

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202291809 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2022.11.11

(22) Дата подачи заявки
2021.01.15

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
C12N 5/20 (2006.01)
C12R 1/91 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01)

(54) АНТИТЕЛА К НКР30 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

(31) PCT/CN2020/072733

(32) 2020.01.17

(33) CN

(86) PCT/CN2021/072191

(87) WO 2021/143858 2021.07.22

(71) Заявитель:
БЕЙДЖИН, ЛТД. (КУ)

(72) Изобретатель:
Сюэ Лю, Чжан Тун (CN)

(74) Представитель:
Харин А.В., Буре Н.Н., Стойко Г.В.,
Галухина Д.В. (RU)

(57) Изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с НКр30 (запускающий естественную цитотоксичность рецептор 3) человека, мультиспецифическим антителам, которые распознают НКр30 как один антиген и по меньшей мере один другой антиген, фармацевтическая композиция, содержащая антитела к НКр30, и применению антитела, полиспецифического антитела или композиции для лечения заболевания, такого как рак.

A1

202291809

202291809

A1

АНТИТЕЛА К НКР30 И СПОСОБЫ ПРИМЕНЕНИЯ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[001] В настоящем документе раскрыты антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые связываются с НКр30 (запускающий естественную цитотоксичность рецептор 3) человека, композиция, содержащая указанное антитело, а также способы применения для лечения рака.

ПРЕДШЕСТВУЮЩИЙ УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[002] Естественные клетки-киллеры (НК) относятся к врожденной иммунной системе, служа в качестве первой линии защиты от вирусных инфекций и опухолей (Biron и др., 1999 *Annu Rev Immunol.* 117:189-220). НК-клетки не имеют Т-клеточного рецептора (TCR) на поверхности клетки и могут распознавать и устранять клетки-мишени без предварительной сенсibilизации. Функциональная активность (включая продукцию цитокинов и цитотоксичность) НК-клеток регулируется сложными механизмами, которые включают как активирующие, так и ингибирующие сигналы (Pegram и др., 2011 *Immunol Cell Biol.* 89(2):216-224).

[003] НКр30 представляет собой трансмембранный гликопротеин I типа 30 KD (килодальтон), который имеет внеклеточный V-подобный домен иммуноглобулина (Pende и др., 1999 *J Exp Med.* 190(10):1505-16). Гены и кДНК (комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота), кодирующие НКр30, были клонированы и охарактеризованы у человека и крысы (Pende и др., 1999 *supra*, Hsieh и др., 2006 *Eur J Immunol.* 36(8):2170-80). У мышей НКр30 является псевдогеном (Hollyoake и др., 2005 *Mol Biol Evol.* 22(8):1661-1672). Полноразмерный НКр30 человека имеет последовательность длиной в 201 аминокислоту (SEQ ID NO: 1), в которой первые 18 аминокислот представляют собой сигнальный пептид. Аминокислотная последовательность зрелого НКр30 человека содержит 183 аминокислотных (aa) остатка (регистрационный номер NCBI (Национальный центр биотехнологической информации): NM_147130.1). Внеклеточный домен (ECD) зрелого НКр30 человека состоит из 117 аминокислотных остатков (SEQ ID NO: 2, соответствующих аминокислотам 19-135 SEQ ID NO: 1), за которыми следует трансмембранная последовательность из 21 аминокислоты и цитоплазматический домен из 45 аминокислот. В пределах ECD, аминокислотная последовательность НКр30 человека на 67 и 95% идентична аминокислотной последовательности крыс и яванских макак, соответственно. В цитоплазматическом домене не обнаружено известных активирующих сигнальных мотивов, таких как

иммунорецепторный тирозиновый активирующий мотив (ITAM). Для передачи сигналов NKp30 ассоциируется с ITAM-несущими молекулами адаптера, такими как CD3 ζ /Fc ϵ RI γ (Koch и др., 2013 Trends Immunol. 2013 34(4):182-91). Взаимодействие NKp30 и CD3 ζ происходит через заряженный остаток в трансмембранном домене NKp30 (Augugliaro и др., 2003 Eur J Immunol. 33(5):1235-41).

[004] NKp30 преимущественно экспрессируется на NK-клетках и «врожденных» CD8⁺ Т-клетках (Pende и др., 1999 *supra*, Correia и др., 2018 Proc Natl Acad Sci U S A. 115(26)). Его экспрессия может быть повышена с помощью IL-2 (интерлейкин-2), IL-15 и IFN- α (интерферон- α); и понижена с помощью TGF- β (фактор β некроза опухоли) (Castriconi и др., 2003, Proc Natl Acad Sci U S A. 100(7):4120-4125; Bozzano и др., 2011 Eur J Immunol, 41, 2905-14). NKp30 распознает лиганды, предпочтительно экспрессируемые на опухолевых клетках. Нацеливание NKp30 путем введения химерных рецепторов NKp30 (например, NKp30, слитых с сигнальными доменами CD3 ζ и CD28) в Т-клетки продемонстрировало, что это индуцирует мощную противоопухолевую активность против опухолевых клеток, положительных по лиганду NKp30 (Zhang и др., 2012 J Immunol. 189(5):2290-9).

[005] Ввиду ключевой роли NKp30 в опосредованном NK-клетками иммунном надзоре и противоопухолевых эффектах, перенацеливание NK-клеток против опухолевых антигенэкспрессирующих опухолевых клеток в качестве монотерапии, или в качестве антигенсвязывающего домена мультиспецифического антитела, нацеленного на NKp30 и другой антиген.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[006] Настоящее изобретение относится к агонистическим антителам к NKp30 и их антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают NKp30.

[007] В одном варианте осуществления, настоящее описание предлагает моноклональные антитела, которые связываются с NKp30 человека или его антигенсвязывающими фрагментами.

[008] Настоящее изобретение охватывает следующие варианты осуществления изобретения.

[009] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое специфически связывает NKp30 человека.

[010] Антитело, связывающее NKp30 человека по меньшей мере по аминокислотам изолейцин 50 и лейцин 86 в SEQ ID NO:1.

[011] Антитело, снижающее взаимодействие NKp30 с лигандом B6H7.

[012] Антитело, обладающее активностью агониста NKp30.

[013] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи), представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:29; и переменную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи), представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:20; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8; или

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:3, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8.

[014] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:30, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 32;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:23; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:13;

[015] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот в SEQ ID NO:30, 32, 21, 23, 11 или 13 были вставлены, удалены или заменены.

[016] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO:30, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 32;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO:23; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 13.

[017] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент любого из перечисленных выше антител, которое представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, сконструированное антитело человека, одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент Fab (антигенсвязывающий фрагмент), фрагмент Fab' или фрагмент F(ab')₂.

[018] Антитело, представляющее собой мультиспецифическое антитело.

[019] Мультиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает человеческий NKp30, и по меньшей мере второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухоль-ассоциированный антиген (TAA) человека.

[020] Мультиспецифическое антитело, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи), представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:29; и переменную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи), представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:20; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8; или

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:3, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную

SEQ ID NO:5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную SEQ ID NO:8,

и по меньшей мере второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) человека.

[021] Мультиспецифическое антитело, представляющее собой биспецифическое антитело.

[022] Биспецифическое антитело, представляющее собой биспецифическое четырехвалентное антитело.

[023] Биспецифическое четырехвалентное антитело, содержащее VD1-CL-(X1)n-VD2-CH1-Fc или VD1-CH-(X1)n-VD2-CL-Fc, где VD1 представляет собой первый переменный домен антигенсвязывающего домена, VD2 представляет собой второй переменный домен антигенсвязывающего домена, Fc (кристаллизующийся фрагмент) представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, CH или CL представляет собой константный тяжелый или константный легкий домен, и (X1)n представляет собой линкер из по меньшей мере 2 аминокислот.

[024] Биспецифическое четырехвалентное антитело, где линкер представляет собой последовательность, представленную в SEQ ID NO:43-85.

[025] Биспецифическое четырехвалентное антитело, где линкер представляет собой SEQ ID NO:44.

[026] Биспецифическое четырехвалентное антитело где линкер представляет собой SEQ ID NO:50.

[027] Биспецифическое четырехвалентное антитело, где линкер представляет собой SEQ ID NO:55.

[028] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC).

[029] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, имеющие сниженное гликозилирование или не имеющие его, или являющиеся гипофукозилированными.

[030] Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент любого из перечисленных выше антител, содержащие повышенное количество структур бисектного GlcNac (N-ацетилглюкозамин).

[031] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 (иммуноглобулин G1).

[032] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4.

[033] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, где IgG4 имеет замену S228P (в соответствии с системой нумерации EU).

[034] Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

[035] Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся пациенту эффективного количества антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

[036] Способ, где рак представляет собой рак желудка, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому и саркому.

[037] Способ, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с другим терапевтическим агентом.

[038] Способ, где терапевтический агент представляет собой паклитаксел или агент на основе паклитаксела, доцетаксел, карбоплатин, топотекан, цисплатин, иринотекан, доксорубин, леналидомид или 5-азациитидин.

[039] Способ, где терапевтический агент представляет собой агент на основе паклитаксела, леналидомид или 5-азациитидин.

[040] Выделенная нуклеиновая кислота, которая кодирует антитело или антигенсвязывающий фрагмент.

[041] Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту.

[042] Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту или вектор.

[043] Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из культуры.

[044] Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

[045] Диагностический реагент, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего агента и иона металла.

[046] В одном варианте осуществления данного изобретения указанное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит одну или более определяющих комплементарность областей (CDR), содержащих аминокислотную последовательность,

выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7, SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO: 20 и SEQ ID NO: 29.

[047] В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержат: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR), содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:3, SEQ ID NO:4, SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20 и SEQ ID NO:29; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую одну или более определяющих комплементарность областей легкой цепи (LCDR), содержащих аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из SEQ ID NO:6, SEQ ID NO:7 и SEQ ID NO:8.

[048] В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющих комплементарность областей тяжелой цепи (HCDR), которые представляют собой HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3 или SEQ ID NO:19; HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4; и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5, SEQ ID NO: 20 или SEQ ID NO: 29, и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области легкой цепи (LCDR), которые представляют собой LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6; LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7; и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

[049] В другом варианте осуществления антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области тяжелой цепи (HCDR), которые представляют собой HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; или HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20; или HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую три определяющие комплементарность области легкой цепи

(LCDR), которые представляют собой LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

[050] В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:3, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:5; и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

[051] В одном варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:19, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:20; и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:8.

[052] В другом варианте осуществления антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению содержит: переменную область тяжелой цепи, содержащую HCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19, HCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:4, и HCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:29; и переменную область легкой цепи, содержащую LCDR1, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:6, LCDR2, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:7, и LCDR3, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8.

[053] В одном варианте осуществления антитело по данному изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (а) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:30, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID

NO:21 или SEQ ID NO:30; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:32, или аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную любой из SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:32.

[054] В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит: (a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO: 21 или SEQ ID NO:30, или аминокислотную последовательность с одной, двумя или тремя аминокислотными заменами в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:30; и/или (b) переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:32, или аминокислотную последовательность с одной, двумя, тремя, четырьмя или пятью аминокислотными заменами в аминокислотной последовательности SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:32. В другом варианте осуществления, аминокислотные замены представляют собой консервативные аминокислотные замены.

[055] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержит:

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10; или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:13; или

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 23;

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 30, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 32.

[056] В одном варианте осуществления, антитело по настоящему изобретению относится к изотипу IgG1, IgG2, IgG3 или IgG4. В более конкретном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен человеческого IgG1 дикого типа (также называемый человеческим IgG1wt (IgG1 дикого типа) или hIgG1

(IgG1 человека)) или IgG2. В другом варианте осуществления антитело по настоящему изобретению содержит Fc-домен IgG4 человека с заменами S228P и/или R409K (в соответствии с системой нумерации EU).

[057] В одном варианте осуществления антитело по настоящему изобретению связывается с NKp30 с аффинностью связывания (K_D) от 1×10^{-6} М до 1×10^{-10} М. В другом варианте осуществления изобретения антитело по настоящему изобретению связывается с NKp30 с аффинностью связывания (K_D) около 1×10^{-6} М, около 1×10^{-7} М, около 1×10^{-8} М, около 1×10^{-9} М или около 1×10^{-10} М.

[058] В другом варианте осуществления, антитело к NKp30 человека по настоящему изобретению демонстрирует межвидовую связывающую активность с NKp30 яванского макака.

[059] В одном варианте осуществления, антитела по настоящему изобретению обладают сильными Fc-опосредованными эффекторными функциями. Антитела опосредуют антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) против клеток-мишеней, экспрессирующих NKp30.

[060] Настоящее изобретение относится к выделенным нуклеиновым кислотам, содержащим нуклеотидные последовательности, кодирующие аминокислотную последовательность антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В одном варианте осуществления выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность VH SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:31 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:31, и кодирует область VH антитела или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению. Альтернативно или дополнительно выделенная нуклеиновая кислота содержит нуклеотидную последовательность VL SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:33 или нуклеотидную последовательность, по меньшей мере на 95%, 96%, 97%, 98% или 99% идентичную SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:33, и кодирует область VL антитела или антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению.

[061] В другом аспекте настоящее изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей антитело к NKp30 или его антигенсвязывающий фрагмент и необязательно фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[062] В еще одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения заболевания у субъекта, который включает введение нуждающемуся в этом субъекту антитела к NKp30 или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к NKp30 в терапевтически эффективном количестве. В

другом варианте осуществления, заболевание, подлежащее лечению с помощью антитела или антигенсвязывающего фрагмента, представляет собой рак.

[063] Настоящее изобретение относится к применению антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или фармацевтической композиции на основе антитела к NKp30 для лечения заболевания, такого как рак.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[064] Фиг. 1 представляет собой блок-схему NKp30-mIgG2a (вверху) и NKp30-huIgG1 (внизу). ECD (внеклеточный домен) NKp30: внеклеточный домен NKp30. N: N-конец. C: C-конец.

[065] Фиг. 2A-B представляет собой графическое изображение филогенетических деревьев областей VH (фиг. 2A) и VL (Vk) (фиг. 2B) антитела к NKp30. Последовательности VH и VL антител-кандидатов к NKp30 выравнивали с использованием программного обеспечения DNASTAR Megalign™. Гомология последовательностей была показана в филогенетических деревьях.

[066] Фиг. 3A-D показывает определение аффинности очищенных антител мыши к NKp30 с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR).

[067] Фиг. 4 иллюстрирует определение связывания мышинных антител к NKp30 с помощью проточной цитометрии.

[068] Фиг. 5A-C иллюстрирует индукцию IFN- γ (интерферон- γ) антителами к NKp30. Фиг. 5A показывает клетки NKp30⁺ NK92MI (NK92MI/NKp30), которые совместно культивировали с клетками Fc γ R⁺ P815 мыши в присутствии антител m183 или m17 к NKp30 в течение ночи. Продукцию IFN- γ определяли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Фиг. 5B-C показывает PBMC (моноклеарные клетки периферической крови) от здоровых доноров, которые стимулировали IL-2 (1000 Ед/мл) в течение 3 дней перед совместным культивированием с клетками P815 вместе с Ab (антитело) к NKp30 в течение ночи. Продукцию IFN- γ определяли с помощью ELISA (твердофазный иммуноферментный анализ). Результаты представлены в виде среднего значения $\pm$ SD (стандартное отклонение) для трех повторов.

[069] Фиг. 6 представляет собой анализ связывания гуманизированного Ab BGA1831 к NKp30 с помощью проточной цитометрии, демонстрирующий, что связывание с NKp30 сохраняется после гуманизации.

[070] Фиг. 7A показывает картирование эпитопа гуманизированных Ab к NKp30, а фиг. 7B показывает молекулярное моделирование NKp30 в комплексе с B7H6.

[071] Фиг. 8 показывает блокирование взаимодействия NKp30/B7-H6 посредством Ab BGA1833 к NKp30. Блок-схема, показывающая ингибирование взаимодействий

NKp30/B7-H6 посредством Ab к NKp30. Связывание растворимого NKp30 (слитый белок NKp30-mIgG2a) с клетками HCT116, экспрессирующими B7-H6 (HCT116/B7-H6), определяли с помощью проточной цитометрии. Блокаду взаимодействия NKp30/B7-H6 количественно измеряли путем добавления последовательно разведенного BGA1833/IgG1. Результаты показаны в среднем $\pm$ SD для двух повторов.

[072] Фиг. 9А-9В показывает активацию клеток NK92MI/NKp30 посредством BGA1833/IgG1. Фиг. 9А показывает клетки NK92MI/NKp30, которые совместно культивировали с клетками THP-1 (клетки линии острого моноцитарного лейкоза) в присутствии BGA1833/IgG1. IFN- γ в супернатанте культуры определяли с помощью ELISA. Фиг. 9В показывает индукцию NK-клеточно-опосредованного уничтожения посредством Ab к NKp30, которую проводили в обратном анализе ADCC. Вкратце, клетки NK92MI/NKp30 совместно культивировали с клетками THP-1 в присутствии BGA1833/IgG1. Процент цитотоксичности определяли с помощью анализа высвобождения LDH (лактатдегидрогеназа). Все условия были выполнены в трех повторностях, и результаты показаны как среднее $\pm$ SD.

[073] Фиг. 10А показывает выделение биспецифического антитела к NKp30 в качестве первого антигенсвязывающего домена и к клаудину 18.2 (CLDN18.2) в качестве второго антигенсвязывающего домена. Фиг. 10В показывает биспецифическое антитело к NKp30 $\times$ клаудин 18,2 (CLDN18,2) в анализе высвобождения IFN-гамма.

[074] Фиг. 11 показывает биспецифическое антитело к NKp30 в качестве первого антигенсвязывающего домена и онкофетальный антиген к 5T4 (5T4) в качестве второго антигенсвязывающего домена в анализе высвобождения IFN-гамма.

Определения

[075] Если иное не определено в настоящем документе, все другие технические и научные термины, используемые в настоящем документе, имеют значение, обычно понятное специалисту в данной области техники.

[076] В данном контексте, включая прилагаемую формулу изобретения, формы единственного числа слов включают их соответствующие формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное.

[077] Термин «или» используется для обозначения и используется взаимозаменяемо с термином «и/или», если из контекста явно не следует иное.

[078] Термин «противораковый агент» в данном контексте относится к любому агенту, который может быть использован для лечения клеточного пролиферативного расстройства, такого как рак, включая, но не ограничиваясь ими, цитотоксические агенты,

химиотерапевтические агенты, радиотерапевтию и радиотерапевтические агенты, нацеленные противораковые агенты и иммунотерапевтические агенты.

[079] Термин «запускающий естественную цитотоксичность рецептор» или «NKp30» или «CD337» относится к белку массой приблизительно 21 килодальтон. Аминокислотную последовательность NKp30 человека (SEQ ID NO:1) также можно найти под регистрационным номером O14931 (NCTR3_HUMAN) или NP_667341.1. Последовательность нуклеиновой кислоты NKp30 представлена в SEQ ID NO:2.

[080] Термины «введение», «вводить», «лечение» и «обработка», как используется в настоящем документе, когда они применяются к животному, человеку, экспериментальному субъекту, клетке, ткани, органу или биологической жидкости, означают приведение в контакт экзогенного фармацевтического, терапевтического, диагностического агента или композиции с животным, человеком, субъектом, клеткой, тканью, органом или биологической жидкостью. Обработка клетки включает в себя приведение реагента в контакт с клеткой, а также приведение реагента в контакт с жидкостью, где жидкость находится в контакте с клеткой. Термин «введение» и «обработка» также означает обработку *in vitro* и *ex vivo*, например, клетки, реагентом, диагностическим, связывающим соединением или другой клеткой. Термин «субъект» в настоящем документе включает любой организм, предпочтительно животное, более предпочтительно млекопитающее (например, крысу, мышь, собаку, кошку, кролика) и наиболее предпочтительно человека. Лечение любого заболевания или расстройства относится в одном аспекте к облегчению заболевания или расстройства (т.е. замедлению или остановке или уменьшению развития заболевания или по меньшей мере одного из его клинических симптомов). В другом варианте осуществления изобретения «лечить», «лечение» или «обработка» относится к облегчению или улучшению, по меньшей мере, одного физического параметра, включая те, которые не могут быть различимы самим пациентом. В еще одном аспекте, «лечить», «лечение» или «обработка» относится к модуляции заболевания или расстройства, либо физически (например, стабилизацией заметного симптома), либо физиологически (например, стабилизацией физического параметра), либо и тем и другим. В еще одном аспекте изобретения, «лечить», «лечение» или «обработка» относится к предотвращению или задержке начала или развития или прогрессирования заболевания или расстройства.

[081] Термин «субъект» в контексте настоящего изобретения представляет собой млекопитающее, например, примата, предпочтительно высшего примата, например, человека (например, пациента, имеющего или имеющего риск возникновения расстройства, описанного в настоящем документе).

