	Название подгруппы	Медиана: YEL-B-HLin
	1B10 Scfv VH_VL	5.94
	1B10 Scfv VL_VH	66.1
	Ат против гистидин. метки	6.34
	Антитело против hCD371	474
	Антитело против мыши	6.69

YEL-B-HLin :: Флуоресценция Yellow-B (YEL-B-HLIN)

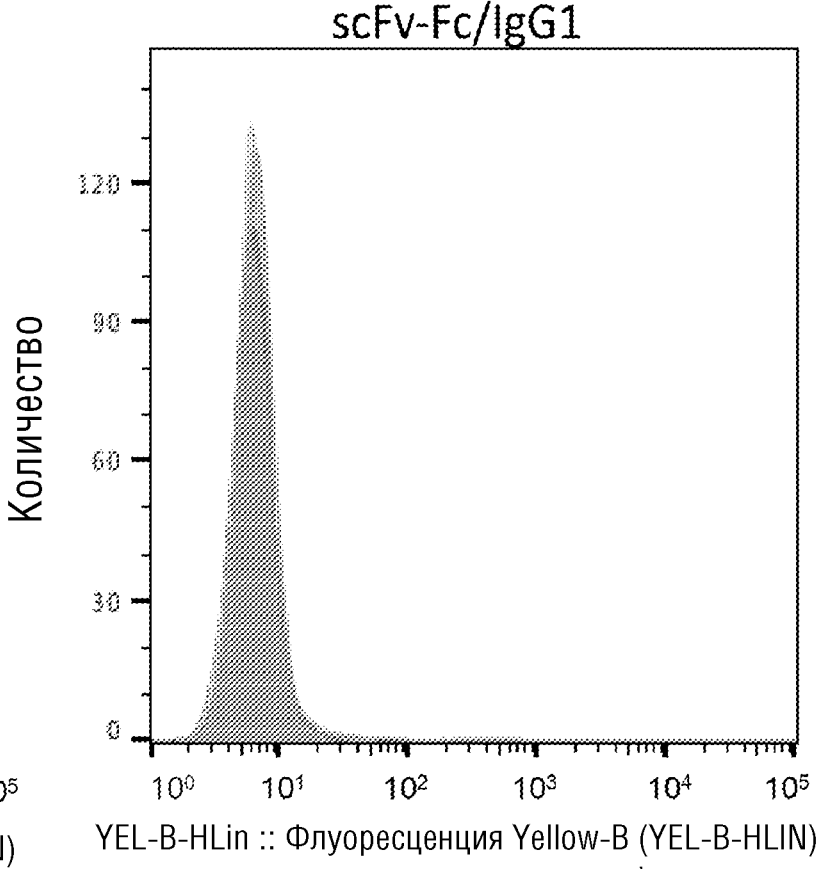
	Название подгруппы	Медиана: YEL-B-HLin
	1B10 hIgG1	16.3
	1B10 hFc-Scfv VL_VH	43.3
	1B10 hFc-Scfv VH_VL	303
	Ат против гистидин. метки	7.11
	Антитело против hCD371	474
	Антитело против мыши	6.69

ФИГ.3 (продолжение)

HEK293 WT



	Название подгруппы	Медиана: YEL-B-HLin
	1B10 Scfv VH_VL	5.89
	1B10 Scfv VL_VH	5.84
	Ат против гистидин. метки	6.11
	Антитело против hCD371	6.29
	Антитело против мыши	6.36



	Название подгруппы	Медиана: YEL-B-HLin
	1B10 hIgG1	6.52
	1B10 hFc-Scfv VL_VH	6.32
	1B10 hFc-Scfv VH_VL	6.13
	Ат против гистидин. метки	6.30
	Антитело против hCD371	6.29
	Антитело против мыши	6.36