[082] В данном контексте термин «аффинность» относится к силе взаимодействия между антителом и антигеном. Внутри антигена переменные области антитела взаимодействуют через нековалентные силы с антигеном во многих сайтах. В целом, чем больше взаимодействий, тем сильнее аффинность.

[083] В данном контексте термин «антитело» относится к полипептиду семейства иммуноглобулинов, который может связывать соответствующий антиген нековалентно, обратимо и специфически. Например, встречающееся в природе антитело IgG представляет собой тетрамер, содержащий по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, соединенные между собой дисульфидными связями. Каждая тяжелая цепь содержит переменный участок тяжелой цепи (сокращенно обозначается в данном документе как VH) и константный участок тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, CH1, CH2 и CH3. Каждая легкая цепь содержит переменную область легкой цепи (в настоящем описании используется сокращение VL) и константную область легкой цепи. Указанный константный участок легкой цепи состоит из одного домена, CL. Области VH и VL могут быть дополнительно подразделены на гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями, чередующиеся с областями, которые являются более консервативными, называемыми каркасными областями (FR). Каждая VH и VL состоит из трех CDR и четырех каркасных областей FR, расположенных от аминоконца до карбоксиконца в следующем порядке: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Переменные области тяжелой и легкой цепей содержат связывающий домен, который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, включая различные клетки иммунной системы (например, эффекторные клетки) и первый компонент (C1q) классической системы комплемента.

[084] Термин «антитело» включает, но не ограничивается ими, моноклональные антитела, антитела человека, гуманизированные антитела, химерные антитела и антиидиотипические (анти-Id) антитела. Антитела могут быть любого изотипа/класса (например, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA и IgY) или подкласса (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2).

[085] В некоторых вариантах осуществления, антитела к NKp30 содержат по меньшей мере один антигенсвязывающий сайт или по меньшей мере переменную область. В некоторых вариантах осуществления, антитела к NKp30 содержат антигенсвязывающий фрагмент из антитела к NKp30, описанного в настоящем документе.

В некоторых вариантах осуществления, антитело к NKp30 является выделенным или рекомбинантным.

[086] Термин «моноклональное антитело» или «mAb» или «Mab» в настоящем документе означает популяцию по существу однородных антител, т. е. молекулы антител, содержащиеся в популяции, идентичны по аминокислотной последовательности, за исключением возможных естественных мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Напротив, обычные (поликлональные) составы антител обычно содержат множество различных антител, содержащих различные аминокислотные последовательности в своих переменных доменах, в частности, их определяющие комплементарность области, которые часто являются специфическими для различных эпитопов. Определение «моноклональное» указывает на то, что антитело получено из по существу гомогенной популяции антител и его не следует интерпретировать как требующее продукции антитела посредством какого-либо конкретного способа. Моноклональные антитела (mAb) могут быть получены способами, известными специалистам в данной области техники. См., например, Kohler и др., *Nature* 1975 256:495-497; патент США № 4376110; Ausubel и др., *CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY* 1992; Harlow и др., *ANTIBODIES : A LABORATORY MANUAL*, Cold spring Harbor Laboratory 1988; и Colligan и др., *CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY* 1993. Антитела, описанные в настоящем документе, могут быть любого класса иммуноглобулинов, включая IgG, IgM, IgD, IgE, IgA и любой их подкласс, такой как IgG1, IgG2, IgG3, IgG4. Гибридому, продуцирующую моноклональное антитело, можно культивировать *in vitro* или *in vivo*. Высокие титры моноклональных антител могут быть получены при продукции *in vivo*, когда клетки из отдельных гибридом вводят внутрибрюшинно мышам, таким как первично-праймированные мыши породы Balb/c, с получением асцитной жидкости, содержащей высокие концентрации желаемых антител. Моноклональные антитела изотипа IgM или IgG могут быть очищены от таких асцитных жидкостей или от супернатантов культур с использованием способов колоночной хроматографии, хорошо известных специалистам в данной области техники.

[087] В целом, основная структурная единица антитела содержит тетрамер. Каждый тетрамер содержит две идентичные пары полипептидных цепей, каждая из которых имеет одну «легкую цепь» (около 25 кДа) и одну «тяжелую» цепь (около 50-70 кДа). Аминоконцевая часть каждой цепи содержит переменную область из от около 100 до 110 или более аминокислот, главным образом ответственных за распознавание антигена. Карбоксиконцевая часть тяжелой цепи может определять константную область, в первую очередь отвечающую за эффекторную функцию. Как правило, легкие цепи

человека классифицируются как легкие цепи каппа и лямбда. Кроме того, тяжелые цепи человека обычно классифицируют как α , δ , ϵ , γ или μ и определяют изотипы антитела как IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, соответственно. В легкой и тяжелой цепях переменная и константная области соединены «J» областью из около 12 или более аминокислот, причем тяжелая цепь также содержит «D» область из около более 10 аминокислот.

[088] Переменные области каждой пары легкой/тяжелой цепи образуют сайт связывания антитела. Таким образом, в целом, интактное антитело имеет два сайта связывания. За исключением бифункциональных или биспецифических антител, два сайта связывания, как правило, имеют одинаковую первичную последовательность.

[089] Как правило, переменные домены как тяжелой, так и легкой цепей содержат три гиперпеременные области, также называемые «определяющими комплементарность областями», которые расположены между относительно консервативными каркасными областями (FR). CDR обычно выравнивали каркасными областями, что позволяет связываться с конкретным эпитопом. Как правило, от N-конца к C-концу переменные домены как легкой, так и тяжелой цепи содержат FR-1 (или FR1), CDR-1 (или CDR1), FR-2 (FR2), CDR-2 (CDR2), FR-3 (или FR3), CDR-3 (CDR3) и FR-4 (или FR4). Положения CDR и каркасных областей могут быть определены с использованием различных хорошо известных определений в данной области техники, например, по Кабату, по Чотиа, AbM и IMGT (международная информационная система ImMunoGeneTics) (см., например, Johnson и др., *Nucleic Acids Res.*, 29:205-206 (2001); Chothia и Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987); Chothia и др., *Nature*, 342:877-883 (1989); Chothia и др., *J. Mol. Biol.*, 227:799-817 (1992); Al-Lazikani и др., *J. Mol. Biol.*, 273:927-748 (1997) нумерация по ImMunoGenTics (IMGT) (Lefranc, M.-P., *The Immunologist*, 7, 132-136 (1999); Lefranc, M.-P. и др., *Dev.Comp. Immunol.*, 27, 55-77 (2003) (схема нумерации «IMGT»)). Определения сайтов связывания антигена также описаны в следующих источниках: Ruiz и др., *Nucleic Acids Res.*, 28:219-221 (2000); и Lefranc, M. P., *Nucleic Acids Res.*, 29:207-209 (2001); MacCallum и др. al., *J. Mol. Biol.*, 262:732-745 (1996); и Martin и др., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 86:9268-9272 (1989); Martin и др., *Methods Enzymol.*, 203:121-153 (1991); и Rees и др., In Sternberg M. J. E. (ed.), *Protein Structure Prediction*, Oxford University Press, Oxford, 141-172 (1996). Например, для классического формата, согласно схеме Кабата, аминокислотные остатки CDR в переменном домене тяжелой цепи (VH) имеют номера 31-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные остатки CDR в переменном домене легкой цепи (VL) имеют номера 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). Согласно схеме Чотиа аминокислоты CDR в VH имеют номера 26-32 (HCDR1), 52-56 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3); и аминокислотные

остатки в VL имеют номера 26-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 91-96 (LCDR3). Путем объединения определений CDR как по Кабату, так и по Чотиа, CDR имеют номера 26-35 (HCDR1), 50-65 (HCDR2) и 95-102 (HCDR3) в VH человека; и аминокислотные остатки в VL человека имеют номера 24-34 (LCDR1), 50-56 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3). В соответствии с IMGT аминокислотные остатки CDR в VH имеют номера приблизительно 26-35 (HCDR1), 51-57 (HCDR2) и 93-102 (HCDR3), и аминокислотные остатки CDR в VL имеют номера приблизительно 27-32 (LCDR1), 50-52 (LCDR2) и 89-97 (LCDR3) (нумерация по Кабату). В соответствии с IMGT, области CDR антитела могут быть определены с использованием программы IMGT/DomainGap Align.

[090] Термин «гипервариабельная область» означает аминокислотные остатки антитела, которые отвечают за связывание антигена. Гипервариабельная область содержит аминокислотные остатки из «CDR» (например, LCDR1, LCDR2 и LCDR3 в вариабельном домене легкой цепи и HCDR1, HCDR2 и HCDR3 в вариабельном домене тяжелой цепи). См., Kabat и др., (1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5-е Изд. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (определение областей CDR антитела по последовательности); см. также Chothia и Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196: 901-917 (определение областей CDR антитела по структуре). Термин «каркасные» или «FR» остатки означает те остатки, относящиеся к вариабельному домену, которые отличаются от остатков, относящихся к гипервариабельной области, определенных в настоящем документе как остатки CDR.

[091] Если не указано иное, «антигенсвязывающий фрагмент» означает антигенсвязывающие фрагменты антител, т.е. фрагменты антител, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном, связанным полноразмерным антителом, например, фрагменты, которые сохраняют одну или более областей CDR. Примеры антигенсвязывающих фрагментов включают, но не ограничиваются ими, фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и Fv (вариабельный фрагмент); диатела; линейные антитела; молекулы одноцепочечных антител, например, одноцепочечные Fv (ScFv); нанотела и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

[092] Как используется в настоящем документе, антитело «специфически связывается» с белком-мишенью, что означает, что антитело проявляет преимущественное связывание с этой мишенью по сравнению с другими белками, но эта специфичность не требует абсолютной специфичности связывания. Антитело «специфически связывает» или «селективно связывает» используется в контексте описания взаимодействия между антигеном (например, белком) и антителом или антигенсвязывающим фрагментом антитела, относится к реакции связывания, которая

является определяющей для присутствия антигена в гетерогенной популяции белков и других биологических препаратов, например, в биологическом образце, крови, сыворотке, плазме или образце ткани. Таким образом, при определенных обозначенных условиях иммуноанализа антитела или их антигенсвязывающие фрагменты специфически связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в два раза больше по сравнению с фоновым уровнем и не связываются в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце. В одном аспекте в определенных условиях иммуноанализа антитело или его антигенсвязывающий фрагмент специфически связываются с конкретным антигеном по меньшей мере в десять (10) раз больше по сравнению с фоновым уровнем связывания и не связываются специфически в значительном количестве с другими антигенами, присутствующими в образце.

[093] Термин «антитело человека» в настоящем документе означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина человека. Человеческое антитело может содержать углеводные цепи мыши, если оно продуцируется у мыши, в клетке мыши или в гибридоме, полученной из клетки мыши. Аналогичным образом, «антитело мыши» или «антитело крысы» означает антитело, которое содержит только последовательности белка иммуноглобулина мыши или крысы, соответственно.

[094] Термин «гуманизированное» или «гуманизированное антитело» означает формы антител, которые содержат последовательности антител нечеловеческого происхождения (например, мышиного), а также антител человека. Такие антитела содержат минимальную последовательность, полученную из иммуноглобулина нечеловеческого происхождения. Как правило, гуманизированное антитело будет содержать по существу все из по меньшей мере одного, а обычно двух переменных доменов, в которых все или по существу все гиперпеременные петли соответствуют таким участкам иммуноглобулина нечеловеческого происхождения, и все или по существу все из FR областей соответствуют таким участкам последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело также не обязательно будет содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc), обычно иммуноглобулина человека. Приставка «hum», «hu», «Hu» или «h» добавляется к обозначениям клонов антител, когда это необходимо для того, чтобы отличить гуманизированные антитела от исходных антител грызунов. Гуманизированные формы антител грызунов, как правило, содержат одинаковые последовательности CDR исходных антител грызунов, хотя некоторые аминокислотные замены могут быть включены для увеличения аффинности, повышения стабильности гуманизированного антитела, удаления посттрансляционной модификации или по другим причинам.

[095] Термин «соответствующая последовательность зародышевой линии человека» относится к последовательности нуклеиновой кислоты, кодирующей аминокислотную последовательность или подпоследовательность вариабельной области человека, которая имеет самую высокую определенную идентичность аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью эталонной вариабельной области по сравнению со всеми другими известными аминокислотными последовательностями вариабельной области, кодируемыми последовательностями вариабельной области иммуноглобулина зародышевой линии человека. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека также может относиться к аминокислотной последовательности или подпоследовательности вариабельной области человека с самой высокой идентичностью аминокислотной последовательности с аминокислотной последовательностью или подпоследовательностью эталонной вариабельной области по сравнению со всеми другими оцениваемыми аминокислотными последовательностями вариабельной области. Соответствующая последовательность зародышевой линии человека может представлять собой только каркасные области, только определяющие комплементарность области, каркасные и определяющие комплементарность области, вариабельный сегмент (как определено выше) или другие комбинации последовательностей или подпоследовательностей, которые содержат вариабельную область. Идентичность последовательностей может быть определена с использованием способов, описанных в данном документе, например, выравнивание двух последовательностей с использованием BLAST (средство поиска основного локального выравнивания), ALIGN или другого алгоритма выравнивания, известного в данной области техники. Соответствующая нуклеиновая кислота или аминокислотная последовательность зародышевой линии человека может, по меньшей мере на 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100%, идентична последовательности с эталонной вариабельной областью нуклеиновой кислоты или аминокислотной последовательности. Кроме того, если антитело содержит константную область, константная область также получена из таких последовательностей человека, например, последовательностей зародышевой линии человека или мутированных версий последовательностей зародышевой линии человека или антител, содержащих консенсусные каркасные последовательности, полученные из анализа каркасных последовательностей человека, например, как описано в Knappik и др., J. Mol. Biol. 296: 57-86, 2000).

[096] Термин «равновесная константа диссоциации (K_D , M)» относится к константе скорости диссоциации (k_d , время⁻¹), деленной на константу скорости

ассоциации (K_a , время^{-1} , M^{-1}). Константы равновесной диссоциации могут быть измерены с использованием любого известного способа в данной области техники. Антитела согласно настоящему изобретению, как правило, имеют равновесную константу диссоциации менее чем около 10^{-7} или 10^{-8} M, например, менее чем около 10^{-9} M или 10^{-10} M, в некоторых аспектах менее чем около 10^{-11} M, 10^{-12} M или 10^{-13} M.

[097] Термины «рак» или «опухоль» в настоящем документе имеют самое широкое значение, как понятно в данной области техники, и относятся к физиологическому состоянию у млекопитающих, которое обычно характеризуется нерегулируемым ростом клеток. В контексте настоящего изобретения рак не ограничивается определенным типом или местоположением.

[098] В контексте настоящего изобретения, когда делается ссылка на аминокислотную последовательность, термин «консервативная замена» означает замену исходной аминокислоты новой аминокислотой, которая существенно не изменяет химические, физические и/или функциональные свойства антитела или фрагмента, например, его аффинность связывания с NKp30. Общепринятые консервативные подстанции аминокислот хорошо известны в данной области техники.

[099] Двумя примерами алгоритма, которые подходят для определения процента идентичности последовательности и схожести последовательностей, являются алгоритмы BLAST, описанные в Altschul и др., Nuc. Acids Res. 25:3389-3402, 1977; и Altschul и др., J. Mol. Biol. 215:403-410, 1990, соответственно. Программное обеспечение для выполнения BLAST-анализа общедоступно в Национальном центре биотехнологической информации. Данный алгоритм включает, во-первых, идентификацию пар последовательностей с максимальным показателем сходства (HSP) путем определения коротких слов длиной W в последовательности запроса, которые либо совпадают, либо удовлетворяют некоторому пороговому показателю T с положительной оценкой, либо соответствуют слову такой же длины в базы данных последовательностей. T представляет собой порог показателя соседнего слова. Данные исходные совпадения соседних слов выполняют роль затравки для начальных поисков для того, чтобы найти более длинные содержащие их HSP. Совпадения слов распространяются в обоих направлениях вдоль каждой последовательности по мере увеличения кумулятивной балльной оценки выравнивания. Кумулятивные балльные оценки рассчитываются с помощью нуклеотидных последовательностей, параметры M (наградный показатель для пар совпадающих остатков, всегда больше 0) и N (штрафной показатель для несовпадающих остатков, всегда меньше 0). Для аминокислотных последовательностей матрица баллов используется для расчета кумулятивной балльной оценки. Расширение совпадений слов в

каждом направлении останавливается когда: кумулятивный показатель выравнивания падает ниже величины X от его полученного максимального значения; кумулятивный показатель достигает нуля или ниже из-за накопления в выравнивании одного или более остатков с отрицательным показателем; либо же достигается конец последовательности. Параметры алгоритма BLAST W , T и X определяют чувствительность и скорость выравнивания. В программе BLASTN (для нуклеотидных последовательностей) по умолчанию используются длина слова (W) 11, математическое ожидание (E) 10, M составляет 5, N составляет -4 и сравнение обеих цепей. Для аминокислотных последовательностей программа BLAST по умолчанию использует длина слова 3 и математическое ожидание (E) 10, и матрица расчета баллов BLOSUM62 (см., Henikoff b Henikoff, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915) выравнивания (B) 50, математическое ожидание (E) 10, M составляет 5, N составляет -4 и сравнение обеих цепей.

[0100] Алгоритм BLAST также выполняет статистический анализ схожести двух последовательностей (см., например, Karlin b Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 5873-5877, 1993). Одно измерение схожести, обеспеченное алгоритмом BLAST заключается в определении наименьшей суммарной вероятности $P(N)$, которая обеспечивает представление о вероятности, посредством которой совпадение между двумя нуклеотидными или аминокислотными последовательностями будет происходить случайно. Например, нуклеотидная последовательность считается похожей на эталонную последовательность, если наименьшая суммарная вероятность в сравнении тестируемой нуклеиновой кислоты с эталонной нуклеиновой кислотой меньше чем около 0,2, более предпочтительно, меньше чем около 0,01 и, наиболее предпочтительно, меньше чем около 0,001.

[0101] Процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями также может быть определен с использованием алгоритма, который был включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы весовых остатков PAM120, штрафа за длину гэпа 12 и штрафа за гэп 4 (E. Meyers b W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4: 11-17, (1988)). Кроме того, процент идентичности между двумя аминокислотными последовательностями может быть определен с использованием алгоритма, который был включен в программу GAP в программном пакете GCG с использованием либо матрицы BLOSUM62, либо матрицы PAM250, и массы гэпа 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и массы длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6 (Needleman и Wunsch, J. Mol. Biol. 48:444-453, (1970)).

[0102] Термин «нуклеиновая кислота» используется в настоящем документе взаимозаменяемо с термином «полинуклеотид» и относится к дезоксирибонуклеотидам

или рибонуклеотидам и их полимерам в одно- или двухцепочечной форме. Термин охватывает нуклеиновые кислоты, содержащие известные нуклеотидные аналоги или модифицированные остатки или связи, которые являются синтетическими, природными и неприродными, имеющие сходные связывающие свойства, как у эталонной нуклеиновой кислоты, и которые метаболизируются способом, подобным эталонным нуклеотидам. Примеры таких аналогов включают, без ограничения, фосфоротриааты, фосфорамидаты, метилфосфонаты, хиральные метилфосфонаты, 2-О-метилрибонуклеотиды, пептид-нуклеиновые кислоты (PNA).

[0103] Термин «функционально связанный» в контексте нуклеиновых кислот относится к функциональной взаимосвязи между двумя или более полинуклеотидными (например, ДНК (дизоксирибонуклеиновая кислота) сегментами. Обычно термин относится к функциональному взаимодействию транскрипционной регуляторной последовательности с транскрибируемой последовательностью. Например, промоторная или энхансерная последовательность функционально связана с кодирующей последовательностью, если она стимулирует или модулирует транскрипцию кодирующей последовательности в соответствующей клетке-хозяине или другой экспрессирующей системе. Как правило, промоторные транскрипционные регуляторные последовательности, которые функционально связаны с транскрибируемой последовательностью, физически примыкают к транскрибируемой последовательности, т.е., они являются цис-действующими. Однако некоторые регуляторные последовательности транскрипции, такие как энхансеры, не обязательно должны физически примыкать или находиться в непосредственной близости от кодирующих последовательностей, транскрипция которых они усиливают.

[0104] В некоторых аспектах настоящее изобретение относится к композициям, например, фармацевтически приемлемым композициям, которые включают антитело к NKp30, как описано в настоящем документе, составленное вместе по меньшей мере с одним фармацевтически приемлемым вспомогательным эксципиентом. В данном контексте термин «фармацевтически приемлемый эксципиент» включает любые и все растворители, дисперсионные среды, изотонические агенты и агенты, замедляющие абсорбцию, и тому подобное, которые являются физиологически совместимыми. Эксципиент может быть пригодным для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, ректального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии).

[0105] Композиции, описанные в настоящем документе, могут быть в различных формах. Они включают, например, жидкие, полутвердые и твердые лекарственные

формы, такие как жидкие растворы (например, инъекционные и инфузионные растворы), дисперсии или суспензии, липосомы и суппозитории. Подходящая форма зависит от предполагаемого способа введения и терапевтического применения. Типичные подходящие композиции находятся в форме инъекционных или инфузионных растворов. Одним из подходящих способов введения является парентеральный (например, внутривенный, подкожный, внутрибрюшинный, внутримышечный). В некоторых вариантах осуществления, антитело вводили путем внутривенной инфузии или инъекции. В некоторых вариантах осуществления, антитело вводили путем внутримышечной или подкожной инъекции.

[0106] Термин «терапевтически эффективное количество» в данном контексте относится к количеству антитела, которое при введении субъекту для лечения заболевания или по меньшей мере одного из клинических симптомов заболевания или расстройства является достаточным для осуществления такого лечения заболевания, расстройства или симптома. «Терапевтически эффективное количество» может изменяться в зависимости от антитела, заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, тяжести заболевания, расстройства и/или симптомов заболевания или расстройства, возраста субъекта, подлежащего лечению, и/или веса субъекта, подлежащего лечению. Соответствующее количество в любом конкретном случае может быть очевидным для специалистов в данной области техники или может быть определено с помощью рутинных экспериментов. В случае комбинированной терапии «терапевтически эффективное количество» относится к общему количеству объектов комбинации для эффективного лечения заболевания, расстройства или состояния.

[0107] Термин «комбинированная терапия» относится к введению двух или более терапевтических агентов для лечения терапевтического состояния или расстройства, описанного в настоящем описании. Такое введение включает совместное введение этих терапевтических агентов по существу одновременно. Такое введение также включает совместное введение в нескольких или в отдельных контейнерах (например, капсулах, порошках и жидкостях) для каждого активного ингредиента. Порошки и/или жидкости могут быть восстановлены или разведены до желаемой дозы перед введением. Кроме того, такое введение также включает последовательное применение каждого типа терапевтического агента, либо приблизительно в одно и то же время, либо в разное время. В любом случае, схема лечения обеспечит благоприятные эффекты комбинации лекарственного средства при лечении состояний или расстройств, описанных в настоящем документе.

[0108] В данном контексте фраза «в комбинации с» означает, что антитело к NKp30, антигенсвязывающий фрагмент или мультиспецифическое антитело вводили субъекту одновременно с, непосредственно перед или непосредственно после введения дополнительного терапевтического агента. В некоторых вариантах осуществления антитело к NKp30, антигенсвязывающий фрагмент или мультиспецифическое антитело вводили в виде совместного препарата с дополнительным терапевтическим агентом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0109] Настоящее изобретение относится к антителам, антигенсвязывающим фрагментам или поливалентным антителам, которые специфически связывают NKp30 человека. Кроме того, настоящее изобретение относится к антителам, которые имеют желательные фармакокинетические характеристики и другие желательные характеристики, и, таким образом, могут быть использованы для снижения вероятности возникновения рака или лечения рака. Настоящее изобретение дополнительно относится к фармацевтическим композициям, содержащим антитела или антигенсвязывающие фрагменты, и способам получения и применения таких фармацевтических композиций для предотвращения и лечения рака и связанных с ним расстройств.

Антитела к NKp30

[0110] Настоящее изобретение относится к антителам или его антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NKp30. Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению включают, но не ограничиваются ими, антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, полученные, как описано ниже.

[0111] Настоящее изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NKp30, где указанные антитела или фрагменты антител (например, антигенсвязывающие фрагменты) содержат домен VH, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:9, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:21 или SEQ ID NO:30 (Таблица 1). Настоящее изобретение также относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связывают NKp30, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат HCDR (область, определяющая комплементарность тяжелой цепи), содержащую аминокислотную последовательность любого из HCDR, перечисленных в Таблице 1. В одном аспекте настоящее изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NKp30, где указанные антитела содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или более HCDR, содержащих аминокислотную последовательность любой из HCDR, перечисленных в Таблице 1.

[0112] Настоящее изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NKp30, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат домен VL, содержащий аминокислотную последовательность SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:23 или SEQ ID NO:32 (Таблица 1). Настоящее изобретение также относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NKp30, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат LCDR (определяющая комплементарность область легкой цепи), содержащую аминокислотную последовательность любого из LCDR, перечисленных в Таблице 1. В частности, изобретение относится к антителам или антигенсвязывающим фрагментам, которые специфически связываются с NKp30, где указанные антитела или антигенсвязывающие фрагменты содержат (или, альтернативно, состоят из) одну, две, три или более LCDR, содержащих аминокислотную последовательность любой из LCDR, перечисленных в Таблице 1.

[0113] Другие антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают аминокислоты, которые были подвержены изменению, но по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичны в областях CDR с областями CDR, раскрытых в Таблице 1. В некоторых аспектах они включают изменения аминокислотных последовательностей, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвержены изменению в областях CDR по сравнению с областями CDR, изображенными в последовательности, описанной в таблице 3.

[0114] Другие антитела по настоящему изобретению включают антитела, где аминокислоты или нуклеиновые кислоты, кодирующие аминокислоты, были подвержены изменению; но по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90%, 95% или 99% идентичны последовательностям, описанным в Таблице 1. В некоторых аспектах они включают изменения в аминокислотных последовательностях, где не более 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислот были подвержены изменению в переменных областях по сравнению с переменными областями, изображенными в последовательности, описанной в Таблице 1, при сохранении по существу той же терапевтической активности.

[0115] Настоящее изобретение также относится к последовательностям нуклеиновых кислот, которые кодируют VH, VL, полноразмерную тяжелую цепь и полноразмерную легкую цепь антител, которые специфически связываются с NKp30. Такие последовательности нуклеиновых кислот могут быть оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих.

Таблица 1

Описание	SEQ ID NO		Последовательность
Полноразмерный НКp30 человека	SEQ ID NO:1	Последовательность белка	MAWMLLLILIMVHPGSCALWVSQPPEIRTLEGSS AFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVVPGKEVRN GTPEFRGRLAPLASSRFLHDHQAELHIRDVRGHD ASIYVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEHPQLG AGTVLLLRAGFYAVSFLSVAVGSTVYYQKCLT WKGPRRQLPAVVPAPLPPPCGSSAHLPPVPGG
Полноразмерный НКp30 человека	SEQ ID NO:2	Последовательность ДНК	ATGGCCTGGATGCTGTTGCTCATCTTGATCATG GTCCATCCAGGATCCTGTGCTCTCTGGGTGTCC CAGCCCCCTGAGATTCGTACCCTGGAAGGATC CTCTGCCTTCCTGCCCTGCTCCTTCAATGCCAG CCAAGGGAGACTGGCCATTGGCTCCGTCACGT GGTTCCGAGATGAGGTGGTTCCAGGGAAGGAG GTGAGGAATGGAACCCCAGAGTTCAGGGGCCG CCTGGCCCCACTTGCTTCTTCCCGTTTCCTCCA TGACCACCAGGCTGAGCTGCACATCCGGGACG TGCGAGGCCATGACGCCAGCATCTACGTGTGC AGAGTGGAGGTGCTGGGCCTTGGTGTCTGGGAC AGGGAATGGGACTCGGCTGGTGGTGGAGAAA GAACATCCTCAGCTAGGGGCTGGTACAGTCCT CCTCCTTCGGGCTGGATTCTATGCTGTCAGCTT TCTCTCTGTGGCCGTGGGCAGCACCGTCTATTA CCAGGGCAAATGTCTGACCTGGAAAGGTCCAA GAAGGCAGCTGCCGGCTGTGGTCCCAGCGCCC CTCCCACCACCATGTGGGAGCTCAGCACATCT GCTTCCCCCAGTCCCAGGAGGCTAA
Mu183	SEQ ID NO:3	HCDR1 (по Кабату)	SSWMH
Mu183	SEQ ID NO:4	HCDR2 (по Кабату)	EIHPNRDNTNYNEKFKG
Mu183	SEQ ID	HCDR3	SYDYGGAYFDS

	NO:5	(по Кабаты)	
Mu183	SEQ ID NO:6	LCDR1 (по Кабаты)	KASQDVSTAVA
Mu183	SEQ ID NO:7	LCDR2 (по Кабаты)	AASYRHI
Mu183	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабаты)	QQHYSNPFT
Mu183	SEQ ID NO:9	VH	QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSW MHWAKQRPQGQGLEWIGEIHPNRDNTNYNEKFK GKATLTVDTSSSTAYVDLSSLTSEDSAVYYCARS YYDYGGAYFDSWGQGTTTLTVSS
Mu183 VL	SEQ ID NO:10	VL	QIVLTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVA WYQQKPGQSPKLLIYAASYRHIGVPDRFTGSGSG TDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSNPFTFGSGT KLEIK
BGA1831	SEQ ID NO:3	HCDR1 (по Кабаты)	SSWMH
BGA1831	SEQ ID NO:4	HCDR2 (по Кабаты)	EIHPNRDNTNYNEKFKG
BGA1831	SEQ ID NO:5	HCDR3 (по Кабаты)	SYDYGGAYFDS
BGA1831	SEQ ID NO:6	LCDR1 (по Кабаты)	KASQDVSTAVA
BGA1831	SEQ ID NO:7	LCDR2 (по	AASYRHI

		Кабаты)	
BGA1831	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабаты)	QQHYSNPFT
BGA1831 VH	SEQ ID NO:11	VH	QVQLVQSGAVVVKPGASVKVSKASGYTFTSS WMHVARQAPGQGLEWIGEIHPNRDNTNYNEKF KGRATLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RSYYDYGGAYFDSWGGQGLVTVSS
BGA1831 ДНК VH	SEQ ID NO:12	ДНК VH	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGTGGT GGTGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TGGATGCACTGGGCCAGACAAGCTCCCGGTCA AGGTTTAGAGTGGATCGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGCCACTTTAACCGTGGACACCAG CACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGACTACGGCGGCGCCTA CTTCGACAGCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGC
BGA1831 VL	SEQ ID NO:13	VL	QIVLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQDVSTAVA WYQQKPGKSPKLLIYAASYRHIGVPSRFSGSGSG TDFTFITISLQPEDFATYYCQQHYSNPFTFGGGTK VEIK
BGA1831 ДНК VL	SEQ ID NO:14	ДНК VL	CAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTAGCTCTTT AAGCGCTTCCGTGGGCGATCGTGTACCATCA CTTGTAAGGCCAGCCAAGATGTCAGCACAGCC GTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGAG CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTATC GTCACATCGGCGTGCCAGCAGATTTAGCGGC AGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCTTCACCAT CAGCTCTTTACAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCCTTC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA G

BGA1831 HC	SEQ ID NO:15	HC	QVQLVQSGAVVVKPGASVKVSKASGYTFTSS WMHVARQAPGQGLEWIGEIHPNRDNTNYNEKF KGRATLTVDTSTSTAYMELSSLRSEDNAVYYCA RSYYDYGGAYFDSWGQGTLLTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
BGA1831 ДНК HC	SEQ ID NO:16	ДНК HC	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGTGGT GGTGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TGGATGCACTGGGCCAGACAAGCTCCCGGTCA AGGTTTAGAGTGGATCGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGCCACTTTAACCGTGGACACCAG CACCAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGACTACGGCGGCGCCTA CTTCGACAGCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGCGCTAGCACAAAGGGACCAAG CGTGTTCCCACTGGCACCTAGCTCCAAGTCTAC CAGCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGATGTCTGG TGAAGGATTATTTCCCTGAGCCAGTGACCGTG AGCTGGAACCTCCGGCGCCCTGACCTCTGGAGT GCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCG GCCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACCGTGC CCAGCTCCTCTCTGGGCACCCAGACATATATCT GCAACGTGAATCACAAGCCATCTAATACAAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTG

			ATAAGACCCACACATGCCACCTTGTCTGCA CCACCAGCAGCAGGCCCAAGCGTGTTCTGTT TCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTG GACGTGTCTCACGAGGATCCCGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACA ATGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTA CAATAGCACCTATCGCGTGGTGTCCGTGCTGA CAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCT GGCCGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGG CAAAGGGACAGCCAAGGGAGCCACAGGTGTA CACACTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAG GGCTTCTATCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAA GACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCA GCTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATA AGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCC TGTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCA CTACACACAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCG GCAAGTGA
BGA1831 LC	SEQ ID NO:17	LC	QIVLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVA WYQQKPGKSPKLLIYAASYRHIGVPSRFSGSGSG TDFTFITISLQPEDFATYYCQQHYSNPFTFGGGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC
BGA1831 ДНК LC	SEQ ID NO:18	ДНК LC	CAGATCGTGCTGACCCAGAGCCCTAGCTCTTT AAGCGCTTCCGTGGGCGATCGTGTACCATCA CTTGTAAGGCCAGCCAAGATGTCAGCACAGCC GTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGAG CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTATC GTCACATCGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGGC

			AGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCTTCACCAT CAGCTCTTTACAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCCTTC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA GAGAACCGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTT CCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAAAGCGGAA CAGCCAGCGTCGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCT ACCCCAGGGAGGCCAAGGTCCAGTGGAAGGT GGACAACGCTCTGCAGAGCGGCAACTCTCAGG AGAGCGTGACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTGAGCAGCACACTGACCCTGA GCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCTTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGTCTA GCCCAGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAG TGTTAG
BGA1832	SEQ ID NO:19	HCDR1 (по Кабаты)	SSYMH
BGA1832	SEQ ID NO:4	HCDR2 (по Кабаты)	EIHPNRDNTNYNEKFKG
BGA1832	SEQ ID NO:20	HCDR3 (по Кабаты)	SYDYGGAYFDA
BGA1832	SEQ ID NO:6	LCDR1 (по Кабаты)	KASQDVSTAVA
BGA1832	SEQ ID NO:7	LCDR2 (по Кабаты)	AASYRHI
BGA1832	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабаты)	QQHYSNPFT

BGA1832 VH	SEQ ID NO:21	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSY MHWVRQAPGQGLEWMGEIHPNRDNTNYNEKF KGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA RSYYDYGGAYFDAWGQGLTVTVSS
ДНК VH BGA1832	SEQ ID NO:22	ДНК VH	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TACATGCACTGGGTCAGACAAGCTCCCGGTCA AGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGTCACTATGACCGTGGACACCAG CACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGACTACGGCGGCGCCTA CTTCGACGCCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGC
VL BGA1832	SEQ ID NO:23	VL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYAASYRHIGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSNPFTFGGGT KVEIK
ДНК VL BGA1832	SEQ ID NO:24	ДНК VL	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCTAGCTCTTT AAGCGCTTCCGTGGGCGATCGTGTCAACATCA CTTGTAAGGCCAGCCAAGATGTCAGCACAGCC GTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGC CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTATC GTCACATCGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGGC AGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCTTAACCAT CAGCTCTTTACAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCCTTC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA G
HC BGA1832	SEQ ID NO:25	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSY MHWVRQAPGQGLEWMGEIHPNRDNTNYNEKF KGRVTMTVDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA RSYYDYGGAYFDAWGQGLTVTVSSASTKGPSVF

			PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNYHTQKSLSLSPGK
ДНК HC BGA1832	SEQ ID NO:26	ДНК HC	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TACATGCACTGGGTCAGACAAGCTCCCGGTCA AGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGTCACTATGACCGTGGACACCAG CACCAGCACC GTGTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGACTACGGCGGCGCCTA CTTCGACGCCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGCGCTAGCACAAAGGGACCAAG CGTGTTCCCACTGGCACCTAGCTCCAAGTCTAC CAGCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGATGTCTGG TGAAGGATTATTTCCCTGAGCCAGTGACCGTG AGCTGGAACTCCGGCGCCCTGACCTCTGGAGT GCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCG GCCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACCGTGC CCAGCTCCTCTCTGGGCACCCAGACATATATCT GCAACGTGAATCACAAGCCATCTAATACAAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTG ATAAGACCCACACATGCCCACCTTGTCTGCA CCACCAGCAGCAGGCCCAAGCGTGTTCTCTGTT TCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTG

			GACGTGTCTCACGAGGATCCCGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACA ATGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTA CAATAGCACCTATCGCGTGGTGTCCGTGCTGA CAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCT GGCCGCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGG CAAAGGGACAGCCAAGGGAGCCACAGGTGTA CACACTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAG GGCTTCTATCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAA GACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCA GCTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATA AGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCC TGTTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCA CTACACACAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCG GCAAGTGA
LC BGA1832	SEQ ID NO:27	LC	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYAASYPHIGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSNPFTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
ДНК LC BGA1832	SEQ ID NO:28	ДНК LC	GACATCCAGCTGACCCAGAGCCCTAGCTCTTT AAGCGCTTCCGTGGGCGATCGTGTACCATCA CTTGTAAGGCCAGCCAAGATGTCAGCACAGCC GTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGC CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTATC GTCACATCGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGGC AGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCTTAACCAT CAGCTCTTTACAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCCTTC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA

			GAGAACCGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTCATCTT CCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAAAGCGGAA CAGCCAGCGTCGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCT ACCCCAGGGAGGCCAAGGTCCAGTGGAAGGT GGACAACGCTCTGCAGAGCGGCAACTCTCAGG AGAGCGTGACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTGAGCAGCACACTGACCCTGA GCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCTTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGTCTA GCCCAGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAG TGTTAG
BGA1833	SEQ ID NO:19	HCDR1 (по Кабаты)	SSYMH
BGA1833	SEQ ID NO:4	HCDR2 (по Кабаты)	EIHPNRDNTNYNEKFKG
BGA1833	SEQ ID NO:29	HCDR3 (по Кабаты)	SYYEYGGAYFDA
BGA1833	SEQ ID NO:6	LCDR1 (по Кабаты)	KASQDVSTAVA
BGA1833	SEQ ID NO:7	LCDR2 (по Кабаты)	AASYRHI
BGA1833	SEQ ID NO:8	LCDR3 (по Кабаты)	QQHYSNPFT
BGA1833 VH	SEQ ID NO:30	VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSY MHWVRQAPGQGLEWMGEIHPNRDNTNYNEKF KGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA RSYYEYGGAYFDAWGQGLVTVSS

BGA1833 ДНК VH	SEQ ID NO:31	ДНК VH	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TACATGCACTGGGTCAGACAAGCTCCCGGTCA AGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGTCACTATGACCAGGGACACCAG CACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGAGTACGGCGGCGCCTA CTTCGACGCCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGC
BGA1833 VL	SEQ ID NO:32	VL	QIQLTQSPSSLASVGDRTITCKASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYAASYRHIGVPSRFSGSGSG TDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYSNPFTFGGGT KVEIK
BGA1833 ДНК VL	SEQ ID NO:33	ДНК VL	CAGATCCAGCTGACCCAGAGCCCTAGCTCTTT AAGCGCTTCCGTGGGCGATCGTGTCAACATCA CTTGTAAGGCCAGCCAAGATGTCAGCACAGCC GTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGC CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTATC GTCACATCGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGGC AGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCTTAACCAT CAGCTCTTTACAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCCTTC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA G
BGA1833 HC	SEQ ID NO:34	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSY MHWVRQAPGQGLEWMGEIHPNRDNTNYNEKF KGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDNAVYYCA RSYYEYGGAYFDAWGQGLVTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVV

			DVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL AAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
BGA1833 ДНК НС	SEQ ID NO:35	ДНК НС	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TACATGCACTGGGTCAGACAAGCTCCCGGTCA AGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGTCACTATGACCAGGGACACCAG CACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGAGTACGGCGGCGCCTA CTTCGACGCCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGCGCTAGCACAAAGGGACCAAG CGTGTTCCCACTGGCACCTAGCTCCAAGTCTAC CAGCGGAGGAACAGCCGCCCTGGGATGTCTGG TGAAGGATTATTTCCCTGAGCCAGTGACCGTG AGCTGGAACCTCCGGCGCCCTGACCTCTGGAGT GCACACATTTCCAGCCGTGCTGCAGTCTAGCG GCCTGTACTCCCTGTCCTCTGTGGTGACCGTGC CCAGCTCCTCTCTGGGCACCCAGACATATATCT GCAACGTGAATCACAAGCCATCTAATACAAAG GTGGACAAGAAGGTGGAGCCCAAGAGCTGTG ATAAGACCCACACATGCCCACCTTGTCCTGCA CCACCAGCAGCAGGCCCAAGCGTGTTCCTGTT TCCTCCAAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTGACATGCGTGGTGGTG GACGTGTCTCACGAGGATCCCGAGGTGAAGTT CAACTGGTACGTGGATGGCGTGGAGGTGCACA ATGCCAAGACCAAGCCTAGGGAGGAGCAGTA CAATAGCACCTATCGCGTGGTGTCCGTGCTGA

			CAGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAG GAGTATAAGTGCAAGGTGAGCAATAAGGCCCT GGCCGCCCCCTATCGAGAAGACCATCTCCAAGG CAAAGGGACAGCCAAGGGAGCCACAGGTGTA CACACTGCCCCCTAGCAGAGACGAGCTGACCA AGAACCAGGTGTCCCTGACATGTCTGGTGAAG GGCTTCTATCCCTCCGATATCGCCGTGGAGTGG GAGTCTAATGGCCAGCCTGAGAACAATTACAA GACCACACCACCCGTGCTGGACTCTGATGGCA GCTTCTTTCTGTATTCTAAGCTGACCGTGGATA AGAGCAGATGGCAGCAGGGCAACGTGTTTTCC TGTTCTGTGATGCACGAGGCCCTGCACAATCA CTACACACAGAAGAGCCTGTCCCTGTCTCCCG GCAAGTGA
BGA1833 LC	SEQ ID NO:36	LC	QIQLTQSPSSLSASVGDRTITCKASQDVSTAVA WYQQKPGKAPKLLIYAASYPHIGVPSRFSGSGSG TDFTLTISLQPEDFATYYCQQHYSNPFTFGGGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLN NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC
BGA1833 ДНК LC	SEQ ID NO:37	ДНК LC	CAGATCCAGCTGACCCAGAGCCCTAGCTCTTT AAGCGCTTCCGTGGGCGATCGTGTCAACATCA CTTGTAAGGCCAGCCAAGATGTCAGCACAGCC GTGGCTTGGTACCAGCAGAAGCCCGGAAAGGC CCCCAAGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCTATC GTCACATCGGCGTGCCCAGCAGATTTAGCGGC AGCGGCAGCGGAACCGACTTCACCTTAACCAT CAGCTCTTTACAGCCCGAGGACTTCGCCACCT ACTACTGCCAGCAGCACTACAGCAACCCCTTC ACCTTCGGCGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAA GAGAACCGTGGCCGCTCCTAGCGTGTTTCATCTT CCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAAAGCGGAA CAGCCAGCGTCGTCTGCCTGCTGAACAACCTTCT ACCCAGGGAGGCCAAGGTCCAGTGGAAGGT

			GGACAACGCTCTGCAGAGCGGCAACTCTCAGG AGAGCGTGACAGAGCAGGACAGCAAGGACAG CACCTACAGCCTGAGCAGCACACTGACCCTGA GCAAAGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTA CGCTTGCGAAGTGACCCACCAGGGACTGTCTA GCCCAGTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAG TGTTAG
wtIgG1	SEQ ID NO:38		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLP PSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
BGA1833 c HC wtIgG1	SEQ ID NO:39	HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSSY MHWVRQAPGQGLEWMGEIHPNRDNTNYNEKF KGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSED TAVYYCA RSYYEYGGAYFDAWGQGT LVT VSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQ YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK
BGA1833 c ДНК HC wtIgG1	SEQ ID NO:40	ДНК HC	CAAGTTCAGCTGGTGCAGAGCGGAGCCGAGGT GAAGAAGCCCGGTGCCTCTGTGAAGGTGAGCT GCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCTCCAGC TACATGCACTGGGTCAGACAAGCTCCCGGTCA

			AGGTTTAGAGTGGATGGGCGAGATCCACCCCA ATCGTGACAACACCAACTACAACGAGAAGTTC AAGGGTCGTGTCACTATGACCAGGGACACCAG CACCAGCACCGTGTACATGGAGCTGAGCTCTT TAAGGAGCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGC GCTCGTAGCTACTACGAGTACGGCGGCGCCTA CTTCGACGCCTGGGGACAAGGTACTTTAGTGA CCGTGAGCAGCGCTAGCACCAAGGGGCCCTCG GTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGTACT TCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGT CAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGT CGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG CACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGA CTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCC TCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTG CAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGG TGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGAC AAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACC TGAACCTCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCCTCTT CCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCT CCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTG GACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTT CAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATA ATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTA CAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCA CCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAG GAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCT CCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAG CCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAA GAACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAG GCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGG GAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACA AGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGC TCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTGGAC
--	--	--	--

			AAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTC ATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACC ACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCG GGTAAATGA
mfIgG1 (ImG1 Macaca fascicularis)	SEQ ID NO:41		ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALAAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSPGK
Macaca fascicularis NKp30	SEQ ID NO:42		MAWMLLLILIMVYPGSCALWVSQPPEIRTLEGSS AFLPCSFNASQGRLAIGSVTWFRDEVAPGKEVRN GTPEFRGRLAPLSSSRFLRDHQAELHIWDVRGHD AGIYVCRVEVLGLGVGTGNGTRLVVEKEYPQLG AGTVLLLRAGFYAVSFLSVAVGSTLYYQGKCHC HMGTHCHS

Идентификация эпитопов и антител, связывающихся с одним и тем же эпитопом

[0116] Настоящее изобретение относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с эпитопом NKp30 человека. В некоторых аспектах, антитела и антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с тем же эпитопом NKp30.

[0117] Настоящее изобретение также относится к антителам и их антигенсвязывающим фрагментам, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к NKp30, описанные в Таблице 1. Таким образом, дополнительные антитела и их антигенсвязывающие фрагменты могут быть идентифицированы на основании их способности перекрестно конкурировать (например, конкурентно ингибировать связывание статистически значимым образом) с другими антителами в анализах связывания. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению с NKp30 демонстрирует, что тестируемое антитело может конкурировать с данным антителом или его антигенсвязывающими фрагментами за связывание с NKp30. Такое антитело может, не

будучи связанным какой-либо одной теорией, связываться с тем же или схожим (например, структурно подобным или пространственно проксимальным) эпитопом на NKp30, что и антитело или его антигенсвязывающие фрагменты, с которыми оно конкурирует. В определенном аспекте антитело, которое связывается с тем же эпитопом на NKp30, что и антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению, представляет собой человеческое или гуманизированное моноклональное антитело. Такие человеческие или гуманизированные моноклональные антитела могут быть получены и выделены, как описано в настоящем документе.

Изменение Fc-области

[0118] Еще в одном аспекте, Fc-область изменяли путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, одна или более аминокислот могут быть заменены другим аминокислотным остатком, таким образом, что антитело будет иметь измененную аффинность в отношении эффекторного лиганда, но сохранит антигенсвязывающую способность исходного антитела. Эффекторным лигандом, в отношении которого аффинность изменяли, может быть, например, рецептор Fc или C1-компонентом комплемента. Этот подход описан, например, в патенте США № 5624821 и 5648260, Winter и др.

[0119] В другом аспекте один или более аминокислотных остатков могут быть заменены одним или более различными аминокислотными остатками, так что антитело имеет измененное связывание C1q и/или сниженную или отмененную комплемент-зависимую цитотоксичность (CDC). Этот подход описан, например, в патенте США № 6,194,551, Idusogie и др.

[0120] В другом аспекте, одну или более аминокислотных остатков изменяли, чтобы таким образом изменить способность антитела фиксировать комплемент. Этот подход описан, например, в публикации WO 94/29351 Bodmer и др. В конкретном аспекте одну или более аминокислот антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению заменяли одним или более аллотипическими аминокислотными остатками для подкласса IgG1 и изотипа каппа. Аллотипические аминокислотные остатки также включают, но не ограничиваются ими, константную область тяжелой цепи подклассов IgG1, IgG2 и IgG3, а также константную область легкой цепи изотипа каппа, как описано Jefferis и др., MAbs. 1:332-338 (2009).

[0121] В еще одном аспекте область Fc модифицировали для увеличения способности антитела опосредовать антителозависимую клеточную цитотоксичность (ADCC) и/или для увеличения аффинности антитела в отношении рецептора Fcγ путем

модификации одной или более аминокислот. Этот подход описан, например, в публикации WO 00/42072 от Presta. Кроме того, сайты связывания на IgG1 человека для FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были картированы и были описаны варианты с улучшенным связыванием (см., Shields, и др., J. Biol. Chem. 276:6591-6604, 2001).

[0122] В еще одном аспекте модифицировали гликозилирование антитела или антигенсвязывающего фрагмента NKp30. Например, может быть получено агликозилированное антитело (т.е. антитело не имеет или имеет уменьшенное гликозилирование). Гликозилирование может быть изменено, например, для увеличения аффинности антитела к «антигену». Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем изменения одного или более сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, могут быть выполнены одна или более аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или более сайтов гликозилирования каркаса вариабельной области, чтобы таким образом элиминировать гликозилирование на этом сайте. Такое агликозилирование может увеличивать аффинность антитела к антигену. Данный подход описан, например, в патенте США № 5714350 и 6350861, Со и др.

[0123] Дополнительно или альтернативно может быть получено антитело, которое имеет измененный тип гликозилирования, такое как гипофукозилированное антитело, имеющее уменьшенные количества остатков фукозила, или антитело, имеющее увеличенное количество структур бисектного GlcNac. Было продемонстрировано, что такие измененные паттерны гликозилирования увеличивают ADCC-способность антител. Такие углеводные модификации могут быть осуществлены, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным путем гликозилирования. Клетки с измененным путем гликозилирования были описаны в данной области и могут быть использованы в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируются рекомбинантные антитела по изобретению, в результате чего получали антитело с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195, Hang и др., описана клеточная линия с функционально разрушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу таким образом, что антитела, экспрессируемые в такой клеточной линии, проявляют гипофукозилирование. В публикации PCT WO 03/035835, Presta, описан вариант клеточной линии CHO (клетка яичника китайского хомячка), клетки Lec13, с уменьшенной способностью присоединять фукозу к Asn (297)-связанным углеводам, что также приводит к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также, Shields, R.L. и др., 2002 J. Biol. Chem. 277: 26733-26740). WO 99/54342, Umana и др., описывает клеточные линии, сконструированные для экспрессии гликопротеин-модифицирующих гликозилтрансфераз

(например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансфераза III (GnTIII)) таким образом, что антитела, экспрессируемые в сконструированных клеточных линиях, демонстрируют повышенное количество структур бисектного GlcNac, что приводит к увеличению активности ADCC в антителах (см. также Umana и др., 1999 Nat. Biotech. 17:176-180, 1999).

[0124] В другом аспекте, если желательно снижение ADCC, было показано, что человеческое антитело подкласса IgG4 имеет только умеренную ADCC и почти не обладает эффекторной функцией CDC (Moore G L, и др., 2010 MAbs, 2:181-189). Однако природный IgG4 был обнаружен менее стабильным в стрессовых условиях, таких как в кислотном буфере или при повышающейся температуре (Angal, 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Dall 'Acqua и др., 1998 Biochemistry, 37:9266-9273; Aalberse и др., 2002 Immunol, 105:9-19). Сниженная ADCC может быть достигнута путем функционального связывания антитела с Fc IgG4, сконструированным с комбинациями изменений, чтобы снижать активность связывания FcγR или связывания C1q, тем самым уменьшая или устраняя эффекторные функции ADCC и CDC. Учитывая физико-химические свойства антитела как биологического лекарственного средства, одним из менее желательных, присущих IgG4 свойств является динамическое разделение двух его тяжелых цепей в растворе с образованием полуантитела, которое приводит к полуспецифическим антителам, генерируемым *in vivo* посредством процесса, называемого «обменом плеча Fab» (Van der Neut Kolfshoten M, и др., 2007 Science, 317:1554-157). Мутация серина на пролин в положении 228 (система нумерации EU), по-видимому, ингибирует разделение тяжелой цепи IgG4 (Angal, 1993 Mol Immunol, 30:105-108; Aalberse и др., 2002 Immunol, 105:9-19). Сообщалось, что некоторые из аминокислотных остатков в шарнирной области и области γFc оказывают влияние на взаимодействие антитела с рецепторами Fcγ (Chappel, и др. 1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9036-9040; Mukherjee и др., 1995 FASEB J, 9:115-119; Armour и др., 1999 Eur J Immunol, 29:2613-2624; Clynes и др., 2000 Nature Medicine, 6:443-446; Arnold, 2007 Annu Rev immunol, 25:21-50). Кроме того, некоторые редко встречающиеся изоформы IgG4 в человеческой популяции также могут вызывать различные физико-химические свойства (Brusco и др., 1998 Eur J Immunogenet, 25:349-55; Aalberse и др., 2002 Immunol, 105:9-19). Для получения антител к NKp30 с низкой ADCC и CDC, но хорошей стабильностью можно модифицировать шарнирную область и область Fc IgG4 человека и внести ряд изменений. Данные модифицированные молекулы Fc IgG4 можно найти в SEQ ID NO: 83-88, патент США № 8735553, выданный Li и др.

Получение антител к NKp30

[0125] Антитела к NKp30, антигенсвязывающие фрагменты и мультиспецифические антитела могут быть получены любыми способами, известными в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, рекомбинантную экспрессию, химический синтез и ферментативное расщепление тетрамеров антител, тогда как полноразмерные моноклональные антитела могут быть получены, например, гибридомным или рекомбинантным получением. Рекомбинантная экспрессия может происходить из любых подходящих клеток-хозяев, известных в данной области техники, например, клеток-хозяев млекопитающих, клеток-хозяев бактерий, клеток-хозяев дрожжей, клеток-хозяев насекомых и т.д.

[0126] В настоящем изобретении дополнительно предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела, описанные в настоящем документе, например, полинуклеотиды, кодирующие переменные области или сегменты тяжелой или легкой цепи, содержащие определяющие комплементарность области, как описано в настоящем документе. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области тяжелой цепи, по меньшей мере на 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:22 или SEQ ID NO:31. В некоторых аспектах полинуклеотид, кодирующий переменные области легкой цепи, по меньшей мере на 85%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичен последовательности нуклеиновой кислоты с полинуклеотидом, выбранным из группы, состоящей из SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:24 или SEQ ID NO:33.

[0127] Полинуклеотиды по настоящему изобретению могут кодировать последовательность переменной области антитела к NKp30. Они также могут кодировать переменную область и константную область антитела. Некоторые из полинуклеотидных последовательностей кодируют полипептид, который содержит переменные области тяжелой цепи и легкой цепи одного из примерных антител к NKp30.

[0128] В настоящем изобретении также предложены экспрессионные векторы и клетки-хозяева для получения антител к NKp30. Выбор вектора экспрессии зависит от предполагаемых клеток-хозяев, в которые должен быть экспрессирован вектор. Как правило, экспрессионные векторы содержат промотор и другие регуляторные последовательности (например, энхансеры), которые функционально связаны с полинуклеотидами, кодирующими цепь антитела к NKp30 или антигенсвязывающий фрагмент. В некоторых аспектах, индуцируемый промотор используется для предотвращения экспрессии вставленных последовательностей, за исключением контроля

условий индукции. Индуцируемые промоторы включают, например, арабинозу, *lacZ* (ген лактозного оперона), промотор металлотионеина или промотор теплового шока. Культуры трансформированных организмов могут быть размножены в неиндуцирующих условиях без смещения популяции для кодирующих последовательностей, продукты экспрессии которых лучше переносятся клетками-хозяевами. В дополнение к промоторам, для эффективной экспрессии антитела к NKp30 или антигенсвязывающего фрагмента также могут потребоваться или могут быть необходимы другие регуляторные элементы. Данные элементы обычно включают кодон инициации ATG и прилежащий сайт связывания рибосом или другие последовательности. Кроме того, эффективность экспрессии может быть повышена за счет включения энхансеров, подходящих для используемой клеточной системы (см., например, Scharf и др., *Results Probl. Cell Differ.* 20:125, 1994; и Bittner и др., *Meth. Enzymol.*, 153: 516, 1987). Например, энхансер SV40 (вирус 40 обезьян) или энхансер CMV (цитомегаловирус) можно использовать для усиления экспрессии в клетках-хозяевах млекопитающих.

[0129] Клетки-хозяева для содержания и экспрессии цепей антитела к NKp30 могут быть прокариотическими или эукариотическими. *E.coli* представляет собой один из прокариотических хозяев, которые могут использоваться для клонирования и экспрессии полинуклеотидов по настоящему изобретению. Другие микробные хозяева, подходящие для использования, включают бациллы, такие как *Bacillus subtilis*, и другие энтеробактерии, такие как *Salmonella*, *Serratia* и различные виды *Pseudomonas*. В данных прокариотических хозяевах также можно создавать векторы экспрессии, которые обычно содержат последовательности контроля экспрессии, совместимые с клеткой-хозяином (например, точка начала репликации). Кроме того, может присутствовать любое количество различных известных промоторов, таких как лактозная промоторная система, триптофановая (*trp*) промоторная система, бета-лактамазная промоторная система или промоторная система фага лямбда. Промоторы обычно контролируют экспрессию, необязательно с помощью операторной последовательности и имеют последовательности сайтов связывания с рибосомами и тому подобное для инициирования и завершения транскрипции и трансляции. Другие микроорганизмы, такие как дрожжи, также могут быть использованы для экспрессии полипептидов к NKp30. Также могут быть использованы клетки насекомых в комбинации с векторами бакуловируса.

[0130] В других аспектах клетки-хозяева млекопитающих использованы для экспрессии и получения полипептидов к NKp30 по настоящему изобретению. Например, они могут представлять собой либо гибридную клеточную линию, экспрессирующую гены эндогенного иммуноглобулина, либо клеточную линию млекопитающего, несущую

экзогенный экспрессирующий вектор. К ним относятся любые нормальные мортальные или нормальные или аномальные иммортальные клетки животных или человека. Например, было разработано несколько подходящих линий клеток-хозяев, способных продуцировать интактные иммуноглобулины, включая клеточные линии СНО, различные клеточные линии COS (фибробластоподобные клетки, полученные из почечной ткани обезьяны.), клетки НЕК293 (линия эмбриональной почки человека 293), клеточные линии миеломы, трансформированные В-клетки и гибридомы. Использование культуры клеток ткани млекопитающих для экспрессии полипептидов обсуждалось в целом, например, Winnacker, *From Genes to Clones*, VCH Publishers, NY, N.Y., 1987. Векторы экспрессии для клеток-хозяев млекопитающих могут включать в себя последовательности контроля экспрессии, такие как точка начала репликации, промотор и энхансер (см. например, Queen, и др., *Immunol. Rev.* 89: 49-68, 1986) и необходимые сайты обработки информации, такие как сайты связывания рибосом, сайты сплайсинга РНК (рибонуклеиновая кислота), сайты полиаденилирования и последовательности терминатора транскрипции. Данные векторы экспрессии обычно содержат промоторы, полученные из генов млекопитающих или из вирусов млекопитающих. Подходящие промоторы могут быть конститутивными, специфичными для конкретного типа клеток, специфичными для стадии и/или модулируемыми или регулируемыми. Используемые промоторы включают, но не ограничиваются ими, промотор металлотионеина, конститутивный главный поздний промотор аденовируса, индуцируемый дексаметазоном промотор MMTV (вирус опухоли молочной железы мышей), промотор SV40, промотор MRP (процессинг митохондриальной РНК) polIII (полимераза III), конститутивный промотор MPSV (миелопролиферативный вирус саркомы мышей), индуцируемый тетрациклином промотор CMV (такой как человеческий средне-ранний промотор CMV), конститутивный промотор CMV и комбинации промотор-энхансер, известные в области техники.

Мультиспецифические антитела к NKp30

[0131] В одном варианте осуществления антитела к NKp30, описанные в настоящем документе, могут быть включены в мультиспецифическое антитело к NKp30×ТАА, где ТАА представляет собой любой антиген, ассоциированный с опухолью (ТАА) человека. Молекула антитела представляет собой мультиспецифическую молекулу антитела, например, она содержит ряд антигенсвязывающих доменов, где по меньшей мере одна последовательность антигенсвязывающего домена специфически связывает NKp30 в качестве первого эпитопа, а вторая последовательность антигенсвязывающего домена специфически связывает ТАА в качестве второго эпитопа. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело содержит третий, четвертый или пятый

антигенсвязывающий домен. В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело, триспецифическое антитело или тетраспецифическое антитело. В каждом примере мультиспецифическое антитело содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий домен к NKp30 и по меньшей мере один антигенсвязывающий домен к ТАА.

[0132] В одном варианте осуществления мультиспецифическое антитело представляет собой биспецифическое антитело. В настоящем документе биспецифическое антитело специфически связывает только с двумя антигенами. Биспецифическое антитело содержит первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает NKp30, и второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает ТАА. Оно включает биспецифическое антитело, содержащее вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, которые специфически связывают NKp30 в качестве первого эпитопа, и вариабельный домен тяжелой цепи и вариабельный домен легкой цепи, которые специфически связывают ТАА в качестве второго эпитопа. В другом варианте осуществления биспецифическое антитело содержит антигенсвязывающий фрагмент антитела, который специфически связывает NKp30, и антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывает ТАА. Биспецифическое антитело, которое содержит антигенсвязывающие фрагменты, причем антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой Fab, F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv (ScFv) или scFv.

[0133] Предшествующие эксперименты (Coloma b Morrison Nature Biotech. 15: 159-163 (1997)) описано четырехвалентное биспецифическое антитело, которое было сконструировано путем слияния ДНК, кодирующей одноцепочечное антитело Fv (scFv) к дансилу после С-конца (CH3-scFv) или после шарнира (шарнир-scFv) антитела IgG3 к дансилу. Настоящее изобретение относится к поливалентным антителам (например, четырехвалентным антителам) с по меньшей мере двумя антигенсвязывающими доменами, которые могут быть легко получены рекомбинантной экспрессией нуклеиновой кислоты, кодирующей полипептидные цепи антитела. Поливалентное антитело в настоящем документе содержит от трех до восьми, но предпочтительно четыре антигенсвязывающих домена, которые специфически связывают по меньшей мере два антигена.

[0134] Изобретение относится к биспецифическому четырехвалентному антителу, содержащему VD1-CL-(X1)_n-VD2-CH1-Fc или VD1-CH-(X1)_n-VD2-CL-Fc, где VD1 представляет собой первый вариабельный домен, VD2 представляет собой второй вариабельный домен, Fc представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, CH

или CL представляет собой константный тяжелый или константный легкий домен, и (X1)_n представляет собой линкер из по меньшей мере 2 аминокислот.

[0135] В одном варианте осуществления биспецифическое четырехвалентное антитело может представлять собой мультимер из четырех полипептидных цепей, причем каждая из двух тяжелых цепей содержит первый домен VH (VH1), первый домен CH1, второй домен VH (VH2), Fc-область, содержащую второй домен CH1, шарнир, CH2, CH3 и две легкие цепи, причем каждая легкая цепь содержит первый домен VL (VL1), первую область CL, второй домен VL (VL2) и вторую область CL. В другом варианте осуществления биспецифическое четырехвалентное антитело может содержать несколько Fab-фрагментов антитела, связанных вместе с одним Fc-доменом. Например, Fab1 может быть связан через полипептидный линкер с Fab2, который содержит домен CH1 одного из Fab, шарнирной области, а затем CH2 и CH3 Fc-домена. Например, Fab к ТАА может быть связан через линкер из домена CL Fab к ТАА с доменом VH Fab к Nkp30 и из домена CH1 Fab к Nkp30, шарнирной области, доменов CH2 и CH3. В другом примере Fab к Nkp30 может быть связан через линкер из домена CL Fab к Nkp30 с доменом VH Fab к ТАА и из домена CH1 Fab к ТАА, шарнирной области, доменов CH2 и CH3.

Линкеры

[0136] Также следует понимать, что домены и/или области полипептидных цепей биспецифического четырехвалентного антитела могут быть разделены линкерными областями различной длины. В некоторых вариантах осуществления эпитоп-связывающие домены отделены друг от друга, CL, CH1, шарниром, CH2, CH3 или всей Fc-областью линкерной области. Например, VL1-CL-(линкер) VH2-CH1. Такая линкерная область может содержать случайный набор аминокислот или ограниченный набор аминокислот. Такие линкерные области могут быть гибкими или жесткими (см. US2009/0155275).

[0137] Мультиспецифические антитела были сконструированы путем генетического слияния двух одноцепочечных фрагментов Fv (scFv) или Fab с использованием или без использования гибких линкеров (Mallender и др., J. Biol. Chem. 1994 269:199-206; Macket и др., Proc. Natl. Acad. Sci. США. 1995 92:7021-5; Zapata Protein Eng. 1995 8:1057-62), с помощью устройства димеризации, такого как лейциновая застежка-молния (Kostelny и др., J. Immunol. 1992 148:1547-53; de Kruif et al. J. Biol. Chem. 1996 271:7630-4) и домены Ig C/CH1 (Muller и др., FEBS Lett. 422:259-64); диателом (Holliger и др., (1993) Proc. Nat. Acad. Sci. США. 1998 90:6444-8; Zhu и др., Bio/Technology (NY) 1996 14:192-6); слияние Fab-scFv (Schoonjans и др., J. Immunol. 2000 165:7050-7); и форматы мини-антител (Packi и др., Biochemistry 1992 31:1579-84; Packet и др., Bio/Technology 1993 11:1271-7).

[0138] Биспецифические четырехвалентные антитела, описанные в настоящем документе, содержат линкерную область из по меньшей мере 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75 или более аминокислотных остатков между одним или более из его эпитоп-связывающих доменов, доменов CL, доменов CH1, шарнирной области, доменов CH2, доменов CH3 или областей Fc. В некоторых вариантах осуществления аминокислоты глицин и серин содержат аминокислоты в линкерной области. В другом варианте реализации изобретения линкер может представлять собой GS (SEQ ID NO:43), GGS (SEQ ID NO:44), GSG (SEQ ID NO:45), SGG (SEQ ID NO:46), GGG (SEQ ID NO:47), GGS (SEQ ID NO:48), SGGG (SEQ ID NO:49), GGGGS (SEQ ID NO:50), GGGGSGS (SEQ ID NO:51), GGGGSGS (SEQ ID NO:52), GGGGSGGS (SEQ ID NO:53), GGGGSGGGGS (SEQ ID NO:54), GGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO:55), AKTTPKLEEGEFSEAR (SEQ ID NO:56), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:57), AKTTPKLGG (SEQ ID NO:58), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:59), AKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:60), SAKTTP (SEQ ID NO:61), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:62), RADAAP (SEQ ID NO:63), RADAAPTVS (SEQ ID NO:64), RADAAAAGGPGS (SEQ ID NO:65), RADAAAA(G₄S)₄ (SEQ ID NO:66), SAKTTP (SEQ ID NO:67), SAKTTPKLGG (SEQ ID NO:68), SAKTTPKLEEGEFSEARV (SEQ ID NO:69), ADAAP (SEQ ID NO:70), ADAAPTVSIFPP (SEQ ID NO:71), TVAAP (SEQ ID NO:72), TVAAPSVFIFPP (SEQ ID NO:73), QPKAAP (SEQ ID NO:74), QPKAAPSVTLFPP (SEQ ID NO:75), AKTTPP (SEQ ID NO:76), AKTTPPSVTPLAP (SEQ ID NO:77), AKTTAP (SEQ ID NO:78), AKTTAPSVYPLAP (SEQ ID NO:79), ASTKGP (SEQ ID NO:80), ASTKGPSVFPLAP (SEQ ID NO:81), GENKVEYAPALMALS (SEQ ID NO:82), GPAKELTPLKEAKVS (SEQ ID NO:83), и GHEAAAVMQVQYPAS (SEQ ID NO:84) или любую их комбинацию (см. WO2007/024715). Например, GGGGS (SEQ ID NO:50) можно комбинировать с SAKTTP (SEQ ID NO:67) с образованием GGGGSSAKTTP (SEQ ID NO:85).

Аминокислоты, специфичные для димеризации

[0139] В одном варианте осуществления полиспецифическое антитело содержит по меньшей мере одно специфическое для димеризации аминокислотное изменение. Специфические для димеризации аминокислотные изменения приводят к взаимодействию «выступ-в-отверстие» и увеличивают сборку правильных полиспецифических антител. Аминокислоты, специфичные для димеризации, могут находиться в пределах домена CH1 или домена CL или их комбинаций. Специфические для димеризации аминокислоты, используемые для спаривания доменов CH1 с другими доменами CH1 (CH1-CH1) и доменов CL с другими доменами CL (CL-CL), и можно найти по меньшей мере в заявках

WO2014082179, WO2015181805 и WO2017059551. Специфические для димеризации аминокислоты также могут находиться в пределах домена Fc и могут быть в комбинации со специфическими для димеризации аминокислотами в доменах CH1 или CL.

Способы обнаружения и диагностики

[0140] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению пригодны для различных применений, включая, но не ограничиваясь ими, способы обнаружения NKp30. В одном аспекте антитела или антигенсвязывающие фрагменты пригодны для обнаружения присутствия NKp30 в биологическом образце. В настоящем документе термин «обнаружение» включает количественное или качественное обнаружение. В некоторых аспектах биологический образец включает клетку или ткань. В других аспектах, такие ткани включают нормальные и/или раковые ткани, которые экспрессируют NKp30 на более высоких уровнях по сравнению с другими тканями.

[0141] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу обнаружения присутствия NKp30 в биологическом образце. В некоторых аспектах, способ включает приведение биологического образца в контакт с антителом к NKp30 в условиях, допускающих связывание антитела с антигеном, и обнаружение образования комплекса между антителом и антигеном. Биологический образец может включать, без ограничения, образцы мочи, ткани, мокроты или крови.

[0142] Также включен способ диагностики расстройства, связанного с экспрессией NKp30. В некоторых аспектах, способ включает приведение тестируемой клетки в контакт с антителом к NKp30; определение уровня экспрессии (количественно или качественно) NKp30 в тестируемой клетке путем обнаружения связывания антитела к NKp30 с полипептидом NKp30; и сравнение уровня экспрессии в тестируемой клетке с уровнем экспрессии NKp30 в контрольной клетке (например, нормальной клетке того же тканевого происхождения, что и тестируемая клетка или клетка, не экспрессирующая NKp30), где более высокий уровень экспрессии NKp30 в тестируемой клетке по сравнению с контрольной клеткой указывает на наличие нарушения, связанного с экспрессией NKp30.

Способы лечения

[0143] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты согласно настоящему изобретению пригодны для различных применений, включая, но не ограничиваясь ими, способы лечения расстройства или заболевания, ассоциированного с NKp30. В одном аспекте, расстройство или заболевание, ассоциированное с NKp30 представляет собой рак. В случае мультиспецифического антитела к NKp30×TAA рак может быть

специфичным к ТАА, при этом NKp30 действует для рекрутирования NK-клеток в опухоль, экспрессирующую ТАА.

[0144] В одном аспекте, настоящее изобретение относится к способу лечения рака. В некоторых аспектах способ включает введение нуждающемуся пациенту эффективного количества антитела к NKp30, антигенсвязывающего фрагмента или NKp30, содержащего мультиспецифическое антитело. Способ, где рак представляет собой, без ограничения, рак желудка, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому и саркому.

[0145] Антитело или антигенсвязывающий фрагмент, как раскрыто в настоящем документе, можно вводить любыми подходящими способами, включая парентеральное, внутрилегочное и интраназальное введение, и, при необходимости для местного лечения, внутриочагового или внутриопухелевого введения. Парентеральные инфузии включают внутримышечное, внутривенное, внутриартериальное, внутрибрюшинное или подкожное введение. Введение дозы может быть осуществлено любым пригодным способом, например, с помощью инъекций, таких как внутривенные или подкожные инъекции, частично в зависимости от того, является ли введение кратковременным или длительным. В настоящем документе рассмотрены различные схемы введения доз, включая, без ограничений, одно или множество введений в различные моменты времени, болюсное введение и пульс-терапию.

[0146] Антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению будут составлены, дозированы и введены в соответствии с надлежащей медицинской практикой. Факторы, которые следует учитывать в данном контексте, включают конкретное заболевание, подлежащее лечению, конкретное млекопитающее, подлежащее лечению, клиническое состояние отдельного пациента, причину заболевания, область доставки лекарственного агента, способ введения, схему введения и другие факторы, известные врачам-практикам. Антитело необязательно должно быть, но необязательно составлено с одним или более агентами, используемыми в настоящее время для предотвращения или лечения рассматриваемого расстройства. Эффективное количество таких других агентов зависит от количества антитела или иммуноконъюгата, присутствующего в составе, типа расстройства или лечения и других факторов, описанных выше. Как правило их применяют в такой же дозировке и посредством того же способа введения, как описано в настоящем документе, или в дозировке, составляющей от около 1 до 99% количества доз, описанных в настоящем документе, или в любой

дозировке и посредством любого способа введения, эмпирически/клинически считающихся подходящими.

[0147] Для предотвращения или лечения заболевания подходящая доза антитела, антигенсвязывающего фрагмента или мультиспецифического антитела согласно настоящему изобретению будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, типа антитела, тяжести и течения заболевания, введения антитела в профилактических или терапевтических целях, предшествующей терапии, клинического анамнеза пациента и ответа на антитело и усмотрения лечащего врача. Антитело соответствующим образом вводили пациенту однократно или в ходе серии сеансов лечения. В зависимости от типа и тяжести заболевания от около 1 до 100 мг/кг антитела является рассматриваемой начальной дозой для введения пациенту, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Типичная ежедневная доза может находиться в диапазоне от приблизительно 1 до 100 мг/кг или более в зависимости от вышеупомянутых факторов. При повторном введении в течение нескольких дней или более, в зависимости от состояния, лечение обычно следует продолжать до желаемого подавления симптомов заболевания. Такие дозы можно вводить с перерывами, например, каждую неделю или каждые три недели (например, таким образом, что пациент получает от приблизительно двух до приблизительно двадцати введений). Можно вводить начальную высокую нагрузочную дозу, за которой следует одна или более пониженные дозы. Однако могут быть пригодны и другие схемы дозирования, и прогресс терапии легко отслеживается с помощью обычных методик и анализов.

Комбинированная терапия

[0148] В одном аспекте антитела к NKp30, антигенсвязывающие фрагменты или мультиспецифические антитела по настоящему изобретению могут быть использованы в комбинации с другими терапевтическими агентами. Другие терапевтические агенты, которые могут быть использованы с антителами к NKp30 по настоящему изобретению, включают: но не ограничиваются ими, химиотерапевтический агент (например, паклитаксел или агент на основе паклитаксела; (например, Abraxane®), доцетаксел, карбоплатин, топотекан, цисплатин, иринотекан, доксорубицин, леналидомид, 5-азациитидин, ифосфамид, оксалиплатин, пеметрексед динатрий, циклофосфамид, этопозид, децитабин, флударабин, винкристин, бендамустин, хлорамбуцил, бусульфан, гемцитабин, мелфалан, пентостатин, митоксантрон, пеметрексед динатрий), ингибитор тирозинкиназы (например, ингибитор EGFR (рецептор эпидермального фактора роста) (например, эрлотиниб), ингибитор мультикиназы (например, MGCD265, RGB-286638), агент, направленный на CD-20 (например, ритуксимаб, офатумумаб, RO5072759, LFB-R603),

агент, направленный на CD52 (например, алемтузумаб), преднизолон, дарбэпоэтин альфа, леналидомид, ингибитор Bcl-2 (В-клеточная лимфома 2) (например, облимерсен натрия), ингибитор аврора-киназы (например, MLN8237, TAK-901), ингибитор протеасом (например, бортезомиб), агент, направленный на CD-19 (например, MEDI-551, MOR208), ингибитор MEK (киназа митоген-активируемой протеинкиназы) (например, ABT-348), ингибитор JAK-2 (янус-киназа 2) (например, INCB018424), ингибитор mTOR (мишень рапамицина млекопитающих) (например, темсиролимус, эверолимус), ингибитор BCR/ABL (например, иматиниб), антагонист рецептора ET-A (эндотелин) (например, ZD4054), агонист рецептора 2 TRAIL (индуцирующий апоптоз лиганд, связанный с TNF) (TR-2) (например, CS-1008), EGEN-001, ингибитор Polo-подобной киназы 1 (например, BI 672).

Фармацевтические композиции и препараты

[0149] Также предложены композиции, включая фармацевтические препараты, содержащие антитело к NKp30 или его антигенсвязывающий фрагмент, или полинуклеотиды, содержащие последовательности, кодирующие антитело или антигенсвязывающий фрагмент к NKp30. В некоторых вариантах осуществления изобретения композиции содержат одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с NKp30, или один или более полинуклеотидов, содержащих последовательности, кодирующие одно или более антител или антигенсвязывающих фрагментов, которые связываются с NKp30. Данные композиции могут дополнительно содержать подходящие носители, такие как фармацевтически приемлемые эксципиенты, включая буферы, которые хорошо известны в данной области техники.

[0150] Фармацевтические препараты антитела к NKp30 или антигенсвязывающего фрагмента, как описано в настоящем документе, получали путем смешивания такого антитела или антигенсвязывающего фрагмента, имеющего желаемую степень чистоты, с одним или более необязательными фармацевтически приемлемыми носителями (Remington 's Pharmaceutical Sciences 16-е издание, Osol, A. Ed. (1980)) в форме лиофилизированных препаратов или водных растворов. Фармацевтически приемлемые носители обычно являются нетоксичными для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях, и включают, без ограничений: буферы, такие как фосфат, цитрат и другие органические соли; антиоксиданты, включая аскорбиновую кислоту и метионин; консерванты (например, хлорид октадецилдиметилбензиламмония; хлорид гексаметония; хлорид бензалкония; хлорид бензэтония; фенол; бутиловый или бензиловый спирт; алкилпарабены, такие как метил- или пропилпарабен; катехол; резорцин; циклогексанол;

3-пентанол; и м-крезол); низкомолекулярные (содержащие менее 10 остатков) полипептиды; белки, такие как сывороточный альбумин, желатин или иммуноглобулины; гидрофильные полимеры, такие как поливинилпирролидон; аминокислоты, такие как глицин, глутамин, аспарагин, гистидин, аргинин или лизин; моносахариды, дисахариды и другие углеводы, включая глюкозу, маннозу или декстрины; хелатирующие агенты, такие как EDTA (этилендиаминтетрауксусная кислота); сахара, такие как сахароза, маннит, трегалоза или сорбит; солеобразующие противоионы, такие как натрий; металлокомплексы (например, комплексы цинк-белок) и/или неионогенные поверхностно-активные вещества, например, полиэтиленгликоль (PEG). Примеры фармацевтически приемлемых носителей в настоящей заявке дополнительно включают агенты для диспергирования лекарственных средств в межклеточном пространстве, например, растворимые нейтрально-активные гликопротеины гиалуронидазы (sHASEGP), например, растворимые гликопротеины PH-20 гиалуронидазы человека, например, rHuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Некоторые примерные sHASEGP и способы применения, включая rHuPH20, описаны в патентах США № США 7871607 и 2006/0104968. В одном из аспектов sHASEGP комбинировали с одним или более дополнительными гликозаминогликаназами, например, хондроитиназами.

[0151] Примерные лиофилизированные препараты на основе антитела описаны в патенте США № 6267958. Водные препараты на основе антитела включают препараты, описанные в патенте США № 6171586 и WO2006/044908, причем последние препараты содержат гистидин-ацетатный буфер. Могут быть получены препараты с замедленным высвобождением. Подходящие примеры препаратов замедленного высвобождения включают полупроницаемые матрицы твердых гидрофобных полимеров, содержащих антитело, причем матрицы находятся в форме формованных изделий, например пленок или микрокапсул. Препараты для введения *in vivo* обычно являются стерильными. Стерильность может быть легко достигнута, например, путем фильтрации через стерильные фильтрующие мембраны.

ПРИМЕРЫ

Пример 1 Получение моноклонального антитела к NKp30

[0152] Моноклональные антитела (mAbs) к NKp30 получали на основе общепринятой технологии слияния гибридом (de St Groth и Sheidegger, 1980 J Immunol Methods 35:1; Mechetner, 2007 Methods Mol Biol 378:1). MAbsc высокой связывающей активностью при твердофазном иммуноферментном анализе (ELISA) и анализе путем сортировки флуоресцентно-активированных клеток (FACS) отбирали для дальнейшей характеристики.

Рекомбинантный белок NKp30 для анализа иммунизации и связывания

[0153] Кодирование кДНК для полноразмерного NKp30 человека (SEQ ID NO:1) было приобретено у Sino Biological (Пекин, Китай) на основе его последовательности GenBank (регистрационный номер: NM_147130.1). Кодировующую область внеклеточного домена (ECD) полноразмерного NKp30 человека, соответствующую аминокислоте (AA) 19-135 SEQ ID NO: 1, амплифицировали с помощью PCR (полимеразная цепная реакция) и клонировали в экспрессионный вектор на основе pcDNA3.1 (Invitrogen, Carlsbad, Калифорния, США) с С-концом, слитым либо с Fc-доменом IgG2a мыши, или с Fc доменом тяжелой цепи IgG1 человека, что привело к получению двух плазмид для экспрессии рекомбинантных слитых белков, NKp30-mIgG2a и NKp30-huIgG1, соответственно. Схематическое представление слитых белков NKp30 показано на фиг. 1. Для получения рекомбинантного слитого белка плазмиды NKp30-mIgG2a и NKp30-huIgG1 временно трансфицировали в клетки 293G (разработанные собственными силами) и культивировали в течение 7 дней в CO₂-инкубаторе, оснащенный вращающимся шейкером. Супернатант, содержащий рекомбинантный белок, собирали и очищали путем центрифугирования. NKp30-mIgG2a и NKp30-huIgG1 очищали с использованием колонки с белком А (кат. № 17127901, GE Life Sciences). Белки NKp30-mIgG2a и NKp30-huIgG1 диализировали против фосфатно-солевого буферного раствора (DPBS) и хранили в морозильной камере при -80 °C в небольших аликвотах.

Стабильные экспрессионные клеточные линии

[0154] Для установления стабильных клеточных линий, которые экспрессируют полноразмерный человеческий NKp30 (huNKp30) или *Macaca fascicularis* NKp30 (mkNKp30, регистрационный номер: AJ278389.1 (SEQ ID NO:42), приобретенный у Sino Biological, Китай), клонировали в ретровирусный вектор pFB-Neo (кат. № 217561, Agilent, США). Ретровирусные векторы с двойной тропностью были получены в соответствии с предыдущим протоколом (Zhang, и др., 2005 Blood 106, 1544-1551). Векторы, содержащие huNKp30 и mkNKp30, трансдуцировали в клетки NK92MI (ATCC, Манассас, Вирджиния, США), соответственно, для получения клеточных линий NK92MI/huNKp30 и NK92MI/mkNKp30. Линии клеток с высокой экспрессией отбирали путем культивирования в среде с G418 и путем анализа связывания FACS.

Иммунизация, слияние гибридом и клонирование

[0155] Мышей возрастом восемь-двенадцать недель породы Balb/c (от HFK BIOSCIENCE CO., LTD, Пекин, Китай) иммунизировали внутрибрюшинно (в/б) 100 мкл смеси антигенов, содержащей 10 мкг NKp30-mIgG2a и водорастворимый адъювант (кат. № KX0210041, KangBiQuan, Пекин, Китай). Процедуру повторяли спустя три недели.

Через две недели после 2^{-й} иммунизации сыворотки мышей оценивали на связывание NKp30 с помощью ELISA и FACS. Через десять дней после скрининга сыворотки мышей с самыми высокими титрами антител к NKp30 стимулировали путем внутривентральной инъекции 50 мкг NKp30-mIgG2a. Через три дня после бустинга спленоциты выделяли и сливали с линией клеток миеломы мыши, клетками SP2/0 (ATCC), используя стандартные методы (Geffer и др., Somat Cell Genet, 1977 3(2):231-6).

Анализ NKp30-связывающей активности антител с помощью ELISA и FACS

[0156] Супернатанты клонов гибридомы первоначально подвергали скринингу с помощью модифицированного ELISA с использованием базовой методики, описанной в (Methods in Molecular Biology (2007) 378:33-52). Белок NKp30-huIgG1 покрывали в 96-луночных планшетах. HRP-связанное (HRP - пероксидаза хрена) антитело к IgG мыши (кат. № 7076S, Cell Signaling Technology, США) и субстрат (кат. № 00-4201-56, eBioscience, США) использовали для разработки сигнала цветового поглощения при длине волны 450 нм, который измеряли с помощью планшет-ридера (SpectraMax Paradigm™, Molecular Devices, США). ELISA-положительные клоны дополнительно верифицировали с помощью FACS с использованием клеток NK92MI/huNKp30 или NK92mi/mkNKp30, описанных выше. NKp30-экспрессирующие клетки (10^5 клеток/лунку) инкубировали с ELISA-положительными супернатантами гибридомы с последующим связыванием с козым антителом к IgG мыши, меченным Alexa Fluoro-647 (кат. № A0473, Beyotime Biotechnology, Китай). Клеточную флуоресценцию количественно определяли с использованием проточного цитометра (Guava easyCyte™ 8HT, Merck-Millipore, США).

[0157] Кондиционированные среды из гибридом, которые демонстрировали положительные сигналы при скрининге ELISA и FACS, подвергали функциональным анализам для идентификации антител с хорошей функциональной активностью в анализах на основе иммунных клеток человека (см. следующие разделы). Антитела с желательной функциональной активностью дополнительно субклонировали и характеризовали.

Субклонирование и адаптация гибридом к бессывороточной или низкосывороточной среде

[0158] После первичного скрининга с помощью ELISA, FACS и функциональных анализов, как описано выше, положительные клоны гибридомы субклонировали ограничивающим разведением. Отбирали три положительных субклона на основе ELISA и скрининга FACS из каждого планшета и характеризовали их функциональными анализами. Верхние субклоны антител, проверенные с помощью функциональных анализов, были адаптированы для роста в среде CDM4MAb (кат. № SH30801.02, Hyclone, США) с 3% FBS (фетальная бычья сыворотка).

Экспрессия и очистка моноклональных антител

[0159] Клетки гибридомы или клетки 293G, временно трансфицированные плазмидой экспрессии антител (кат. № R79007, Invitrogen) культивировали в среде CDM4MAb (кат. № SH30801.02, Hyclone) или в экспрессионной среде Freestyle™ 293 (кат. № 12338018, Invitrogen) и инкубировали в инкубаторе CO₂ в течение 5-7 дней при 37 °C. Кондиционированную среду собирали путем центрифугирования и фильтровали, пропуская мембрану 0,22 мкм перед очисткой. Мышиные или рекомбинантные антитела, содержащие супернатанты, наносили и связывали с колонкой с белком А (кат. № 17127901, GE Life Sciences) в соответствии с руководством производителя. В результате этой процедуры были получены антитела с уровнем чистоты выше 90%. Аффинно очищенные антитела к белку А либо диализировали против PBS (фосфатно-солевой буферный раствор), либо дополнительно очищали с использованием колонки HiLoad 16/60 Superdex200™ (кат. № 17531801, GE Life Sciences) для удаления агрегатов. Концентрации белка определяли путем измерения оптической плотности при 280 нм. Итоговые препараты антител хранили аликвотами в морозильной камере с температурой -80 °C.

Пример 2 Клонирование и анализ последовательности антител к NKp30

[0160] Клоны мышинной гибридомы собирали для получения общих клеточных РНК с использованием набора Ultrapure RNA (кат. № 74104, QIAGEN, Германия) на основании инструкции производителя. 1^{-я} цепь кДНК была синтезирована с использованием набора для синтеза кДНК от Invitrogen (кат. № 18080-051) и PCR-амплификацию нуклеотидных последовательностей, кодирующих вариабельную область тяжелой цепи (VH) и вариабельную область легкой цепи (VL) мышинных mAb, проводили с использованием набора для PCR (кат. № CW0686, CWBio, Пекин, Китай). Олигопраймеры, используемые для клонирования кДНК антител VH и VL, синтезировали Invitrogen (Пекин, Китай) на основе последовательностей, описанных ранее (Brocks и др., 2001 Mol Med 7:461). Продукты PCR затем субклонировали в вектор клонирования pEASY-Blunt (кат. № C B101-02, TransGen, Китай) и секвенировано Genewiz (Пекин, Китай). Аминокислотные последовательности областей VH и VL были выведены из результатов секвенирования ДНК.

[0161] MAb мыши анализировали путем сравнения гомологии последовательностей и группировали на основе сходства последовательностей, как показано на фиг. 2. Определяющие комплементарность области (CDR) были определены по Кабату (Wu и Kabat 1970 J. Exp. Med. 132:211-250) и систему IMGT (Lefranc 1999 Nucleic Acids Research 27:209-212) посредством аннотации последовательности и анализа

последовательности. Аминокислотные последовательности репрезентативного лучшего клона (mu183) перечислены в таблице 1 выше.

Пример 3 Определение аффинности очищенных антител мыши к NKp30 с помощью SPR

[0162] Антитела к NKp30 с высокой связывающей активностью в ELISA и FACS, а также с сильной функциональной активностью в клеточных анализах (описанных в Примере 1 выше) были охарактеризованы по их кинетике связывания с помощью SPR анализов с использованием BIAcore™ T-200 (GE Life Sciences). Вкратце, антитело к IgG мыши иммобилизовали на активированном чипе биосенсора CM5 (кат. №: BR100530, GE Life Sciences). Очищенные мышинные антитела к NKp30 пропускали по поверхности чипа и захватывали антителом к IgG мыши. Затем серийное разведение (от 0,098 нМ до 25 нМ) His-меченого NKp30 человека пропускали по поверхности чипа и анализировали изменения сигналов поверхностного плазмонного резонанса для расчета скорости ассоциации (k_{on}) и скорости диссоциации (k_{off}) с использованием модели связывания «один-к-одному» Langmuir (BIA Evaluation Software, GE Life Sciences). Равновесную константу диссоциации (K_D) рассчитывали как отношение k_{off}/k_{on} . Профили аффинности связывания выбранных антител, включая mu183, mu17 и mu191, показаны на фиг. 3 и в таблице 3.

Таблица 3. Аффинность связывания гибридомы антител с помощью SPR

Антитела	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
mu183	$1,59 \times 10^6$	$2,10 \times 10^{-4}$	0,132
mu17	$1,42 \times 10^6$	$1,23 \times 10^{-3}$	0,977
mu191	$8,49 \times 10^5$	$5,07 \times 10^{-4}$	0,597

Пример 4 Гуманизация мышинового mAb mu183 к NKp30 человека

Гуманизация и конструирование mAb

[0163] Для гуманизации mu183, гены IgG зародышевой линии человека проводили поиск последовательности, которые имеют высокую степень гомологии с последовательностями кДНК вариабельных областей mu183, выполняя алгоритм BLAST в базах данных генов иммуноглобулина человека в IMGT и NCBI. В качестве матриц для гуманизации были выбраны гены IG VH (вариабельная область тяжелой цепи иммуноглобулина) и IG VL (вариабельная область легкой цепи иммуноглобулина)

человека, которые присутствуют в спектре антител человека с высокой частотой (Glanville и др., 2009 PNAS 106:20216-20221) и в высокой степени гомологичны mu183.

[0164] Гуманизацию проводили с помощью CDR-прививки (Methods in Molecular Biology, Vol 248: Antibody Engineering, Methods b Protocols, Humana Press), а гуманизированные антитела (BGA1831-BGA1833) конструировали в формате IgG1mf человека (SEQ ID NO:41) с использованием разработанного собственными силами экспрессионного вектора. На начальном этапе гуманизации мутации аминокислотных остатков, относящиеся к мышам в относящиеся к человеку в каркасных областях определяли с помощью смоделированной 3D-структуры, а остатки, относящиеся к каркасу мыши, имеющие структурное значение для поддержания канонических структур CDR, сохраняли в первоначально гуманизированном антителе BGA1831 (SEQ ID NO:3-8). В частности, CDR (SEQ ID NO:3-5) VH mu183 прививали в каркас варибельного гена зародышевой линии человека IG VH1-46 с 9 сохраненными каркасными остатками, относящимися мыши (V₁₀, V₁₂, T₃₀, A₃₇, I₄₈, A₆₈, L₇₀, V₇₂ и A₇₉) (SEQ ID NO:11). CDR VL mu183 (SEQ ID NO: 6-8) прививали в каркас варибельного гена зародышевой линии человека IGVL 1-39 с 5 остатками, относящимися к каркасу мыши (Q₁, V₃, L₄, S₄₃ и F₇₃), сохраняли (SEQ ID NO:13).

[0165] BGA1831 был сконструирован в формате полноразмерного антитела человека с использованием разработанных собственными силами экспрессионных векторов, которые содержат константные области варианта IgG1 человека, называемого IgG1mf (SEQ ID NO: 41), и легкую цепь, соответственно, с легкими адаптирующими сайтами субклонирования. Экспрессию и получение антитела BGA1831 достигали путем совместной трансфекции двух вышеуказанных конструкций в клетки 293G и очистки с использованием колонки с белком А (кат. № 17543802, GE Life Sciences). Очищенные антитела концентрировали до 0,5-5 мг/мл в PBS и хранили в аликвотах в морозильной камере при -80 °C.

[0166] В BGA1831 было внесено несколько односайтовых аминокислотных изменений, преобразующих удерживаемые остатки, относящиеся к мыши в каркасной области VL в соответствующие остатки, относящиеся к зародышевой линии человека. Полученные гуманизированные версии имели одинаковую связывающую и функциональную активность. Все мутации гуманизации были совершены с использованием праймеров, содержащих мутации в определенных положениях, и набора для сайт-специфического мутагенеза (кат. № FM111-02, TransGen, Пекин, Китай). Желаемые мутации проверяли с помощью анализа секвенирования, а варианты антител тестировали в анализах связывания и функциональных анализах, как описано ранее.

[0167] Другие антитела дополнительно конструировали путем введения мутаций в CDR и каркасные области для улучшения молекулярных и биофизических свойств для терапевтического применения у человека. Признаки включают аминокислотные составы, такие как термостабильность (T_m), поверхностную гидрофобность и изоэлектронные точки (pI) при сохранении функциональной активности.

[0168] Дополнительные сконструированные варианты гуманизированных моноклональных антител были получены из процесса мутации, описанного выше и подробно описанного. Анализ сконструированных антител показал, что как BGA1832 (SEQ ID NO:19, 4, 20, 6-8), так и BGA1831 (SEQ ID NO: 3-8) были очень похожи по аффинности связывания и функциональной активности, такой как индуцирование NKp30-опосредованной нисходящей сигнализации. Аффинность сконструированных антител была настроена на необходимую аффинность в ходе этого процесса, поскольку это привело к тому, что BGA1833 (SEQ ID NO:19, 4, 29, 6-8) имеет примерно в 10 раз меньшую аффинность, чем у исходного антитела. Для определения аффинности антитела захватывали поверхностью к Fc человека и использовали в анализе аффинности на основе технологии поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Результаты SPR-детерминированных профилей связывания антител к NKp30 обобщены в таблице 4. Все гуманизированные антитела, показанные выше, также были подтверждены для функциональной активности на первичных иммунных клетках человека, выделенных от здоровых доноров (описано в примере 7 ниже).

Таблица 4. Сравнение аффинностей связывания антител с помощью SPR

Антитело к NKp30	Кинетические параметры		
	k_{on} ($M^{-1}s^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})	K_D (нМ)
ch183*	$2,22 \times 10^6$	$3,18 \times 10^{-4}$	0,143
BGA1831	$1,91 \times 10^6$	$3,77 \times 10^{-4}$	0,198
BGA1832	$1,55 \times 10^6$	$3,31 \times 10^{-4}$	0,213
BGA1833	$1,45 \times 10^6$	$2,78 \times 10^{-3}$	1,92

*ch183 состоит из переменных доменов mu183, слитых с константными областями IgG1mf/каппа человека

Пример 5 Активности связывания различных вариантов антител к NKp30 с нативным NKp30

[0169] Для оценки активности связывания антител к NKp30 с нативным NKp30 на живых клетках клетки NK92MI трансфицировали для сверхэкспрессии NKp30 человека.

Живые клетки, экспрессирующие NK92mi/NKp30, высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали с серийным разведением антител к NKp30. Антитела козы к IgG человека использовали в качестве вторичного антитела для обнаружения связывания антитела с поверхностью клетки. Значения EC_{50} (средняя эффективная концентрация) для дозозависимого связывания с нативным NKp30 человека определяли путем сопоставления данных доза-ответ к четырехпараметрической логистической модели с помощью GraphPad Prism™. Как показано на фиг. 6 и в таблице 6, оба гуманизированных антитела BGA1831 и BGA1833 к NKp30 продемонстрировали высокую аффинность связывания с нативным NKp30 на живых клетках.

Таблица 6. EC_{50} дозозависимого связывания гуманизированных сконструированных антител с нативным NKp30

Антитела	EC_{50} (нМ)
Ch183	1,55
BGA1831	1,26
BGA1833	1,31

Пример 6 Картирование эпитопа BGA1833

[0170] Чтобы охарактеризовать связывающий эпитоп BGA1833, 10 аминокислотных остатков NKp30 подвергались мутации в аланин по отдельности с получением 10 вариантов NKp30 с односайтовой мутацией на основе информации из кристаллической структуры NKp30, описанной ранее (Li и др., J Exp Med. 2011 208: 703–714). Мутантные белки NKp30 вместе с белком NKp30 дикого типа анализировали на их распознавание и связывание с BGA1833. Другое гуманизированное антитело BGA1913 к NKp30 также анализировали в том же анализе ELISA для сравнения. В этом анализе 50 нг каждого из NKp30-Fc дикого типа или мутантного типа наносили на планшет для ELISA. После блокирования 100 мкл антитела BGA1833 или BGA1913 в концентрации 20 нМ добавляли к планшету и сигнал связывания каждого антитела обнаруживали с помощью HRP-связанного вторичного антитела. Все результаты ELISA были нормализованы с использованием средних значений показаний ELISA сигнала связывания NKp30-Fc дикого типа в качестве стандарта. Для упрощения анализа данных, если сигнал связывания ELISA антитела для конкретного мутантного NKp30 упал до 25% или ниже, то аминокислота в этом сайте считалась критической для эпитопа. В анализе связывания ELISA с использованием NKp30 дикого типа или мутантного NKp30 аминокислоты I50A и L86A (пронумерованные от аминокислоты 1 дикого типа NKp30) значительно нарушали

связывание NKp30 и BGA1833 (фиг. 7A). Напротив, ни изменения I50A, ни изменения L86A не нарушали связывание антитела BGA1913 с NKp30, что указывает на то, что BGA1913 и BGA1833 имеют разные эпитопы. Эти данные указывают на то, что I50 и L86 являются критическими аминокислотами в эпитопе для антитела BGA1833. Молекулярное моделирование NKp30 в комплексе с B7H6, показанное на фиг. 7B, показывает, что когда в сложенной конформации, L86 и I50 находятся рядом друг с другом на поверхности связывания NKp30 и B7H6.

Пример 7 Антитела к NKp30 снижают взаимодействие NKp30 с его лигандом B7-H6

[0171] NKp30 связывается со своим основным лигандом B7-H6 со слабой аффинностью при приблизительно K_d 2,5-3,5 мкМ. (Joyce и др., 2011 PNAS 108:6223-6228). Результаты картирования эпитопов в Примере 6 выше показывают, что аминокислотные остатки I50 и L86 NKp30 являются критическими аминокислотными остатками, которые составляют часть эпитопа для антитела BGA1833. Кроме того, эти два остатка ранее были определены как важные для взаимодействия NKp30/B7-H6 в структурном исследовании (Li и др., J Exp Med. 2011 208: 703–714). На основании этих данных была выдвинута гипотеза, что антитело BGA1833 может блокировать взаимодействие NKp30/B7-H6. Для этого анализа стабильно трансдуцированную клеточную линию B7-H6 HCT116/B7-H6 инкубировали с NKp30-mIgG2a в присутствии серийно разведенного BGA1833 с последующим обнаружением с помощью козьего антитела к IgG-APC человека. Как показано на фиг. 8, антитело BGA1833 может конкурентно блокировать взаимодействие NKp30/B7-H6 дозозависимым образом.

Пример 8 Активация линии NKp30⁺ NK-клеток NK92MI/NKp30 антителами к NKp30

[0172] Функциональную активность антитела BGA1833 сначала оценивали путем совместного культивирования NK92MI/NKp30 с клетками FcγR⁺ THP-1 в течение ночи. Продукция IFN-γ использовали в качестве результата. В качестве отрицательного контроля использовали только IgG человека и среду. Как показано на фиг. 9A, BGA1833 индуцировал секрецию клеток NK92MI/NKp30 IFN-γ в присутствии клеток THP-1 дозозависимым образом (EC_{50} : 0,0049 мкг/мл). Далее, BGA1833-опосредованное уничтожение тестировали в «обратном» анализе ADCC. В этом анализе клетки NK92MI/NKp30 совместно культивировали с клетками THP-1 в соотношении Е:Т как 5:1 в присутствии BGA1833 в течение 5 часов. Количества LDH (лактатдегидрогеназа) в

супернатанте измеряли с использованием набора CytoTox™ 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (Promega, Мадисон, Висконсин), а процент специфического лизиса рассчитывали в соответствии с инструкцией производителя. Как показано на фиг. 9B, антитело BGA1833 к NKp30 может индуцировать клетки NK92MI/NKp30 для лизиса клеток-мишеней THP-1 в зависимости от дозы (EC_{50} : 0,0026 мкг/мл).

Пример 9 Активация NKp30⁺ NK-клеточной линии NK92MI/NKp30 антителами к NKp30, включающими мультиспецифические антитела

[0173] В аналогичном функциональном эксперименте с описанным выше мультиспецифическими антителами (например, биспецифическими антителами), которые включали NKp30 в качестве одного из антигенсвязывающих доменов, исследовали их способность индуцировать высвобождение IFN-гамма. Получали биспецифическое антитело с NKp30 в качестве первого антигенсвязывающего домена и анти-клаудин 18.2 (CLDN18.2) в качестве второго антигенсвязывающего домена. Также было получено другое биспецифическое антитело с NKp30 в качестве первого антигенсвязывающего домена и онкофетальным антигеном к 5T4 (5T4) в качестве второго антигенсвязывающего домена.

[0174] Биспецифические антитела к NKp30×CLDN18.2 и NKp30×5T4 оценивали путем совместного культивирования NK92MI/NKp30 с опухолевыми клетками CLDN18.2⁺ (КАТО III) или опухолевыми клетками 5T4⁺ (MDA-MB-468, U-87-MG или T-47D) в течение ночи. Продукция IFN-γ использовали в качестве результата. В качестве отрицательного контроля использовали только IgG человека и среду. Как показано на фиг. 10B и 11, биспецифические антитела, которые включали NKp30 в качестве антигенсвязывающего домена, индуцировали секрецию клеток NK92MI/NKp30 IFN-γ в присутствии опухолевых клеток ТАА⁺ дозозависимым образом. Это также продемонстрировало, что мультиспецифические антитела, созданные с NKp30 в качестве одного из антигенсвязывающих доменов, не препятствуют связыванию второго антигенсвязывающего домена. Это также показало, что мультиспецифические антитела NKp30 являются полностью функциональными, что позволяет рекрутировать NK-клетки через часть NKp30 мультиспецифического антитела и обеспечивает связывание/функцию части ТАА. Это указывает на то, что NKp30 в качестве первого антигенсвязывающего домена будет полезен при создании любого мультиспецифического антитела.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые специфически связывают NKp30 (запускающий естественную цитотоксичность рецептор 3) человека.

2. Антитело по п. 1, связывающее NKp30 человека по меньшей мере по аминокислотам изолейцин 50 и лейцин 86 в SEQ ID NO:1.

3. Антитело по п. 2, снижающее взаимодействие NKp30 с лигандом B6H7.

4. Антитело по п. 3, обладающее активностью агониста NKp30.

5. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1 (определяющая комплементарность область 1 тяжелой цепи), представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:29; и переменную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1 (определяющая комплементарность область 1 легкой цепи), представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:20; и переменную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO: 8; или

(iii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:3, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:5; и переменную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8.

6. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:30, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 32;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 21, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую

аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 23; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую аминокислотную последовательность, по меньшей мере на 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98 или 99% идентичную SEQ ID NO: 13.

7. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 2, где одна, две, три, четыре, пять, шесть, семь, восемь, девять или десять аминокислот в SEQ ID NO:30, 32, 21, 23, 11 или 13 были вставлены, удалены или заменены.

8. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, содержащие:

(i) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO:30, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 32;

(ii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO:21, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO:23; или

(iii) переменную область тяжелой цепи (VH), содержащую SEQ ID NO:11, и переменную область легкой цепи (VL), содержащую SEQ ID NO: 13.

9. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-4, которое представляет собой моноклональное антитело, химерное антитело, гуманизированное антитело, сконструированное антитело человека, одноцепочечное антитело (scFv), фрагмент Fab (антигенсвязывающий фрагмент), фрагмент Fab' или фрагмент F(ab')₂.

10. Антитело по п. 1, представляющее собой мультиспецифическое антитело.

11. Мультиспецифическое антитело, содержащее по меньшей мере первый антигенсвязывающий домен, который специфически связывает NKp30 человека, и по меньшей мере второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) человека.

12. Мультиспецифическое антитело по п. 11, где первый антигенсвязывающий домен содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:29; и переменную область легкой цепи, содержащую (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8;

(ii) переменную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:19, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную

в SEQ ID NO:20; и варибельную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8; или

(iii) варибельную область тяжелой цепи, содержащую (a) HCDR1, представленную в SEQ ID NO:3, (b) HCDR2, представленную в SEQ ID NO:4, (c) HCDR3, представленную в SEQ ID NO:5; и варибельную область легкой цепи, содержащую: (d) LCDR1, представленную в SEQ ID NO:6, (e) LCDR2, представленную в SEQ ID NO:7, и (f) LCDR3, представленную в SEQ ID NO:8,

и по меньшей мере второй антигенсвязывающий домен, который специфически связывает опухоль-ассоциированный антиген (ТАА) человека.

13. Мультиспецифическое антитело по п. 12, представляющее собой биспецифическое антитело.

14. Биспецифическое антитело по п. 13, представляющее собой биспецифическое четырехвалентное антитело.

15. Биспецифическое четырехвалентное антитело по п. 14, содержащее VD1-CL-(X1)_n-VD2-CH1-Fc или VD1-CH-(X1)_n-VD2-CL-Fc, где VD1 представляет собой первый варибельный домен антигенсвязывающего домена, VD2 представляет собой второй варибельный домен антигенсвязывающего домена, Fc (кристаллизующийся фрагмент) представляет собой одну полипептидную цепь Fc-области, CH или CL представляет собой константный тяжелый или константный легкий домен, и (X1)_n представляет собой линкер из по меньшей мере 2 аминокислот.

16. Биспецифическое четырехвалентное антитело по п. 15, где линкер представляет собой любую последовательность, представленную в SEQ ID NO:43-85.

17. Биспецифическое четырехвалентное антитело по п. 16, где линкер представляет собой SEQ ID NO:44.

18. Биспецифическое четырехвалентное антитело по п. 16, где линкер представляет собой SEQ ID NO:50.

19. Биспецифическое четырехвалентное антитело по п. 16, где линкер представляет собой SEQ ID NO:55.

20. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, обладающие антителозависимой клеточной цитотоксичностью (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичностью (CDC).

21. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, имеющие сниженное гликозилирование или не имеющие его, или являющиеся гипогликозилированными.

22. Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, содержащие повышенное количество структур бисектного GlcNac (N-ацетилглюкозамин).

23. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG1 (иммуноглобулин G1).

24. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, где Fc-домен представляет собой Fc-домен IgG4.

25. Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 24, где IgG4 имеет замену S228P (в соответствии с системой нумерации EU).

26. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель.

27. Способ лечения рака, включающий введение нуждающемуся пациенту эффективного количества антитела или антигенсвязывающего фрагмента по п. 1 или 11.

28. Способ по п. 27, где рак представляет собой рак желудка, рак толстой кишки, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак головы и шеи, рак почек, рак печени, мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак кожи, мезотелиому, лимфому, лейкоз, миелому и саркому.

29. Способ по п. 27, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент вводят в комбинации с другим терапевтическим агентом.

30. Способ по п. 28, где терапевтический агент представляет собой паклитаксел или агент на основе паклитаксела, доцетаксел, карбоплатин, топотекан, цисплатин, иринотекан, доксорубицин, леналидомид или 5-азацитидин.

31. Способ по п. 30, где терапевтический агент представляет собой агент на основе паклитаксела, леналидомид или 5-азацитидин.

32. Выделенная нуклеиновая кислота, кодирующая антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-19.

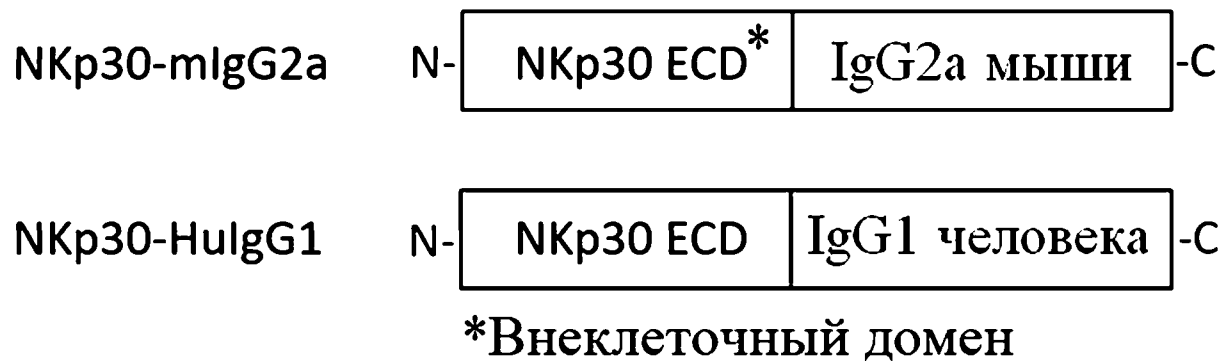
33. Вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п. 32.

34. Клетка-хозяин, содержащая нуклеиновую кислоту по п. 32 или вектор по п. 33.

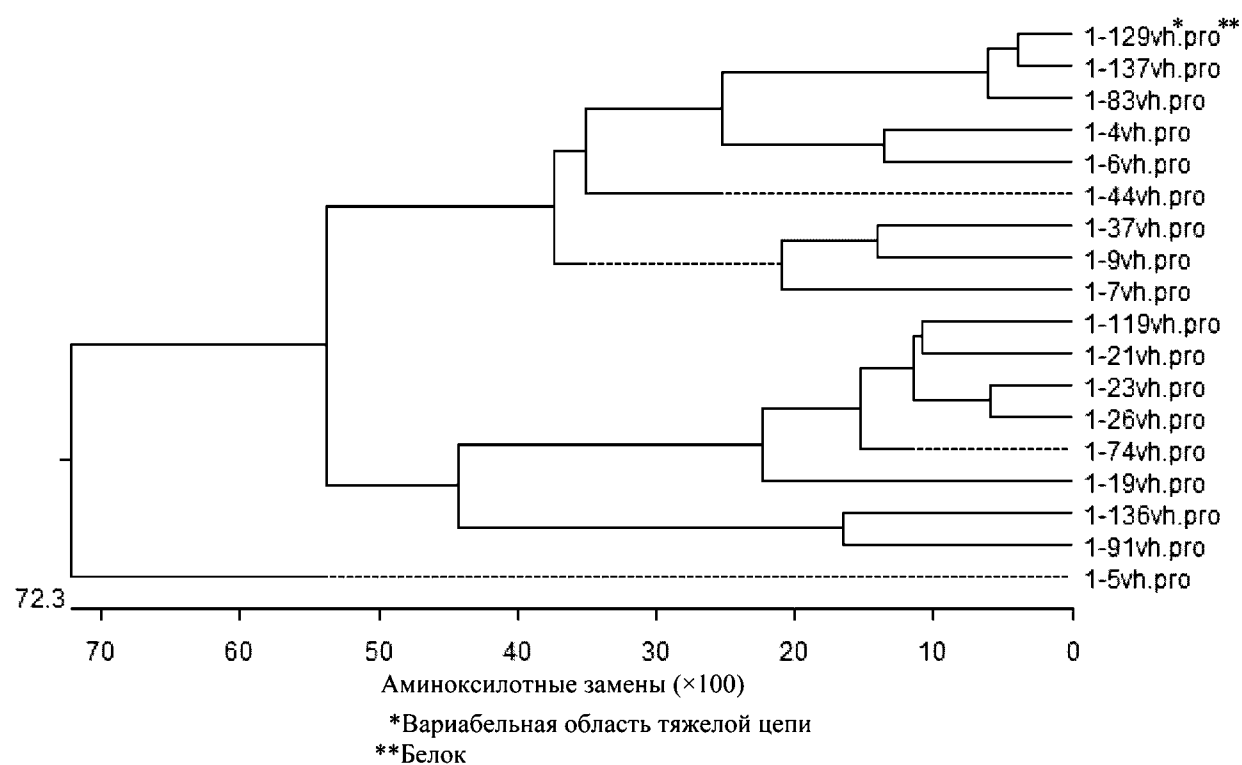
35. Способ получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий культивирование клетки-хозяина по п. 35 и выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента из культуры.

36. Диагностический реагент, содержащий антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 1.

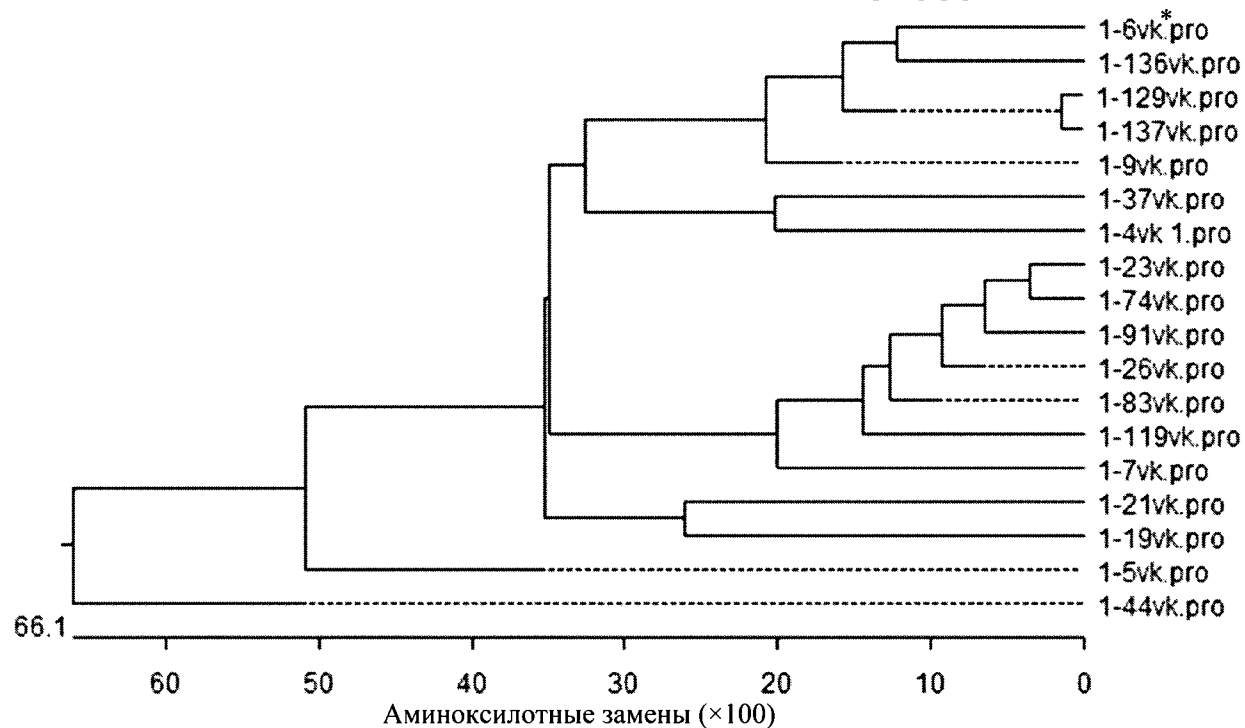
37. Диагностический реагент по п. 36, где метка выбрана из группы, состоящей из радиоактивной метки, флуорофора, хромофора, визуализирующего агента и иона металла.



Фиг. 1

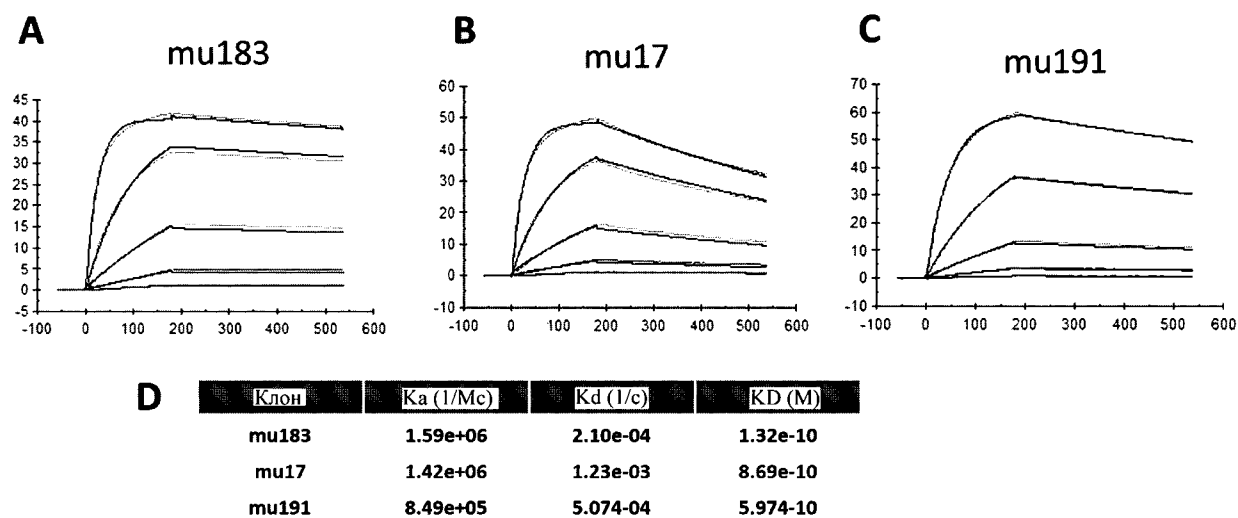


Фиг. 2А

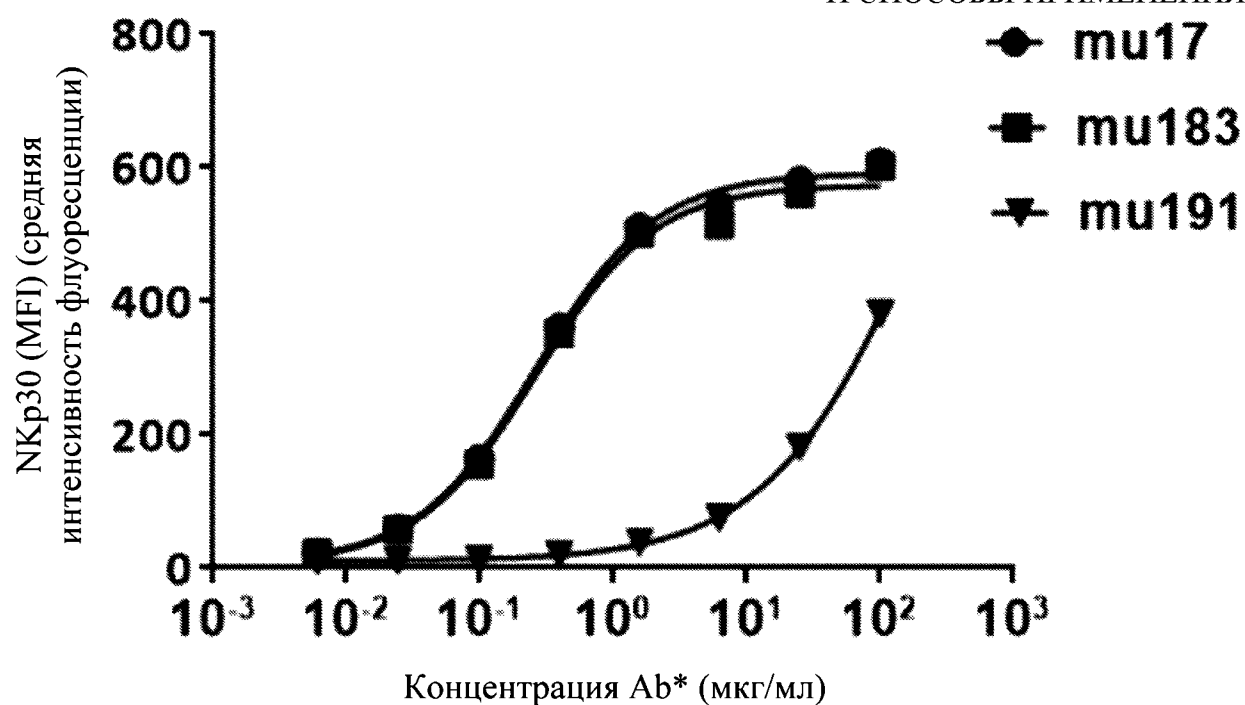


*Варибельная область легкой цепи

Фиг. 2В



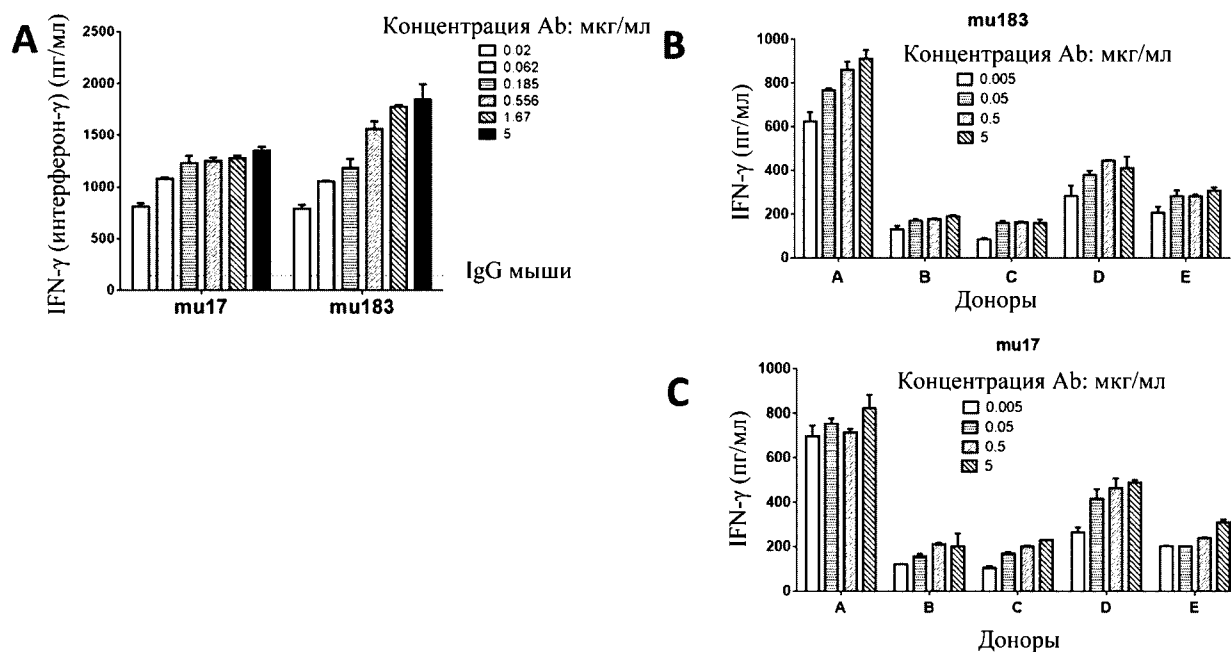
Фиг. 3А-Д



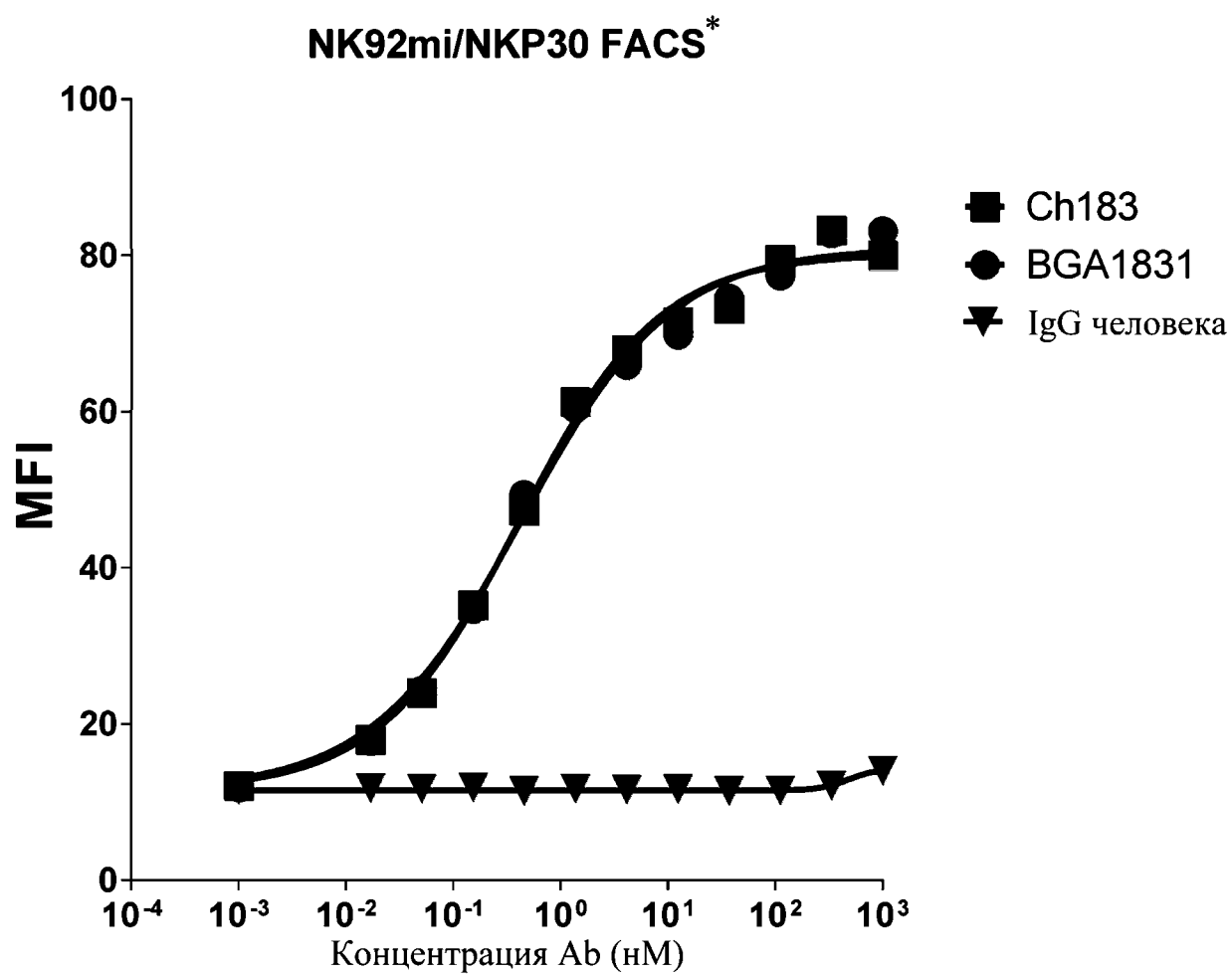
	mu17	mu183	mu191
EC ₅₀ (мкг/м)	0.2593	0.2627	221.6

*Антитело

Фиг. 4

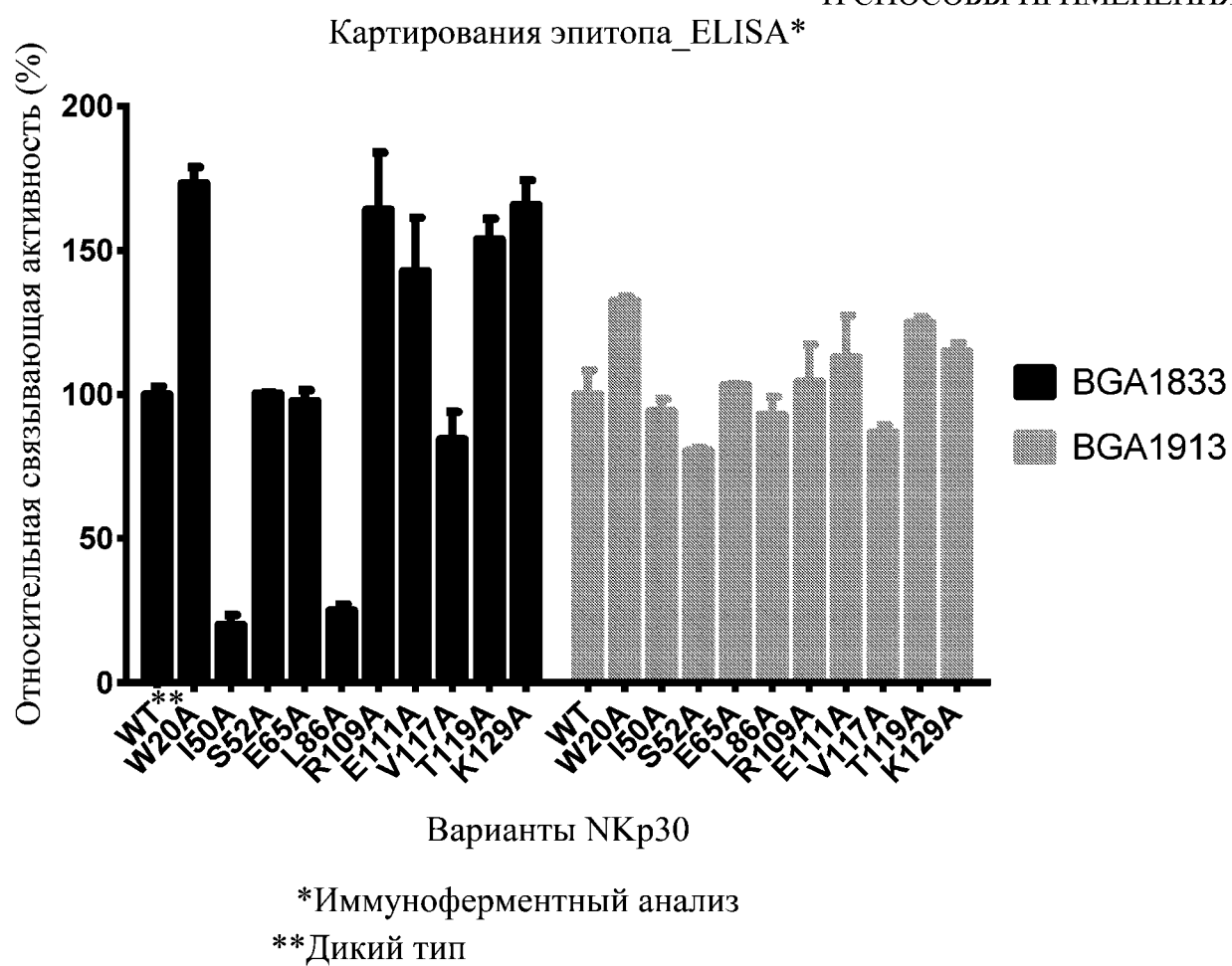


Фиг. 5А-С

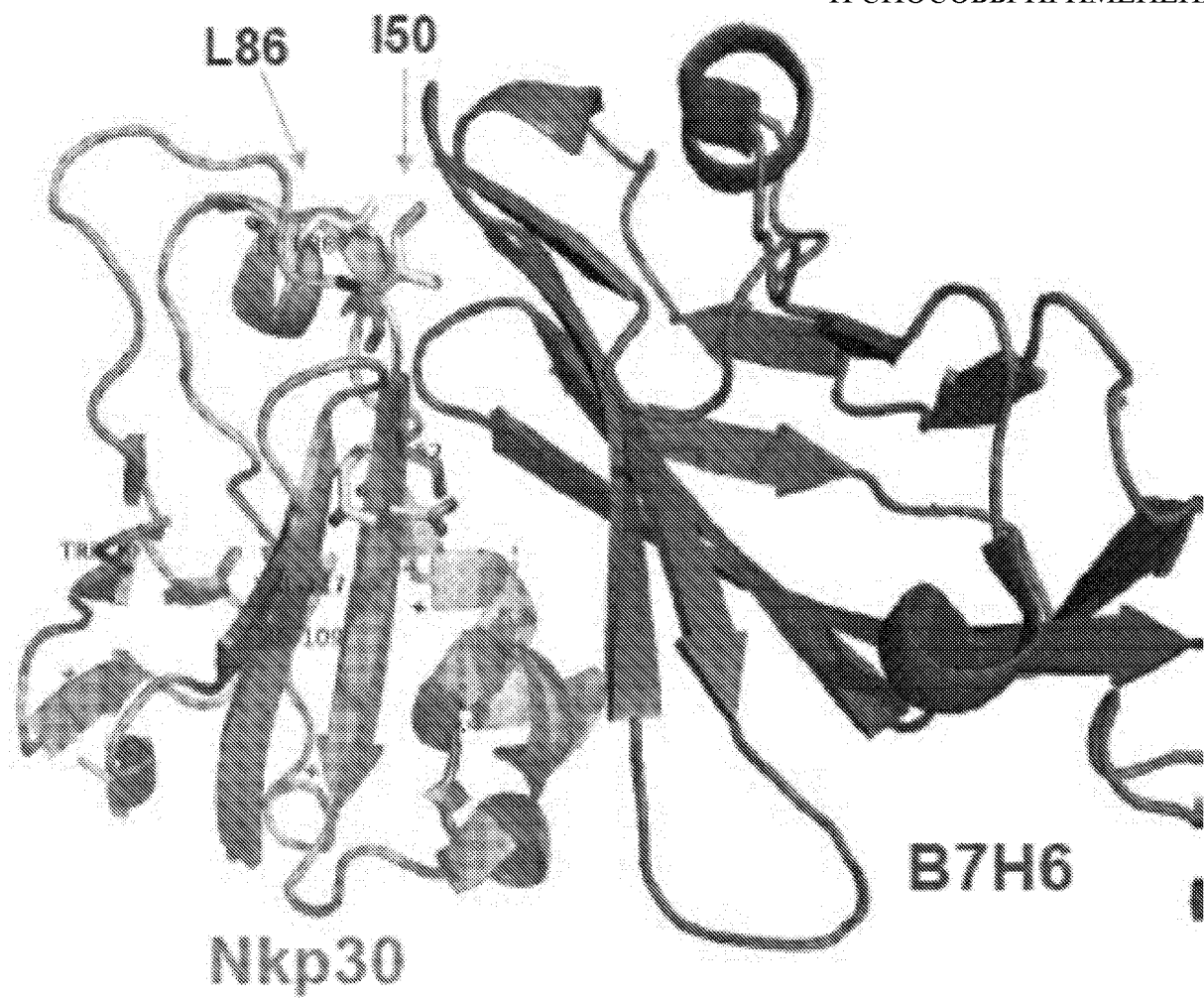


*Сортировка флуоресцентно-активированных клеток

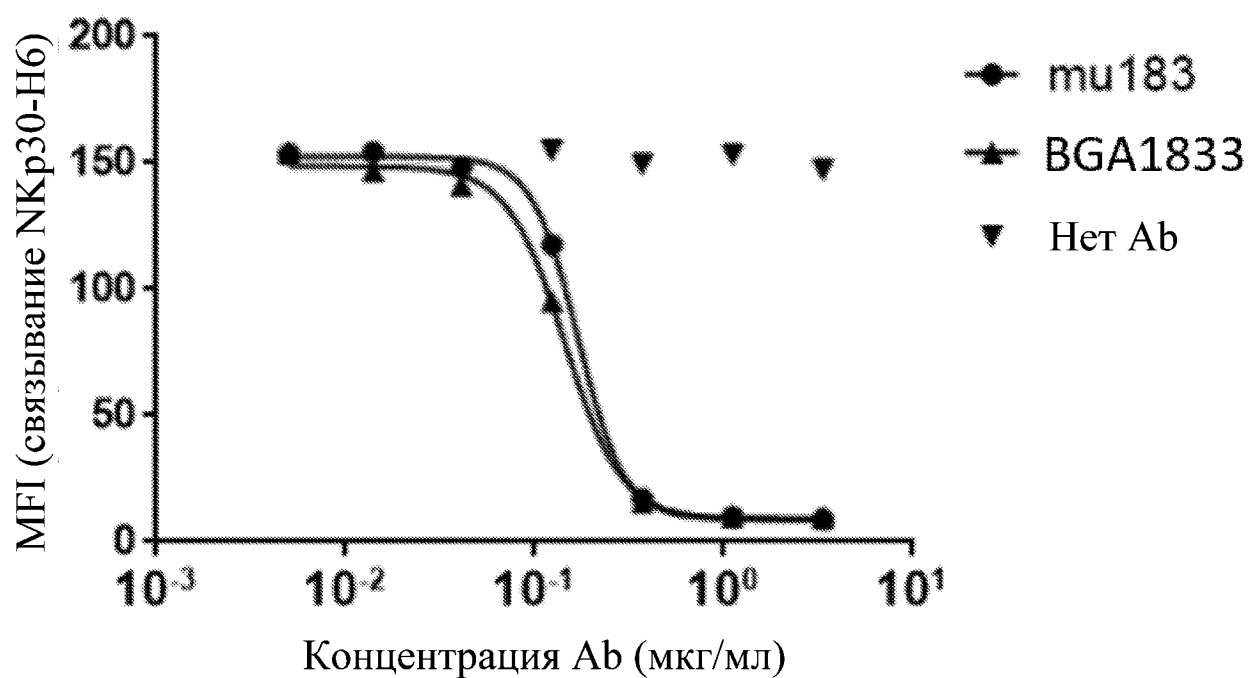
Фиг. 6



Фиг. 7А

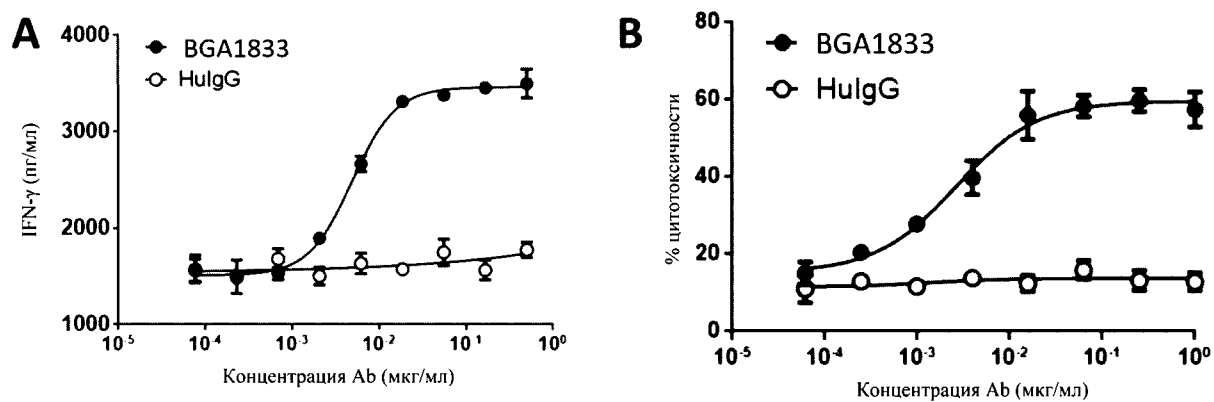


Фиг. 7В

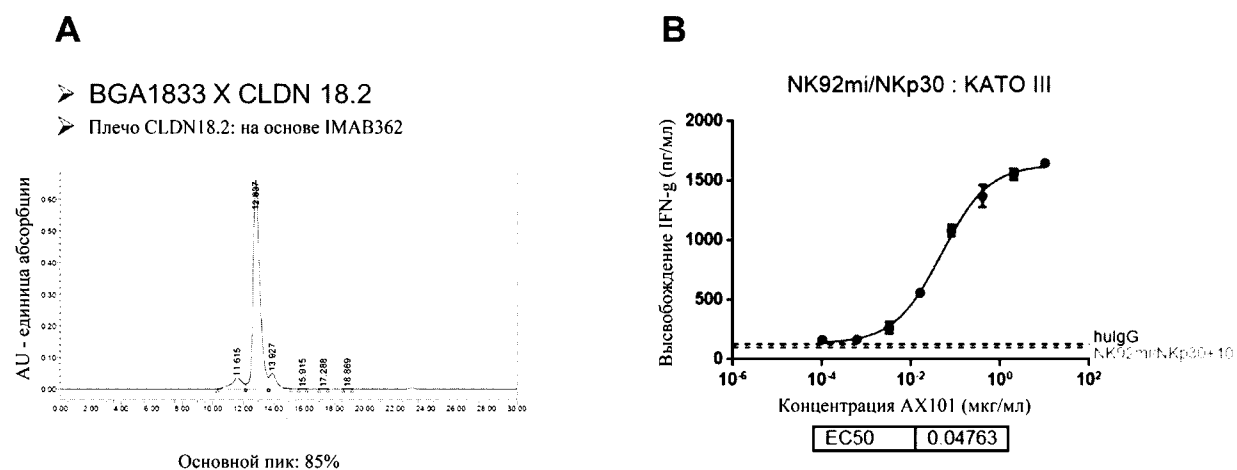


	mu183	BGA1833
IC_{50} (мкг/мл)	0.1690	0.1442

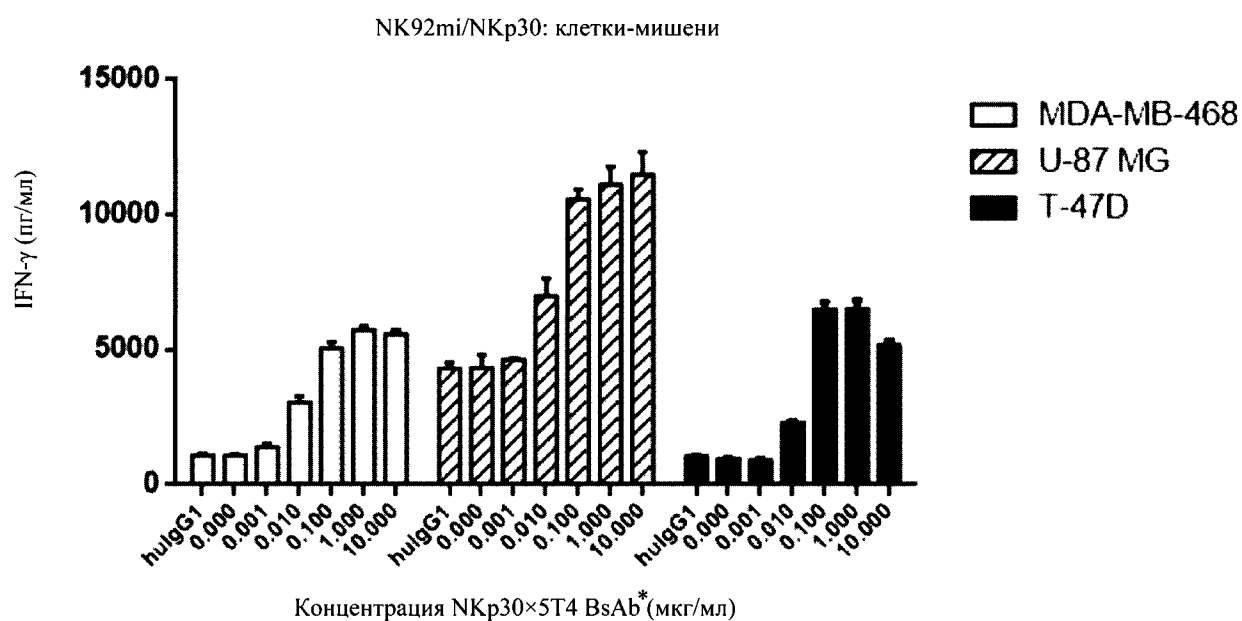
Фиг. 8



Фиг. 9А-В



Фиг. 10А-В



*Биспецифическое антитело

Фиг. 11